



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**Estudio de la viabilidad y actividad proteolítica de
Lactobacillus rhamnosus GG y *Lactobacillus delbrueckii*
subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 en una matriz láctea (queso
semimadurado)**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS
PRESENTA:**

ZAIRA LILIANA LÓPEZ CUELLAR

Dirección: Dr. Luis Guillermo González Olivares, ICBI, UAEH

Codirección: Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano, UAM-I

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Química

Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval

Director del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAP)

PRESENTE

Los suscritos Dr. Luis Guillermo González Olivares, adscrito al Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano, adscrita al departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa, comunicamos a usted que después de haber revisado el Trabajo de Investigación intitulado "**Estudio de la viabilidad y actividad proteolítica de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 en una matriz láctea (queso semimadurado)**", presentado por la pasante de Ingeniería en Alimentos Zaira Liliana López Cuellar, de la cual somos Director y Codirectora respectivamente, consideramos que cumple con los elementos suficientes de contenido y forma para su réplica oral en el Examen Recepcional correspondiente, por lo que otorgamos nuestra aprobación para su impresión.

Sin más por el momento quedamos de usted

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"

Mineral de la Reforma, Hidalgo a 07 de marzo de 2014

Dr. Luis G. González Olivares

Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano

AGRADECIMIENTOS

¡Mil gracias! a mi director, el Dr. Luis Guillermo González Olivares por todo su apoyo brindado para la realización de este proyecto. Gracias por sus consejos, por esa calidez humana que tiene y el entusiasmo que transmite por seguir adelante. Gracias por confiar en mí sin conocerme y ofrecerme tantos conocimientos que enriquecieron mi vida profesional.

A la Dra. Gabriela Rodríguez Serrano, gracias por todo su apoyo, tiempo, dedicación y conocimientos otorgados en esta investigación. Gracias Dra. !!!

Al M. en C. Jesús Franco, gracias por su tiempo y conocimientos ofrecidos en la realización de este proyecto.

Al Dr. José Sepúlveda y su hermano Jorge, gracias por el tiempo y atención dedicada en enriquecer esta investigación.

A las doctoras Ely, Chely y Judith, gracias por las enseñanzas y el apoyo en la realización de este proyecto.

Al Dr. Fidel, gracias por su tiempo y las enseñanzas en la utilización del HPLC.

A Xóchitl Martínez gracias por brindarme tu amistad, por todos los consejos y el apoyo que me ofreciste desde el primer momento que ingrese al laboratorio. Muchas gracias Xóchitl!!!!

A mis amigos Sandy, Javier, Mary, Itzel, Edith, Keila y Montse, gracias por su amistad, apoyo, confianza, consejos, por las alegrías y tristezas vividas a lo largo de la carrera. ¡Gracias amigos! ¡Los quiero mucho!

A mis amigas incondicionales Nancy, Ale, Lupita, Yareni y Fabiola, gracias por sus consejos y por estar conmigo en todo momento, gracias por brindarme esa confianza que tanto valoro de ustedes. ¡Las quiero mucho mucho niñas!

A mi tía Yoya y mi abuelita Gloria, gracias por estar conmigo y por todo su apoyo. ¡Las quiero muchooo!

DEDICATORIAS

A mis papas Gabino López Hernández y Ma. Del Rocío Cuéllar Herrera, quienes son el motivo más grande para alcanzar mis metas. Gracias por guiar mi camino y apoyarme en todo momento. ¡Los amo papis!

A mis hermanas Rocío, Gaby y Karla, gracias por su apoyo que siempre me han dado. ¡Las amo hermanitas!

A mi sobrino Emilio, por ser mi alegría y tormento de cada día☺. ¡Te amo!

A Rodolfo Magos Cortes, gracias por tu amor, apoyo, motivación y consejos que me has brindado a lo largo de este camino. ¡Te amo mucho Rodo!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
NOMENCLATURA.....	VII
RESUMEN.....	VIII
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Composición de la leche	3
2.2 Proteínas de la leche.....	3
2.2.1 Caseínas.....	4
2.2.1.1 Caseína α_{s1}	5
2.2.1.2 Caseína α_{s2}	5
2.2.1.3 Caseína β	5
2.2.1.4 Caseína κ	6
2.2.2 Proteínas del suero de leche	7
2.2.2.1 α -lactoalbúmina.....	7
2.2.2.2 β -lactoglobulina.....	7
2.2.2.3 Seroalbúmina.....	8
2.3 Bacterias ácido lácticas	8
2.3.1 Bacterias lácticas probióticas	9
2.3.1.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.....	11
2.3.2 BAL productoras de exopolisacárido.....	11
2.3.2.1 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	13
2.3.3 Sistema proteolítico de las bacterias lácticas.....	14
2.4 Quesos	15
2.4.1 Cultivos iniciadores en la maduración	16

2.4.2	Actividad proteolítica durante la maduración	18
CAPÍTULO 3	20
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
3.1	Hipótesis.....	20
3.2	Objetivo general	20
3.3	Objetivos específicos.....	20
CAPÍTULO 4	21
MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1	Preparación del cultivo madre.....	21
4.2	Elaboración de queso tipo manchego.....	22
4.3	Muestreo.....	25
4.4	Determinación de viabilidad	25
4.5	Microscopía electrónica de barrido	26
4.6	Estudio del perfil proteolítico.....	27
4.6.1	Preparación de las muestras	27
4.6.2	Cuantificación de grupos amino libres.....	28
4.6.3	Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	29
4.6.4	Caracterización del tamaño de los péptidos mediante HPLC de exclusión molecular .	31
4.7	Análisis estadístico.....	32
CAPÍTULO 5	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1	Determinación de viabilidad	33
5.1.2	Viabilidad de <i>L. rhamnosus</i> GG.....	33
5.1.3	Viabilidad de <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772	35
5.2	Análisis de la interacción microorganismo-queso-EPS mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	37
5.3	Cuantificación del grado de hidrólisis por el método de TNBS.....	44
5.4	Estimación del peso molecular de los péptidos producidos por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	46
5.5	Caracterización de péptidos mediante HPLC por exclusión molecular	52
CAPÍTULO 6	57

CONCLUSIONES.....	57
CAPÍTULO 7.....	59
RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS	59
CAPÍTULO 8.....	60
REFERENCIAS	60
CAPÍTULO 9.....	69
APÉNDICE	69
9.1 Preparación de soluciones	69
9.1.1 Preparación de soluciones del método de TNBS	69
9.1.2 Preparación de soluciones para electroforesis.....	69
9.1.3 Preparación de soluciones para el método HPLC de exclusión molecular	71
9.2 Estándar de pesos moleculares.....	72
9.2.1 Estándar de pesos moleculares para electroforesis SDS-PAGE.....	72
9.2.2 Estándar de pesos moleculares para HPLC de exclusión molecular	72
9.3 Curvas patrón	73
9.3.1 Curva patrón de TNBS.....	73
9.3.2 Curva para la determinación de pesos moleculares por electroforesis.....	73
9.3.2.1 Curva patrón de sistema de maduración a 4°C (a).....	73
9.3.2.2 Curva patrón de sistema de maduración a 4°C (b)	74
9.3.2.3 Curva patrón de sistema de maduración a 14°C (a).....	74
9.3.2.4 Curva patrón de sistema de maduración a 14°C (b)	75
9.3.3 Curva de pesos moleculares para HPLC por exclusión molecular.....	75
9.3.4 Curva de concentración (ppm) para HPLC por exclusión molecular.....	75
9.4 Viabilidad de <i>L. rhamnosus</i> GG (Log UFC/g) durante la maduración de un queso	76
9.5 Viabilidad de <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772 (Log UFC/g) durante la maduración de un queso.....	76
9.6 Concentración de los grupos amino libres (mg/L) durante la maduración de un queso	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG. (Bac Map Genome Atlas).....	11
Figura 2. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	13
Figura 3. Enzimas involucradas en la digestión de proteínas por las BAL.....	15
Figura 4. Cultivos de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772.....	22
Figura 5. Diferentes etapas durante la elaboración del queso tipo manchego.	24
Figura 6. Toma de muestra de forma aséptica.	25
Figura 7. Preparación de muestras para análisis de perfil proteolítico.	27
Figura 8. Reacción de TNBS con los grupos amino libres.	28
Figura 9. Equipo de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra cell, BIO-RAD	31
Figura 10. Equipo para Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	32
Figura 11. Morfología de las colonias de <i>L. rhamnosus</i> GG en agar MRS.	33
Figura 12. Viabilidad (log UFC/g) de <i>L. rhamnosus</i> GG durante la maduración de un queso tipo manchego.	35
Figura 13. Viabilidad (log UFC/g) de <i>L. rhamnosus</i> GG en presencia de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772 durante la maduración del queso.....	36
Figura 14. Micrografía del borde del queso inoculado con <i>L. rhamnosus</i> GG (500x). G. Grasa; P. Proteínas.....	38
Figura 15. Micrografía del borde del queso inoculado con <i>L. rhamnosus</i> GG (2,500x).	39
Figura 16. Micrografía del centro del queso inoculado con <i>L. rhamnosus</i> GG (10,000x). ...	39
Figura 17. Micrografía del centro del queso (500x) con <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772. G. Grasa; P. Proteínas.	40
Figura 18. Micrografía del centro del queso (5,000x) con <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772. L. Lactobacillus; P. Proteínas; G. Grasa.	41
Figura 19. Micrografía del borde del queso (6,500x y 10,000x) con <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772. P. Proteínas; EPS. Exopolisacárido.	42
Figura 20. Micrografía del borde del queso (2,000x) con <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772. P. Proteínas; G. Grasa; L. Lactococos	42
Figura 21. Micrografía del borde del queso (10,000x) con <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772. P. Proteínas; G. Grasa; L. Lactobacillus	43

Figura 22. Micrografía del borde del queso (5,000x y 10,000x) con <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772. P. Proteínas; G. Grasa; L. Lactobacillus	43
Figura 23. Grupos amino libres generados durante la maduración del queso manchego inoculado con <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772 a diferentes temperaturas.....	44
Figura 24. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 4 °C (a).....	47
Figura 25. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 4 °C (b).....	47
Figura 26. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 14°C (a).....	49
Figura 27. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 14 °C (b)	50
Figura 28. Análisis de las muestras del queso almacenado a 4 °C, analizadas por HPLC de exclusión molecular a 220 nm.	54
Figura 29. Análisis de las muestras del queso almacenado a 14 °C, analizados por HPLC de exclusión molecular a 220 nm.	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición aproximada de la leche. (Adaptada de Walstra <i>et al.</i> , 2001)	3
Tabla 2. Concentración de las proteínas en la leche (Gösta, 2003).....	4
Tabla 3. Algunos microorganismos considerados como probióticos.....	10
Tabla 4. PM (kDa) de péptidos generados durante la maduración del queso a 4 °C.....	48
Tabla 5. PM (kDa) de péptidos generados durante la maduración del queso a 14°C.....	51
Tabla 6. Péptidos menores a 6 kDa encontrados en el queso madurado a 4 °C.....	53
Tabla 7. Péptidos menores a 6 kDa encontrados en el queso almacenado a 14°C.....	55

NOMENCLATURA

BAL	Bacteria Ácido Láctica
Da	Dalton
EPS	Exopolisacárido
g	Gramo
g/L	Gramo por litro
h	Hora
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kDa	Kilodalton
L	Litros
lb/in ²	Libras sobre pulgada cuadrada
log UFC/g	Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por gramo
M	Molaridad
mg/mL	Miligramo por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MRS	Man Rogosa Sharp
N	Normalidad
nm	Nanómetro
°D	Grado Dornic
p/p	Peso sobre peso
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecilsulfato de Sodio
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TNBS	Ácido trinitrobenzenosulfónico
UFC	Unidades formadoras de Colonia
V	Voltaje
V/V	Volumen sobre volumen
μL	Microlitro

RESUMEN

Actualmente las proteínas de la leche son consideradas como una fuente importante de péptidos bioactivos. Esto ha provocado que se intensifique el estudio en hidrolizados proteicos de leches fermentadas, yogurt y quesos. Es por ello que en esta investigación se analizó un queso semimadurado a dos diferentes temperaturas (4 °C y 14 °C) durante 28 días para determinar, en cuál de ellos se observaba mayor actividad proteolítica y mayor sobrevivencia de un probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* GG) inoculada de manera individual junto con una cepa filante (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772).

Se observó que en el queso inoculado solo con el probiótico hubo muerte celular a ambas temperaturas hasta en dos ciclos logarítmicos. Por otro lado en el sistema con ambos microorganismos se mantuvo la sobrevivencia del probiótico a lo largo del periodo de maduración sin encontrar diferencia significativa entre las dos temperaturas de maduración. En este contexto, por medio de microscopía electrónica de barrido se observó la interacción que existe entre las bacterias ácido lácticas y la matriz proteica, encontrando exopolisacárido producido por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. Adicionalmente se observaron diferencias estructurales entre ambos sistemas, las cuales consistían en mayor agregación proteica en el queso inoculado con ambas bacterias lácticas.

Por otra parte, se midió la concentración de grupos amino libres para conocer el grado de hidrólisis de las proteínas del queso, mediante el método del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS). A través de este análisis se encontró un aumento de los grupos amino libres en ambas temperaturas de maduración, sin embargo no se encontró diferencia significativa en la producción final de grupos amino libres entre ellos. El perfil de pesos moleculares de los péptidos generados durante la maduración, fue determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con una T=15% y la concentración de las fracciones peptídicas se midió por HPLC en columna de exclusión de tamaño. El análisis de las imágenes de los geles de electroforesis se efectuó mediante el analizador de imágenes ImageJ. Se encontró que

en el queso madurado a una temperatura de 14 °C se produjo una mayor cantidad de péptidos menores a 6.5 kDa que a una temperatura de 4 °C. Mediante el análisis de HPLC se encontró acumulación de péptidos de bajo peso molecular, menores a los 3 kDa a ambas temperaturas de maduración, sin embargo, a 14 °C se localizó mayor concentración de péptidos de bajo peso molecular. Se pudieron separar dos fracciones de cada uno de los sistemas, que correspondían a (1.45 y 0.34 kDa) para el sistema madurado a 14 °C y en el sistema a 4 °C correspondían a (1.76 y 0.43 kDa). Estos pesos moleculares pueden corresponder a péptidos con actividad biológica, lo cual aumenta las expectativas de tener este tipo de péptidos en los quesos semimadurados.

CAPÍTULO 1**INTRODUCCIÓN**

En los últimos años, una tendencia importante en los países desarrollados ha sido la promoción del beneficio de los alimentos funcionales. En el sector lácteo, esta tendencia se ha encaminado a la utilización de probióticos en productos fermentados. El uso de estos microorganismos tiene una incidencia en la salud, debido en buena parte a la producción de metabolitos que se liberan durante el proceso de fermentación. Algunos de estos metabolitos son péptidos de bajo peso molecular con actividades biológicas potencialmente benéficas a la salud. Aunque la mayoría de los productos con probióticos son leches fermentadas, actualmente se han comenzado a aplicar en quesos madurados y semimadurados como cultivos iniciadores (Farnworth, 2008).

Los productos lácteos fermentados son asociados generalmente con bacterias ácido lácticas (BAL), entre las cuales podemos encontrar las cepas probióticas. Estas bacterias pueden exhibir un efecto terapéutico y preventivo contra una serie de enfermedades en los seres humanos y en animales. Se ha demostrado que bacterias como *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus rhamnosus*, tienen la capacidad de generar péptidos bioactivos durante el proceso de fermentación (Mulero *et al.*, 2011). La generación de péptidos bioactivos se produce, debido a que las bacterias ácido lácticas poseen un sistema proteolítico compuesto de proteinasas, peptidasas y sistemas de transporte, que les permite degradar las proteínas de la leche (principalmente caseínas) en aminoácidos y péptidos para suplir sus necesidades metabólicas y, así garantizar su crecimiento durante la fermentación (Torres *et al.*, 2005). Estos péptidos bioactivos son de bajo peso molecular (3 a 20 aminoácidos) y se ha demostrado que, tras su administración oral, pueden ejercer un efecto positivo sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso, en función de la secuencia de aminoácidos que los conformen (Figuroa-González *et al.*, 2010).

Por otra parte, se ha evaluado el efecto de la adición de cultivos iniciadores sobre las características sensoriales y químicas en diferentes tipos de queso. Sin embargo, son

pocos los estudios disponibles acerca del papel que desempeñan los diferentes cultivos iniciadores, en particular los probióticos sobre la producción de péptidos bioactivos.

Además para que el probiótico confiera un efecto benéfico a la salud del consumidor, debe sobrevivir durante el periodo de maduración del queso y durante su vida de anaquel. Por ello, para asegurar que la cantidad de probióticos sea la adecuada en el momento de consumo (1×10^9 UFC/mL), se elaboran quesos inoculados con altas concentraciones de microorganismos y se realizan las modificaciones pertinentes en los procesos de fabricación del queso de tal manera que favorezcan su sobrevivencia (Farnworth, 2008). En este sentido, una de las estrategias está dirigida hacia la implementación de diferentes cultivos iniciadores como el uso de bacterias filantes. Estas bacterias pueden ser probióticas o no y producen exopolisacáridos que pueden ejercer protección hacia los probióticos de las condiciones adversas que prevalezcan en el producto durante su almacenamiento

Adicional al estudio de los perfiles peptídicos durante el periodo de maduración de un queso; el objetivo de este trabajo fue monitorear el efecto que ejerce *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772, productor de exopolisacárido, como cultivo iniciador, en la sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus* GG, en un queso semimadurado a dos temperaturas diferentes.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Composición de la leche

La leche es una emulsión de materia grasa, en forma globular. Este líquido es una suspensión de materias proteicas en un suero constituido por una solución verdadera que contiene, principalmente lactosa y sales minerales (Alais, 1998).

Además contiene otros componentes presentes en cantidades mínimas: lecitinas, vitaminas, enzimas, nucleótidos, gases disueltos, etc. En la tabla 1 se muestra los principales componentes de la leche en porcentaje.

Tabla 1. Composición aproximada de la leche. (Adaptada de Walstra *et al.*, 2001)

Componentes	Contenido medio de la leche (%p/p)
Agua	87.5
Lactosa	4.6
Grasa	3.7
Proteína	3.2
Sustancias minerales	0.7
Ácidos orgánicos	0.15
Varios	0.15

2.2 Proteínas de la leche

Las proteínas de la leche (Tabla 2) tienen un alto valor biológico y están formadas por caseínas (80%) y las proteínas del suero (20%).

Tabla 2. Concentración de las proteínas en la leche (Gösta, 2003)

	Concentración en leche (g/L)	% de la proteína total (p/p)
Caseína		
α_{s1} caseína	10.0	30.6
α_{s2} caseína	2.6	8.0
β caseína	10.1	30.8
κ caseína	3.3	10.1
Total caseína	26.0	79.5
Seroproteínas		
α lactoalbúmina	1.2	3.7
β lactoglobulinas	3.2	9.8
Albúmina del suero sanguíneo	0.4	1.2
Inmunoglobulinas	0.7	2.1
Otras (incluyendo peptona- proteasas)	0.8	2.4
Total Seroproteínas	6.3	19.3
Proteínas de la membrana del glóbulo de grasa	0.4	1.2
Proteína total	32.7	100

2.2.1 Caseínas

Las caseínas están constituidas de diferentes fracciones (Tabla 2), aparecen en forma de micelas conformadas por complejos macromoleculares de fosfoproteínas y glicoproteínas estabilizadas por puentes de calcio y fosfato en forma de suspensión coloidal. Las proteínas que se encuentran al interior de la micela son insolubles en presencia de calcio y precipitan a pH de 4.6 (Alais, 1998).

Las caseínas poseen alrededor de 200 aminoácidos y en algunos tramos cuentan con una estructura secundaria organizada, debido a la presencia de restos de prolina y, grupos serina unidos a grupos fosfato (Fox y McSweeney, 2003).

2.2.1.1 Caseína α_{s1}

La caseína α_{s1} es la proteína mayoritaria en la leche de vaca. La variante más común tiene 199 aminoácidos en su secuencia, con 8 o 9 grupos fosfato. Desde el punto de vista estructural, está formada por tres regiones hidrofóbicas, con dos de ellas situadas en los extremos (1-41, 90-113 y 132-199) y una zona muy polar entre los aminoácidos 42 y 80. En esta última zona se encuentran todos los grupos fosfato menos uno, lo que le da una carga neta negativa muy importante a esta región de la proteína al pH de la leche (alrededor de 6.6). La caseína α_{s1} contiene 17 restos de prolina, distribuidos a lo largo de toda la cadena, lo que permite que haya muy pocas zonas con estructura secundaria organizada. La asociación con otras moléculas de caseína durante la elaboración del queso se produce a través de interacciones hidrofóbicas en las que está implicada fundamentalmente la zona situada entre los aminoácidos 136 y 196 (Fox y McSweeney, 2003).

2.2.1.2 Caseína α_{s2}

Esta caseína está formada por 207 aminoácidos (Alais, 1998). Se conocen variantes genéticas con diferencias en el grado de fosforilación. La máxima fosforilación se produce en 12 serinas y una treonina, se caracteriza por ser más hidrofílica que la caseína α_{s1} . Posee 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 algunos con carga neta positiva. Esta caseína tiene un puente disulfuro entre las cisteínas que ocupan las posiciones 36 y 40 de la secuencia (Fox y McSweeney, 2003).

2.2.1.3 Caseína β

La caseína β es la caseína más hidrofóbica, presenta una estructura particular, con una clara división en dos zonas. Por un lado, 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 (Fox y McSweeney, 2003). La variante genética más común está formada por 209 aminoácidos, con cinco grupos fosfato (Alais, 1998).

2.2.1.4 Caseína κ

La caseína κ tiene una estructura distinta de la de las otras caseínas. En primer lugar, es más pequeña, ya que solo está constituida por 169 aminoácidos. Además tiene solamente un grupo de fosfato. Esta característica permite que su interacción con el ión calcio sea menor que lo que presenta las otras caseínas. Sin embargo, comparte con la caseína β la propiedad de tener zonas predominantemente hidrofílicas e hidrofóbicas bien marcadas y separadas. Una particularidad de esta caseína es la presencia de una zona con carga neta positiva entre los aminoácidos 20 y 115. La caseína κ es la única caseína que tiene parte de las moléculas glicosiladas, el grupo glucídico está formado o bien por un trisacárido o bien por un tetrasacárido unido a un resto de treonina, en la posición 131, o bien en otra más próxima aún al extremo carboxilo-terminal de la cadena. Cuando se encuentra presente el ácido N-acetil neuramínico, aporta carga neta a la caseína κ (Fox y McSweeney, 2003). Esta proteína se rompe fácilmente por proteólisis en el enlace 105-106 situado entre la fenilalanina y la metionina, en una región rica en restos de prolina y probablemente fácilmente accesible. Cuando esta proteólisis se produce, el fragmento N-terminal (1-105) conocido como para κ -caseína, que es fundamentalmente hidrofóbico, queda unido a las otras caseínas en la micela, mientras que el fragmento C-terminal (106-169) llamado caseinomacropéptido, es muy hidrofílico debido a que en esta fracción está ubicado el resto glucídico y por lo tanto, queda libre en solución (Alais, 1998).

La ruptura de la caseína κ a temperaturas por encima de 20° C, produce la desestabilización de la micela y la agregación del resto de las caseínas. Este proceso es el que sucede en la fabricación de los quesos con coagulación enzimática (Villegas, 2004).

2.2.2 Proteínas del suero de leche

Las proteínas del suero son aquellas que se mantienen en solución cuando el pH de la leche se lleva a 4.6 y precipitan las caseínas. La mayoría son proteínas globulares sujetas a la desnaturalización por calor, presentan una hidrofobicidad relativamente elevada y sus cadenas peptídicas están muy compactas. La mayoría contiene una gran proporción de hélices α y una distribución bastante homogénea de sus cargas (Walstra, 2001).

2.2.2.1 α -lactoalbúmina

La α -lactoalbúmina es una proteína formada por una sola cadena polipeptídica, de 123 aminoácidos, que se caracteriza por tener un bajo peso molecular de unos 14000 Da, y un alto contenido de triptófano (Alais, 1998). Su estructura terciaria, es globular, muy compacta, mantenida por cuatro puentes disulfuro, con una zona de hélice α y otra de hojas plegadas β . Es una proteína ácida con un punto isoelectrico de 4.8. En la vaca existen dos variantes genéticas (A y B), con distribución desigual según las razas (Fox y McSweeney, 2003).

Esta proteína liga fuertemente dos átomos de calcio, la cual es imprescindible en el mantenimiento de su estructura y su estabilidad frente al calor (Walstra and Jenness 1986).

2.2.2.2 β -lactoglobulina

Es la proteína más abundante del lactosuero; constituye alrededor de la mitad de las proteínas del suero de leche. Es una proteína muy hidrofóbica, igual que la caseína, pero no contiene grupos fosfato y sólo posee una pequeña cantidad de prolina (Walstra, 2001).

Tiene un peso de 18000 Da. A temperatura ordinaria, la β - lactoglobulina de la leche no parece ligarse a otras fracciones proteicas; por el contrario, durante el

calentamiento forma un complejo con la caseína κ , mediante un enlace disulfuro. Es la molécula que aporta el mayor número de puentes sulfhídricos, que se modifican o separan en el curso de la desnaturalización (Alais, 1998).

2.2.2.3 Seroalbúmina

Esta proteína es de origen sanguíneo, es una molécula grande con muchos puentes disulfuro y hélices α (Walstra, 2001). Consta de una sola cadena polipeptídica de 582 restos de aminoácidos. Su estructura terciaria pone de manifiesto tres dominios de aproximadamente el mismo tamaño molecular. Posee un grupo tiol libre (cys 34) y 17 enlaces disulfuro (Walstra y Jenness, 1986).

2.3 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, no pigmentadas, catalasa negativas y capaces de crecer en el rango de pH entre 4.0 y 4.5, anaerobias facultativas o microaerofílicas, cuyo metabolismo fermentador las define como bacterias homolácticas o heterolácticas (Villegas, 2004). La limitada capacidad biosintética de las BAL hace que requieran de factores de crecimiento complejos como vitaminas del grupo B, purinas, pirimidinas y aminoácidos específicos. Además el crecimiento sostenido de las BAL depende de la acción de proteinasas, peptidasas y del buen funcionamiento del sistema de transporte de péptidos y aminoácidos específicos (Herrera, 2006). Debido a que en la leche las concentraciones de aminoácidos libres y péptidos no son suficientes para permitirles crecer hasta altas densidades celulares (Hidalgo, 2006).

Dentro de las BAL de importancia en la industria alimentaria se encuentran las pertenecientes a los géneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus* y *Weissella*, siendo el género *Lactobacillus* el más usado en la industria láctea (Herrera, 2006).

La importancia de la utilización de las BAL en la elaboración de productos alimenticios va más allá de la formación de sabores ácidos, dentro de estas funciones se encuentran: inhibición de organismos patógenos, coagulación de la leche, reducción del contenido de lactosa, formación de aroma, producción de gas requerida para la formación de “ojos” en los quesos, proteólisis requerida en la maduración de los quesos y su uso como probióticos (Parra-Huertas, 2010).

2.3.1 Bacterias lácticas probióticas

La palabra probiótico se deriva de dos palabras griegas que son: pro (a favor de) y biótico (vida). Lilly y Stillwell en el año de 1965 intentaron utilizar por primera vez el término, aplicado a una sustancia microbiana que estimulara el crecimiento de otro microorganismo. Fuller (1989) definió a los microorganismos probióticos como: “un suplemento alimenticio con microorganismos vivos que afecta benéficamente al huésped, mejorando el equilibrio microbiano intestinal” con lo que logró una mayor aceptación. La definición más reciente, y la más ampliamente aceptada hasta hoy es la publicada por la FAO/ WHO (2002) la cual menciona lo siguiente: “los microorganismos probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped” (Kun Lee y Salminen, 2009).

Los efectos benéficos de los microorganismos probióticos en la salud humana incluyen: mejora en la digestión a través de un buen funcionamiento del intestino, aumenta la tolerancia a la lactosa, favorece la proliferación de la microflora benéfica, reduce el pH intestinal, reduce el colesterol, incrementa la producción de las vitaminas B (ácido fólico), restauración de la microflora intestinal después de una terapia con antibióticos y estimulación de la respuesta inmune (Ávila, 2011).

Entre los microorganismos probióticos más importantes se encuentran las BAL, fundamentalmente lactobacilos y bifidobacterium. En la tabla 3 se muestran tres grupos de microorganismos que son considerados como probiótico.

Tabla 3. Algunos microorganismos considerados como probióticos

Lactobacillus spp.	Bifidobacterium spp.	Otros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Streptococcus faecium</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. lactis</i>	
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. adolescenties</i>	
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuterii</i>		

Los microorganismos probióticos se han utilizado para la elaboración de alimentos fermentados, siendo los productos lácteos los que desempeñan un papel predominante como portadores de estos.

Al utilizar un probiótico en un alimento fermentado, se deben considerar varios factores que pueden influir sobre la sobrevivencia del probiótico en el producto durante su vida de anaquel y así llegar activo en el momento de incorporarse en el aparato gastrointestinal del consumidor. Estos factores incluyen, el estado de los organismos probióticos agregados, las condiciones de almacenamiento y la composición química del producto como (acidez, contenido de carbohidratos disponibles, fuentes de nitrógeno, actividad de agua y contenido de oxígeno) (Flores, 2008). La cantidad recomendada de microorganismos probióticos que debe tener un alimento debe ser de 1×10^7 a 1×10^9 UFC/mL de microorganismos vivos, al momento de consumo, para que de esta manera puedan conferir beneficios a la salud de los consumidores (Ávila, 2011).

2.3.1.1 *Lactobacillus rhamnosus* GG

Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC 53103) es una cepa que se aisló en 1983 del tracto gastrointestinal de un ser humano sano y fue clasificada como una subespecie de *L. casei*. Años más tarde, el análisis genético del microorganismo lo catalogó como una especie propia (Ávila, 2011). Este probiótico se ha utilizado en diversos productos, como leches fermentadas, quesos semimadurados, jugos y suplementos alimenticios. Se ha demostrado que *L. rhamnosus* GG (Figura 1) es un microorganismo benéfico, capaz de resistir el pH ácido del estómago y la concentración de las sales biliares en el intestino delgado, por ello puede colonizar el tracto digestivo manteniendo un balance de la flora intestinal (Kun Lee y Salminen, 2009).

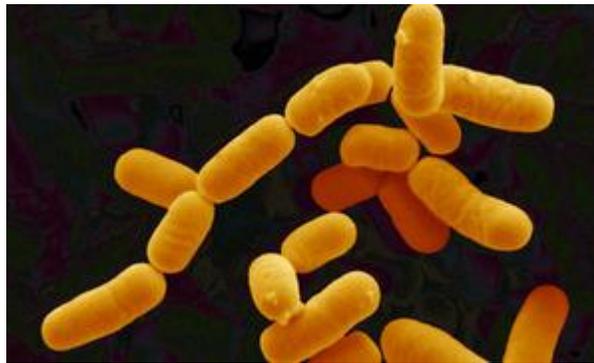


Figura 1 *Lactobacillus rhamnosus* GG. (Bac Map Genome Atlas)

2.3.2 BAL productoras de exopolisacárido

Las BAL se caracterizan por su capacidad de convertir los carbohidratos a ácido láctico. Algunas BAL son capaces de desviar una proporción de azúcares fermentables hacia la biosíntesis de exopolisacáridos (EPS), dependiendo también de las condiciones de cultivo y la composición del medio. Los EPS son polisacáridos de cadena larga con ramificaciones de unidades repetidas de azúcares. Estas unidades de azúcar son principalmente, glucosa, galactosa y ramnosa en diferentes proporciones (Parra-Huertas, 2010). Están asociados a la superficie de la célula en forma de cápsula y secretados al medio ambiente en forma de limo. Los EPS en su ambiente natural desempeñan un rol importante en la protección de la célula microbiana contra

la desecación, fagocitosis, acción de antibióticos y compuestos tóxicos, depredación por protozoos, presión osmótica, adherencia a superficies, formación de películas y en el reconocimiento celular, pero no son alimento de la misma bacteria productora (Zamudio, 2005). Por otra parte, se ha observado que estos compuestos pueden favorecer la retención de nutrientes en la matriz del EPS que posteriormente pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía. Este es un proceso común entre los microorganismos; por ejemplo, pueden retener proteínas cuya posterior hidrólisis puede constituir un suministro de aminoácidos y péptidos necesarios para el crecimiento bacteriano (Mata, 2006).

Los EPS de BAL se pueden subdividir en 2 grupos: los homopolisacáridos y los heteropolisacáridos. Los primeros están compuestos por un único tipo de monosacárido, como el dextrano, constituido por monómeros de glucosa y hay un único enzima implicado en su síntesis. Los heteropolisacáridos, en cambio, están constituidos por dos o más tipos de monosacáridos, glucosa, galactosa y ramnosa y de forma poco abundante, fucosa y manosa, además, pueden llevar unidos otras moléculas y en su síntesis y polimerización están implicados varios enzimas; pueden ser producidos por las especies de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus casei*, *L. sake*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus* y *Streptococcus thermophilus* (Zamudio, 2005).

La producción de EPS está estrechamente ligada a la disponibilidad de la fuente de carbono: carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, etc. Generalmente, el material hidrocarbonado habitual son los azúcares, aunque la limitación de otros nutrientes como los compuestos nitrogenados, el fósforo y el azufre, afecta notablemente su producción. En cuanto a la temperatura, los valores comprendidos entre 10 y 28 °C, la producción de EPS por las BAL es el óptimo, de hecho, algunas cepas son más filantes a temperaturas inferiores a su óptimo decrecimiento. El pH es un factor clave para el desarrollo de EPS, por la estrecha relación que existe entre el crecimiento de las BAL y la acidez del medio. En general, se puede considerar que para valores de pH inferiores a 3.5 la alteración está prácticamente inhibida, incluso hasta 3.7 ya que puede existir una seria limitación de su desarrollo, por encima de este valor la producción se potencia notablemente (Mangas, 1997).

2.3.2.1 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* (hasta 1984 conocido como *Lactobacillus bulgaricus*) es una de las bacterias utilizadas para la producción de yogur. También se encuentra en otros productos fermentados de manera natural. Fue identificado por primera vez en 1905 por el médico búlgaro Stamen Grigorov (Salome, 2008). Es considerado como un microorganismo acidófilo, ya que requiere de un pH bajo (alrededor de 5.4 a 4.6) para crecer es termófilo ya que, su temperatura óptima de crecimiento es de 40-45°C (Ralph, 1998).

Esta especie se ha reportado como bacilos largos, aislados y en cortos filamentos; aparecen con frecuencia en forma de espiral alrededor de las colonias en los cultivos en el suero (Figura 2). Presenta un buen poder proteolítico por lo que tiene un rol muy importante para la maduración de los quesos (Botazzi, 1999).

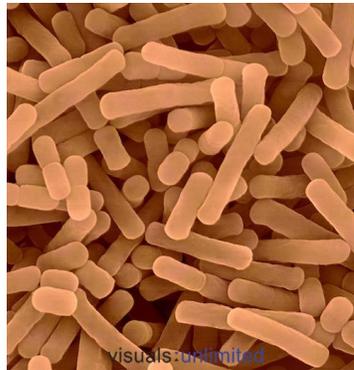


Figura 2. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.
(Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Visuals Unlimited, Inc.)

El análisis estructural del EPS de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772, demostró que cuando el medio de cultivo contenía fructosa el EPS estaba constituido por unidades repetidas de glucosa y galactosa a diferencia de cuando crece en un cultivo mixto de fructosa y glucosa, donde se producen con subunidades de glucosa galactosa y ramnosa (Welman y Maddox, 2003).

El exopolisacárido que produce *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 juega un rol importante en las propiedades de productos fermentados, sobre todo porque la producción de polisacáridos garantiza una mayor viscosidad y una mejor textura por la disminución de la sinéresis en la elaboración de yogurt. También condiciona la

estructura y regula su rendimiento en peso, por la capacidad de ligar agua del ESP. Esta bacteria se utiliza principalmente en yogurt, pero también en la elaboración de algunos quesos como el Mozzarella (Perry *et al.*, 1997).

2.3.3 Sistema proteolítico de las bacterias lácticas

Las bacterias ácido lácticas tienen un complejo sistema proteolítico capaz de convertir la caseína de la leche a aminoácidos libres y péptidos, necesarios para su crecimiento y producción de ácido láctico. El sistema proteolítico está compuesto por proteinasas localizadas en la pared celular, que permiten la degradación de caseínas a oligopéptidos. Adicionalmente existe un sistema de transporte de péptidos que permite el paso de estos al interior de la célula. Finalmente las peptidasas intracelulares hidrolizan los oligopéptidos en péptidos o en aminoácidos, para ser utilizados por la célula (Law y Haandrikman, 1997).

Las especies de bacterias lácticas difieren en su capacidad para hidrolizar proteínas, debido a la variación en su especificidad y a la organización de su sistema de enzimas proteolíticas.

Normalmente, los bacilos termófilos con forma de bastón, presentan una actividad proteolítica superior a la de los cocos mesófilos y termófilos (Walstra, 2001)

Las enzimas que secretan las BAL pueden clasificarse en:

- *Enzimas proteolíticas*: endopeptidasas (o proteasas), que hidrolizan las proteínas liberando péptidos y las exopeptidasas (aminopeptidasas, dipeptidasas), que rompen los péptidos para originar aminoácidos.
- *Enzimas activas sobre aminoácidos* (decarboxilasas, desaminasas, transaminasas, desmetilasas). Modifican o descomponen los aminoácidos liberados por las exopeptidasas.

En la figura 3 se presenta la ubicación de enzimas involucradas en la digestión de proteínas de la leche por las bacterias ácido lácticas.

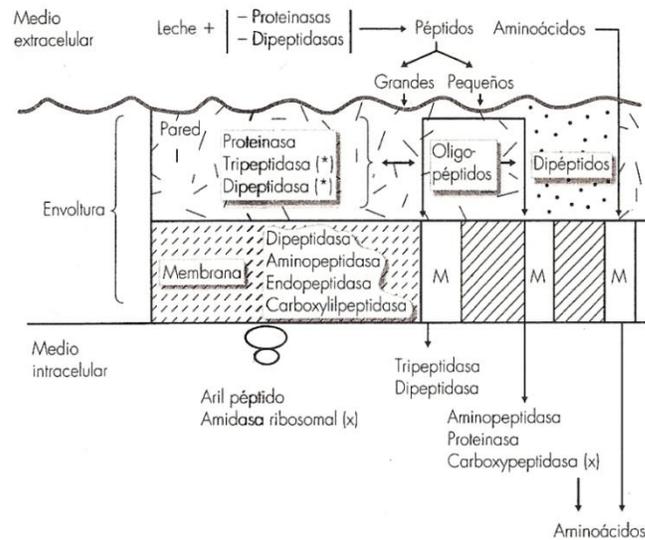


Figura 3. Enzimas involucradas en la digestión de proteínas por las BAL. (Villegas, 2004).

2.4 Quesos

El queso es el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, que resulta de la coagulación de la leche natural (entera), de la desnatada total o parcialmente, de la nata, del suero de mantequilla, o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, seguida del desuerado del coágulo obtenido. Este coágulo, llamado cuajada, está esencialmente constituido de un gel de caseína que retiene la materia grasa y una parte más o menos importante de la parte acuosa de la leche, el lactosuero y en el que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche. La cuajada puede ser consumida como tal bajo la categoría de queso fresco o sufrir una maduración que la llevará a una serie de transformaciones especialmente enzimáticas, que la hacen adquirir caracteres organolépticos específicos, constituyendo el queso maduro (Chamorro y Losada, 2002). Desde el punto de vista nutricional, se considera que posee gran valor

alimenticio por su contenido de proteínas, grasas, calcio, fósforo y vitaminas (Alais, 1998).

El agua que queda retenida en el queso desempeña un papel muy importante, es esencial para el desarrollo de los microorganismos y determina la velocidad de las fermentaciones y de la maduración, el tiempo de conservación, la textura del queso y el rendimiento. La materia grasa influye en la textura, el sabor, el rendimiento y en el color. La lactosa es el sustrato para la formación de ácido y por lo tanto, interviene en la coagulación de la leche, el desuerado y la textura de la cuajada y también en el crecimiento de microorganismos. La caseína coagulada constituye la base de la pasta quesera y durante su degradación se originan compuestos aromáticos. Las proteínas del suero que quedan incluidas en la cuajada contribuyen al valor nutritivo del queso y tienen mucha importancia en el proceso de maduración. Los minerales participan en la coagulación de la leche e influyen sobre el desuerado y la textura del queso (Amiot, 1991).

Se conocen en el mundo más de 2 mil tipos de quesos; sin embargo, en realidad, hay menos de 50 tipos diferentes. Una clasificación muy general se fundamenta en si los quesos, han sido sometidos o no a un proceso de fermentación (maduración) con microorganismos.

2.4.1 Cultivos iniciadores en la maduración

La función principal de las bacterias lácticas (cultivos iniciadores) es la producción de ácido láctico a partir de la lactosa. El ácido láctico promueve la formación y el desuerado de la cuajada, además evita que crezcan en ella microorganismos patógenos debido a que disminuye el pH a 5,0-4,2 y le confiere sabor ácido.

Los cultivos iniciadores también dan lugar a las sustancias responsables del aroma y contribuyen a la maduración mediante la proteólisis (ruptura de proteínas) y la lipólisis (ruptura de las grasas).

El cultivo iniciador que se utiliza depende del tipo de queso que se va a elaborar. Si el queso es de pasta blanda se usan cultivos de acidificación rápida, como *Lactococcus lactis*, subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis*, subsp. *cremoris*. Para obtener quesos de

pasta dura y firme, se utilizan cultivos con buena capacidad proteolítica y lenta producción de ácido, como es el caso de *Lactobacillus casei* y *Leuconostoc citrovorum*.

Para otras variedades de quesos se inoculan otros microorganismos:

- Mohos: se adicionan en quesos madurados superficialmente (*Penicillium camemberti*) y en los de pasta azul (*Penicillium roqueforti*).
- Bacterias propiónicas: son productoras de ácido propiónico y CO₂, son responsables de la formación de “ojos” en quesos como el Gruyère.

Por otro lado se ha evaluado la sobrevivencia de bacterias probióticas con cultivos iniciadores durante la elaboración de quesos madurados y semimadurados como es el caso de queso Cheddar (Folkertsma *et al.*, 1996; Phillips *et al.*, 2006; Ong y Shah, 2009), queso Gouda (Gomes, Malcata, Klaver, 1995), queso Festivo (Ryhanen *et al.*, 2001), queso Pategrás Argentino (Bergamini *et al.*, 2009). Estos estudios han demostrado que los quesos tienen gran potencial de ser un transportador de bacterias probióticas al consumidor. El alto contenido de grasa, el pH, y la matriz sólida del queso, podrían proteger a la bacteria eficientemente durante el almacenamiento y su tránsito a través del tracto intestinal (Bergamini *et al.*, 2006). La mayoría de las publicaciones referentes a la incorporación de bacterias probióticas en los quesos se han centrado sólo en su viabilidad durante la fabricación y almacenamiento y sólo unos pocos estudios han evaluado la viabilidad de los probióticos durante la maduración del queso.

Varios estudios han mostrado la baja supervivencia de los microorganismos probióticos durante la maduración del queso o sus efectos adversos en el sabor, pero la adición de los probióticos como complementos junto con un cultivo iniciador tuvo éxito en la elaboración de algunos quesos madurados (Phillips *et al.*, 2006; Poveda, 2003; Lynch *et al.*, 1997). Además de la adición de los probióticos como cultivo secundario o complementario se han explorado diferentes alternativas para mejorar la supervivencia de los microorganismos probióticos, como es la microencapsulación y la aplicación de factores estimulantes de crecimiento (Farnworth, 2008).

2.4.2 Actividad proteolítica durante la maduración

La proteólisis es el fenómeno bioquímico más importante que tiene lugar durante la maduración de las variedades de queso, ya que no solo tiene implicaciones en el sabor, sino también en su aspecto y textura. Debido a la degradación parcial de las proteínas en productos solubles más simples (Ralph, 1998). Los agentes proteolíticos son enzimas procedentes de: 1) el cuajo o el coagulante utilizado (fundamentalmente quimosina, también puede ser pepsina o proteinasas fúngicas); 2) la leche (generalmente plasmina y quizás catepsina D y otras proteinasas de células somáticas), 3) los cultivos iniciadoras, 4) la flora ocasional, 5) el cultivo secundario (en algunas variedades de queso), como *Penicillium roqueforti*, *P. camemberti*, *Brevibacterium linens*, y algunas especies de lactobacilos y 6) las proteinasas exógenas, adicionadas para acelerar la maduración o acentuar el sabor (Poveda, 2012). Todos estos agentes explican la diversidad de productos que se acumulan en la pasta de un queso durante la maduración: proteosas, péptidos, aminoácidos, aminos, amoníaco, sulfuro de hidrógeno, ácidos volátiles, aldehídos, cetonas, etc. (Ralph, 1998).

La velocidad de la proteólisis depende de factores como:

- a) La temperatura. La solubilización de la caseína es lenta hacia 0 °C, pero continúa y es dos veces más intensa a 21 °C que a 0 °C. Folkertsma *et al.* (1996) reportaron que es posible acelerar la maduración por el incremento de la proteólisis en el queso Cheddar usando temperaturas elevadas de maduración.
- b) La velocidad de solubilización de la caseína es más rápida al principio de la maduración que al final.
- c) En los quesos con humedad baja, como la de los quesos prensados, la maduración es lenta. Cuanto mayor es la humedad de un queso fresco, más rápida es la proteólisis, a una temperatura dada. El revestimiento del queso con una capa impermeable favorece su maduración (Keating, 2013).
- d) La caseína se degrada más rápido en los quesos descremados que en los quesos grasos.

- e) A mayor dosis de cuajo, más pronunciada es la solubilización de la caseína.
- f) El contenido de sal retrasa la proteólisis
- g) La proteólisis se retrasa en un medio muy ácido, por debajo de pH 5.5. (Alais, 1998).

Durante la maduración las bacterias lácticas son capaces de liberar péptidos de bajo peso molecular que se encuentran encriptados en la estructura primaria de las proteínas de la leche. Muchos de estos fragmentos además de conferir sabores específicos tienen actividades biológicas que determinan respuestas fisiológicas en el organismo humano.

En los últimos años ha habido mucho interés en la identificación de los péptidos producidos por la proteólisis en los quesos, y su relación con la acción de proteasas específicas de las bacterias lácticas. Varios estudios han reflejado la presencia de péptidos con actividades biológicas en quesos (Gouldsworthy *et al.*, 1996; Ryhanen *et al.*, 2001; Pritchard *et al.*, 2010). Entre los diferentes tipos de péptidos bioactivos se encuentran los antitrombóticos, inmunoestimuladores, opiodes, antimicrobianos y los antihipertensivos (Saito *et al.*, 2000; Gómez-Ruiz *et al.*, 2004; Ong y Shah, 2008; Gómez-Ruiz *et al.*, 2002). Los péptidos antihipertensivos o péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) han sido ampliamente estudiados debido a la búsqueda de alternativas que ayuden a disminuir los numerosos casos de hipertensión arterial, la cual es considerada una de las enfermedades crónicas más serias. Estos estudios muestran que la actividad inhibitoria de la ECA a lo largo de la maduración de los quesos se incrementa, porque se ha demostrado que existe una relación con el grado de proteólisis. Ryhanen *et al.* (2001) demostraron que la actividad inhibitoria de la ECA se incrementó durante la maduración de un queso Festivo y disminuyó cuando la proteólisis excedió un cierto nivel. Gómez-Ruiz *et al.* (2002) estudiaron los péptidos con actividad inhibitoria de la ECA en queso Manchego y encontraron que la actividad disminuyó en los primeros 4 meses y hubo una actividad máxima a los 8 meses y con una nueva disminución a los 12 meses.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Durante el proceso de maduración del queso semimadurado a diferentes temperaturas, existen diferencias en la viabilidad y la actividad proteolítica de *Lactobacillus rhamnosus* GG influenciadas por la presencia de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772.

3.2 Objetivo general

- Estudiar el comportamiento de *Lactobacillus rhamnosus* GG en un queso semimadurado al combinarlo con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 para determinar el efecto del cultivo iniciador sobre la actividad proteolítica y la viabilidad del probiótico.

3.3 Objetivos específicos

- Elaborar un queso inoculado con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 y *Lactobacillus rhamnosus* GG.
- Determinar la viabilidad de la bacteria probiótica durante la maduración del queso por 4 semanas.
- Mediante microscopía electrónica de barrido observar la interacción de *L. rhamnosus* GG con los diferentes componentes del queso en presencia de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772.
- Cuantificar la producción de péptidos durante la maduración del queso.
- Estudiar el perfil proteolítico del queso durante la maduración.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

La fase experimental se llevó a cabo en el Centro de Investigación del Área Académica de Química en Alimentos, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, ubicada en las instalaciones del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería (ICBI).

4.1 Preparación del cultivo madre

Se trabajó con dos cepas: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 y *Lactobacillus rhamnosus* GG. Proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología Alimentaria del departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Para la preparación del cultivo madre, los microorganismos se propagaron en caldo MRS (Difco™). Se tomó una asada de cultivo puro y se inoculó en un tubo de ensayo que contenía 10 mL del caldo MRS. *L. rhamnosus* GG se incubó a 37 °C y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 a 42 °C por 24 h. Al final se realizó tinción de Gram para comprobar la pureza del inoculó.

Los microorganismos se propagaron en tubos con 10 mL de leche descremada (Svelty, Nestlé®) al 10 %. La leche se pasteurizó a 90 °C por 10 min. Se tomó una asada de los tubos de MRS (Difco™) y se inoculó en la solución de leche descremada al 10 %. Las condiciones de incubación fueron las mismas que las utilizadas para el cultivo madre y se realizó tinción de Gram al final de la incubación. Debido a que se tenía que inocular 1×10^9 UFC/mL se realizó la cuenta total de microorganismos. Se prepararon tubos de agua peptonada (Difco™) y cajas con 15 mL de agar MRS (Difco™). Todos los medios de cultivo se prepararon según instrucciones del fabricante. Para preparar las diluciones, se tomó 1 mL de los tubos de leche con cultivo propagado y se colocó en 9 mL con agua peptonada (Difco™). De este tubo se hicieron diluciones sucesivas hasta 1×10^{-9} . Se colocaron 0.1 mL de cada tubo en

una caja de Petri, y se extendieron con varilla de vidrio estéril. Las cajas de Petri se incubaron de manera invertida, de acuerdo a las condiciones dadas en la primera propagación. Al final de la incubación se realizó la cuenta viable.

Finalmente, se prepararon 600 mL de una solución de leche (Svelty, Nestlé®) al 10 % en dos matraces Erlenmeyer de 1 L, un matraz para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 y un matraz para *L. rhamnosus* GG y 100 mL de solución de leche para un matraz con *L. rhamnosus* GG. Los matraces la leche se pasteurizaron a 90 °C por 10 min. Cada matraz se inoculó con 1×10^9 UFC/mL del microorganismo correspondiente. Los matraces se incubaron en las mismas condiciones de tiempo y temperatura que en la propagación. Al final de la incubación se comprobó la pureza de los cultivos madre por tinción de Gram. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 4 °C, hasta su utilización (Figura 4).



Figura 4. Cultivos de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772

4.2 Elaboración de queso tipo manchego

Los quesos se elaboraron en el taller de lácteos del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Se adquirieron 70 L de leche pasteurizada de la empresa PROUNILAC, perteneciente a la UAEH. Se realizó el análisis fisicoquímico (grasa, proteína, temperatura, pH y

conductividad) de la leche por medio de un analizador de leche (Lactoscan MCC). De acuerdo al análisis, la leche se estandarizó a un 3.6 % de grasa por medio de una descremadora (Elecrem 315L). Después de la estandarización se separaron 60 L de leche para inocular al 1 % con cada cultivo de *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 y 10 L de leche se inocularon al 1 % únicamente con la bacteria probiótica. La leche se llevó a 36 °C antes de la adición de los respectivos cultivos. Para llevar a cabo la premaduración, se mantuvo la temperatura de 36 °C a 37 °C, durante aproximadamente 30 a 40 min hasta llegar a 18.5 °D. Cuando se alcanzó la acidez requerida se agregó 7.2 % (v/v) de cuajo (Fromase fuerza 1:10000) y 1.2 % (p/v) de cloruro de calcio. Se dejó en reposo durante 1 h para permitir la floculación total de las caseínas. Al término de este tiempo se cortó la cuajada con liras de 1 cm. Se agitó constantemente sin calor durante 40 min para estimular la salida de suero y alcanzar 11.5 °D. Cuando se alcanzó la acidez de esta etapa, se desueró la cuajada y se depositó en moldes de 1 kg revestidos con tela de manta. Las unidades de queso se prensaron (peso promedio de 3 kg/cm²) durante 2 h y se voltearon para continuar el prensado en las mismas condiciones durante 24 h más. Al término del prensado los quesos se desmoldaron y se envasaron a vacío (MultivacC100) y se almacenaron durante cuatro semanas de la siguiente forma, dos quesos inoculados con los dos microorganismos y dos quesos inoculados con el probiótico solo a 4 °C y la misma cantidad de quesos a 14 °C. En la figura 5 se muestran 4 fotos que permiten ver diferentes etapas durante la elaboración del queso.



Figura 5.Diferentes etapas durante la elaboración del queso tipo manchego.

4.3 Muestreo

Se tomaron muestras al día 0, 7, 14, 21 y 28, en condiciones estériles y cada análisis se realizó por duplicado. Para la determinación de cuenta viable se tomaron 10 g de queso y se colocaron en bolsas estériles para muestras microbiológicas. Para cuantificar los grupos amino libre y el estudio del perfil proteolítico se tomaron 20 g de queso y se colocaron en frascos de muestreo (Figura 6). Al final de cada muestreo los quesos se envasaron de nuevo a vacío y se regresaron a las condiciones de almacenado.



Figura 6. Toma de muestra de forma aséptica.

4.4 Determinación de viabilidad

Se adicionaron 9 mL de agua peptona (Difco™) al 1 % estéril a la muestra a temperatura ambiente. Se homogenizó en un stomacher (Stomacher® 400 circulator Seward) durante 3 min hasta que se obtuvo una suspensión completa y homogénea. Se diluyó 1 mL de la mezcla homogénea en un tubo con 9 mL de agua peptonada y se realizaron las diluciones subsecuentes hasta una dilución final de 1×10^{-6} . Se tomaron 100 μ L de cada dilución y se depositaron en cajas de Petri con agar MRS (Difco™)

ajustado a un pH 5.20 con ácido acético 0.1 N, para que solo creciera *Lactobacillus rhamnosus* GG. Se incubaron las cajas a 37 °C, en condiciones anaerobias durante 72 h. Se realizó el recuento en placa para cada prueba y se realizaron los cálculos correspondientes.

4.5 Microscopía electrónica de barrido

Para observar la presencia del exopolisacárido producido por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCBF 2772 y su interacción con el probiótico, se utilizó esta técnica.

La preparación y análisis de las muestras se realizaron en el laboratorio de microscopía electrónica de barrido de la UAM-I, con la ayuda del Dr. José Sepúlveda, se utilizó el equipo Scanning Electron Microscope JEOL JSM-5900LV. Se realizó en base al siguiente procedimiento:

Primero se llevó a cabo la fijación de la muestra, se tomó una pequeña fracción de la orilla y centro, de cada queso inoculado con *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 y del queso inoculado sólo con el probiótico. Las muestras se colocaron en un frasco que contenía glutaraldehído al 3 %, durante 36 h a 4 °C. Posteriormente se realizaron 3 lavados cada 10 min con amortiguador de fosfatos 0.2 M. Enseguida se colocaron las muestras en tetra óxido de osmio al 1 %, para llevar a cabo un proceso de post-fijación durante 1 h a 4 °C. Pasado este tiempo se deshidrataron las muestras con alcohol etílico a diferentes porcentajes (30 %, 40 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 %), realizando dos lavados cada 15 min con cada una de las soluciones durante el periodo de cambio. Se colocaron las muestras en cajas microporosas y se procedió a secar a punto crítico (PO 1040 lb/in², 31 °C) (Sambri 780-B, Sample Drying at the critical Point Tousimis Research corporation, Japan) usando dióxido de carbono como medio de transición. Finalmente la muestra fue cubierta con una capa de oro para darle propiedades conductoras y se observó al microscopio.

4.6 Estudio del perfil proteolítico

Para caracterizar el perfil proteolítico del queso durante la maduración se realizaron tres estudios diferentes. El primer estudio fue la determinación de grupos amino libres con la finalidad de conocer la concentración de los péptidos producidos por la técnica de TNBS. El segundo estudio consistió en la separación de péptidos por peso molecular por medio de la electroforesis en gel de poliacrilamida. Finalmente, con el objetivo de observar los cambios en la concentración de las fracciones peptídicas durante la maduración del queso, se realizó un análisis por HPLC con una columna de exclusión.

4.6.1 Preparación de las muestras

Para realizar los análisis de perfil proteolítico las muestras se prepararon de la siguiente manera:

- Se agregaron 50 mL de agua desionizada a cada muestra y se homogenizaron en el stomacher (Stomacher ® 400 circulator Seward) a 260 rpm durante 3 min.
- Se colocaron 10 mL de la muestra homogenizada en tubos de centrifuga. Se colocaron en una centrifuga (HERMLE Labnet Z323K) a 5,000 rpm durante 5 min a 4 °C. Posteriormente se filtraron en papel Whatman no. 4 a vacío y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 5,000 rpm, durante 10 min a 4 °C.
- Los sobrenadantes se almacenaron en tubos de ensayo a -18 °C, hasta su utilización.



Figura 7. Preparación de muestras para análisis de perfil proteolítico.
a) Tubo con la muestra centrifugada, b) centrifuga utilizada, c) equipo de filtración de la muestra.

4.6.2 Cuantificación de grupos amino libres

Para la cuantificación de los grupos amino libres se utilizó la técnica del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) propuesta por Adler en 1979, se basa en la reacción del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) con las aminas primarias en condiciones ligeramente alcalinas (pH 8.2) (Guadix *et al.*, 2010) Esta técnica mide grupos amino libres en hidrolizados proteicos. La reacción que se lleva a cabo se muestra en la figura 8.

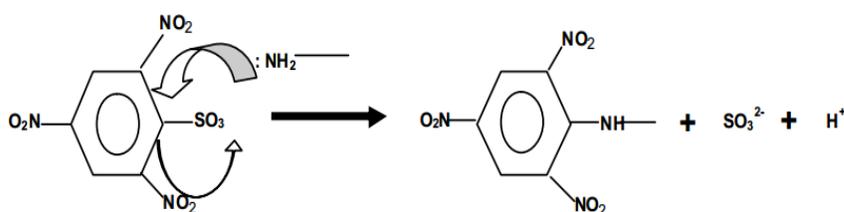


Figura 8. Reacción de TNBS con los grupos amino libres.

El análisis se llevó a cabo con el siguiente procedimiento:

- Se agregó 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.2125 M pH 8.2 en tubos de ensayo forrados con papel aluminio.
- Se agregó a cada tubo 125 μ L de muestra. En caso del tubo blanco en lugar de muestra se agregó agua desionizada.
- Se agregó 1 ml de TNBS al 0.10 % en amortiguador de fosfatos 0.2125 M pH 8.2 (la preparación de esta solución se llevó a cabo justo antes de realizar la prueba en la oscuridad) y se agitó cada tubo en vórtex.
- Se incubó la mezcla en una incubadora (BOEKEL SCIENTIFIC MODEL 132000) durante 1 h a 50 °C en la oscuridad.
- Se paró la reacción adicionando a cada tubo 2 mL de ácido clorhídrico 0.1N y se agitaron en vórtex.
- Se leyó en un espectrofotómetro (THERMO SCIENTIFIC, GENESYS™ 10 VIS) a 340 nm de longitud de onda contra el blanco. Se usaron celdas de cuarzo.

Para calcular la concentración se realizó una curva patrón partiendo de una solución de glicina 3mM con 1% de SDS. Se realizaron diferentes disoluciones a 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25 mg/mL. La curva patrón se muestra en el apartado 9.3.1. La ecuación de la recta utilizada para medir la concentración de las muestras fue la siguiente:

$$y = 4.278x - 0.2275$$

$$R^2 = 0.9615$$

La preparación de las soluciones usadas para esta técnica se encuentra en el apéndice 9.1.1.

4.6.3 Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis es una técnica de separación basada en la migración de las moléculas cargadas en un campo eléctrico. Las moléculas se separan en función de su carga eléctrica, desplazándose al electrodo de carga contraria y a mayor velocidad cuanto mayor es la carga de la molécula (Lodish *et al.*, 2005). Una de las técnicas más utilizadas en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés), es la que se lleva a cabo en presencia del detergente duodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE), para analizar mezclas de proteínas. En la electroforesis SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente (Lomonte, 2009). La separación está en función del tamaño, lo que permite determinar el peso molecular de las proteínas. La técnica se llevó a cabo de la siguiente manera:

Preparación del gel de separación: En un matraz Kitazato de 50 mL se colocaron 4.16 mL de la solución stock de acrilamida al 30 %, 5.84 mL de buffer Tris-HCl 1.5 M pH de 8.8 y 160 µL de SDS al 10 %, para elaborar un gel de separación de 12.5 % de T. La mezcla se desgasificó durante 15 min con agitación suave, conectando el matraz a una bomba de vacío. Enseguida se adicionaron 50 µL de una solución de persulfato de amonio al 10 % en buffer Tris-HCl pH 8.8 (preparada al momento de terminar el proceso de desgasificación) y 5 µL de TEMED. La mezcla se agitó

suavemente para homogenizar la solución. Inmediatamente se depositó la solución hasta 3/5 partes de los cristales para electroforesis con un separador de 0.7 mm (BIORAD®). Se introdujeron 2 ml de agua desionizada para evitar que el gel se secase. Se dejaron solidificar durante 3 h.

Preparación del gel de concentración: Una vez polimerizado el gel de separación, se preparó el gel de concentración a 4 % de T. En un matraz de Kitazato de 50 mL se agregaron 0.53 mL de solución stock de acrilamida al 30 %, 3.47 mL de buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 6.8 y 80 µL de SDS al 10 %. Se desgasificó durante 15 min, con agitación suave, conectando el matraz a una bomba de vacío. Pasado este tiempo se adicionaron 25 µL de persulfato de amonio al 10 % en buffer Tris-HCl pH de 6.8 (preparado al momento de terminar el proceso de desgasificación) y 5 µL de TEMED. Se eliminó el agua depositada sobre el gel previamente polimerizado y se agregaron 2 mL de la solución. Inmediatamente se colocaron los peines para formar los carriles de cada placa. Se dejó polimerizar por 3 h.

Preparación del estándar y de las muestras. Se colocaron 4 µL del estándar de amplio rango (Bio-Rad) en un tubo eppendorf. Se agregaron 20 µL de buffer tris HCl 0.05 M pH 6.8, 20 µL de buffer colorante, 20 µL de agua desionizada y 3 µL de β-mercaptoetanol.

Para la preparación de las muestras se colocaron 40 µL de cada una y se depositaron en tubos eppendorf de 1 mL, se agregaron 20 µL de buffer con colorante y 3 µL de β-mercaptoetanol, el estándar y las muestras se incubaron durante 15 min a ebullición.

Corrida en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se montó el equipo Mini-PROTEAN Tetra cell de BIO-RAD. Una vez concluido el tiempo de polimerización de los geles, se removieron los peines y se montaron los cristales dentro de la cámara donde se llevó a cabo el paso de corriente. Una vez asegurado que no existieran fugas en la cámara, se adicionaron 600 mL de buffer de corrida tris-glicina-SDS pH 8.3 (1x), se inyectaron 15 µL de estándar y de cada una de las muestras previamente preparadas, en cada uno de los carriles. Una vez colocadas las muestras en el gel se inició la corrida a 200 V aproximadamente durante 1 h. Este proceso se llevó a cabo en baño de hielo (Figura 9).

Una vez terminada la corrida, se desmontaron los geles de los cristales y se fijaron las proteínas y péptidos con agitación suave y constante en una solución de ácido acético al 7.5 %, durante 40 min. Se realizó la tinción de los geles con azul de coomassie por 12 h. Se destiñeron los geles con una solución al 7 % de ácido acético y 10 % metanol, en agua desionizada, durante 4 h. Los geles se enjuagaron en agua desionizada con agitación suave y constante por 4 h. Los geles se escanearon y las imágenes se analizaron con el software ImageJ.



Figura 9.Equipo de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra cell, BIO-RAD

La preparación de las soluciones usadas para esta técnica se encuentra en el apéndice 9.1.2.

4.6.4 Caracterización del tamaño de los péptidos mediante HPLC de exclusión molecular

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica (Sierra, 2010). La separación consiste en la mezcla de moléculas (muestra) la cual interacciona con un medio o matriz de soporte que se denomina fase estacionaria, un segundo medio (fase móvil) que es inmisible con la fase estacionaria se hace fluir a través de esta para eluir a las

moléculas de la muestra (Nollet y Toldrá, 2013). La técnica que se siguió fue una técnica adaptada para péptidos de bajo peso molecular (González-Olivares *et al.*, 2011).

Las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 1,000 rpm a 4 °C. Se inyectaron en un equipo HPLC modular (Perkin Elmer, Series 200), con una columna de exclusión molecular (SEPA Technologies, Inc., SRT SEC-150, tamaño de partícula 5µm, tamaño de poro 150 Å, 300 x 7.8 mm). La fase móvil utilizada fue amortiguador de fosfatos pH 6.8. Se inyectaron 20 µL de muestra. La corrida se realizó con un flujo isocrático de 0.25 mL/min durante 70 min a temperatura ambiente (Figura 10). La detección se realizó a 220nm con un detector de arreglo de diodos (Applied Biosystems 1000S).



Figura 10. Equipo para Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

4.7 Análisis estadístico

Los resultados experimentales de sobrevivencia y cuantificación de grupos amino libres de las cepas a distintas temperaturas de almacenamiento y durante diferentes días de experimentación se realizaron por duplicado. Fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA), se hizo la comparación de medias por el método de Tuckey's con un nivel de significancia de 0.05. El programa utilizado para el análisis fue NCSS-2007 (versión: 07-1-15).

CAPÍTULO 5**RESULTADOS Y DISCUSIÓN****5.1 Determinación de viabilidad**

Durante el recuento en placa, con agar MRS ajustado a pH de 5.2 de *L. rhamnosus* GG, se pudo observar que presentó las características morfológicas de colonias para el género de *Lactobacillus* (Figura 11). De acuerdo a lo reportado por Samaniego (2000), las colonias de lactobacilos en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmento. El género se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos.

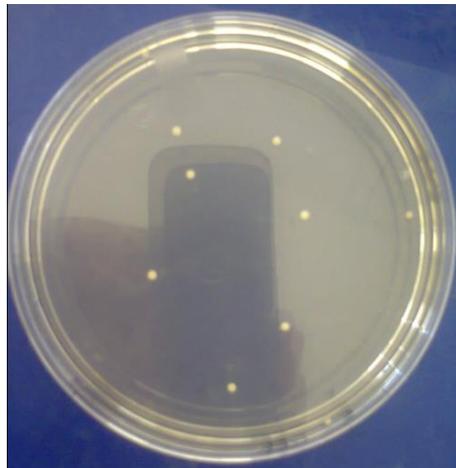


Figura 11. Morfología de las colonias de *L. rhamnosus* GG en agar MRS.

5.1.2 Viabilidad de *L. rhamnosus* GG

En el queso donde sólo se inoculó el probiótico, no hubo crecimiento del microorganismo durante el periodo de maduración del queso, a ninguna de las dos

temperaturas evaluadas. La concentración inicial del probiótico inoculado en el queso fue de 1×10^9 UFC/g. Esta concentración disminuyó en la primera semana en el queso madurado a 4 °C. Bajo estas condiciones de maduración no se observó una diferencia significativa entre las semanas 0, 1 y 3 (Figura 12). El valor inicial en la semana 0 fue de 3.92 log UFC/g y en la semana 3 fue de 1.25 log UFC/g. En el caso del queso madurado a 14 °C, la concentración del probiótico también disminuyó hacia el final del tiempo de maduración (Figura 12). La concentración inoculada de microorganismo fue la misma que para el queso almacenado a 4 °C (1×10^9 UFC/g). La concentración del probiótico en la semana 0 fue de 5.85 log UFC/g, valor que disminuyó de manera significativa al final de la maduración, hasta 5.45 log UFC/g.

Uno de los factores que pueden provocar la muerte de los probióticos en una matriz láctea como el queso, se asocia principalmente a la falta de cultivos iniciadores que estimulen el crecimiento de estos probióticos. Este efecto se debe en parte, a la producción de aminoácidos libres (Farnworth, 2008), por la producción de sabores y aromas durante la maduración que pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular. No obstante, la adición de probióticos junto con cultivos iniciadores en quesos semimadurados, ha tenido éxito (Bergamini, *et al.* 2005).

Por otro lado se ha demostrado que la dosis mínima requerida, para observar un efecto benéfico en el consumo de probióticos en el producto, es de 10^6 a 10^7 UFC/g (Karimi *et al.* 2011). En esta investigación la cuenta viable en el queso con el probiótico *L. rhamnosus* GG al final de la maduración fue de 10^4 UFC/g (Figura 12). Estos resultados son indicativos de la necesidad de mezclar el microorganismo probiótico con un cultivo iniciador para asegurar su viabilidad a niveles superiores de 10^6 UFC/g.

Adicionalmente se ha reportado que la microencapsulación tiene un efecto positivo en la viabilidad de los probióticos durante la maduración (Champagne *et al.*, 2011). Otros estudios se han enfocado a la adición de factores estimulantes de crecimiento, la adición de diferentes cultivos mixtos y la maduración de quesos empacados al vacío (Farnworth, 2008). Todos estos estudios se han llevado a cabo con la finalidad de mejorar las condiciones que permitan a los microorganismos probióticos mantenerse en los niveles requeridos para su consumo.

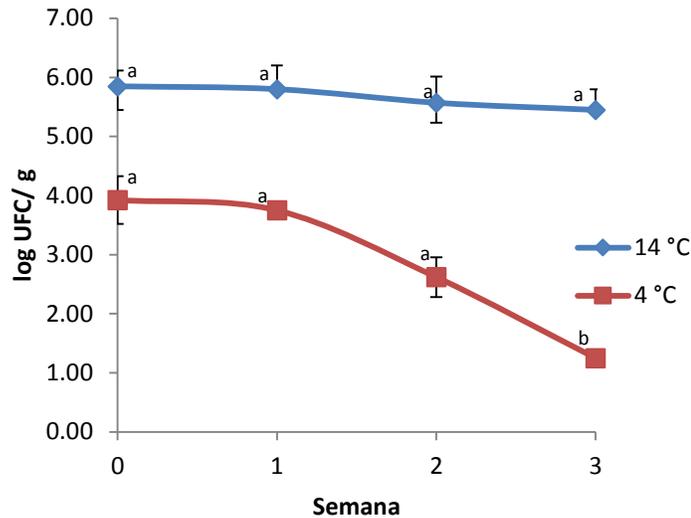


Figura 12. Viabilidad (log UFC/g) de *L. rhamnosus* GG durante la maduración de un queso tipo manchego.

5.1.3 Viabilidad de *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772

L. rhamnosus GG se inoculó a una concentración del 1% (v/v) que fue la misma concentración a la que se inoculó *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. En el sistema de maduración a 4 °C no se encontró diferencia significativa a lo largo de la maduración en la cuenta viable (Figura 13), presentando una concentración inicial de 8.01 log UFC/g y llegando al final de la maduración a un conteo de 7.46 log UFC/g.

En el sistema madurado a 14 °C, no se encontró diferencia significativa, sin embargo si se observó un aumento en la concentración de microorganismos con respecto a la concentración inicial (Figura 13), teniendo al inicio una concentración de 7.78 log UFC/g y una concentración al final de la maduración de 7.96 log UFC/g.

Al hacer una comparación entre la concentración final de microorganismos los quesos madurados a las dos temperaturas se observó que, no hubo diferencia significativa en la concentración de microorganismos. Estos resultados indican que la temperatura de maduración no es un factor determinante en la viabilidad de *L. rhamnosus* GG en

presencia de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. Ong y Shah (2009) reportaron que en un queso Cheddar madurado por 24 semanas a 4 y 8 °C, la temperatura no afectó la viabilidad de los microorganismos probióticos en un cultivo mixto.

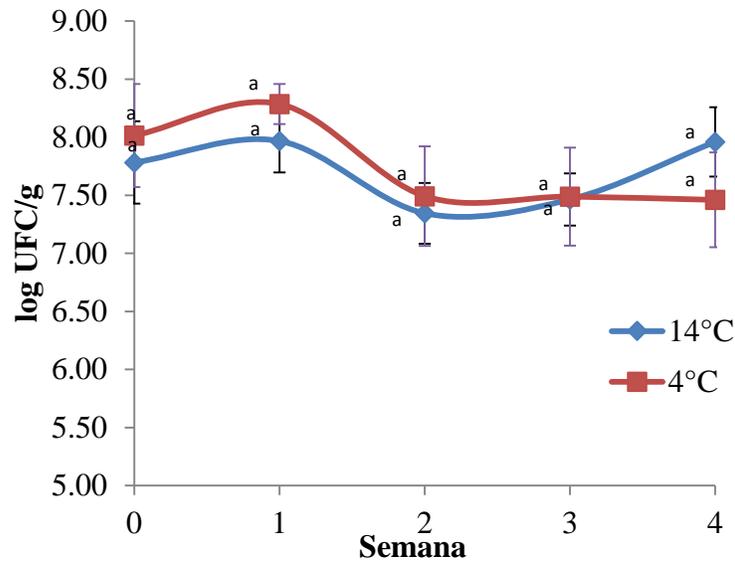


Figura 13. Viabilidad (log UFC/g) de *L. rhamnosus* GG en presencia de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 durante la maduración del queso.

La viabilidad del probiótico cuando no se encuentra mezclado con el cultivo iniciador, puede verse favorecida por otros factores, como la composición del queso y la presencia de otros microorganismos que ejercen un efecto protector. Este efecto protector se puede deber, a su vez, a otros factores derivados de los antes mencionados, como la producción de exopolisacáridos provenientes del cultivo iniciador (cuando el microorganismo lo produzca) y la liberación de factores de crecimiento necesarios para el probiótico (Karimi *et al.*, 2011).

Comparando la viabilidad del queso inoculado solo con el probiótico y el inoculado con ambos microorganismos, se puede observar que hubo una simbiosis en el segundo caso. Esta simbiosis se ejerce ya que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* libera aminoácidos y péptidos que el probiótico necesita para su crecimiento (Farnworth, 2008). Este sistema proto cooperativo es similar al que se encuentra en leches

fermentadas como el yogurt (García-Garibay, 2002). Adicionalmente *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 produce un EPS, el cual está asociado a la superficie de la célula en forma de cápsula y es secretado al medio ambiente en forma de limo. Este EPS favorece la retención de nutrientes, pero no es alimento de la misma célula bacteriana. *L. rhamnosus* GG puede utilizar este EPS como fuente de carbono y nitrógeno para su sobrevivencia (Badel *et al.*, 2011). Se ha visto que a temperaturas entre 10 °C y 25 °C la producción del EPS es mayor (Mangas, 1997), sin embargo, en el presente trabajo durante las dos temperaturas de maduración probadas, se mantuvo viable el probiótico durante todo el periodo, en presencia de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772.

5.2 Análisis de la interacción microorganismo-queso-EPS mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se realizaron múltiples micrografías de los quesos inoculados con *L. rhamnosus* GG (Figura 14, 15 y 16). En estas imágenes se observan los glóbulos de grasa atrapados en la matriz proteica. López *et al.* (2007) observaron la microestructura durante la maduración de un queso Emmental y vieron que en el área interfacial se producen interacciones entre la red de caseína y la grasa, donde revela la presencia de individuales y pequeños glóbulos de grasa, al igual que grandes e irregulares glóbulos de grasa, que se cree que sean glóbulos de grasa dentro de una matriz caseína o la grasa no globular capaz de formar grasa. Estos resultados concuerdan con lo visto en las imágenes 14 y 15. Hassan *et al.* (2004) observaron que en un queso elaborado con un cultivo no productor de EPS, la matriz de caseína que separa las inclusiones de grasa puede formar barreras impermeables que impiden la fusión de la grasa.

Las diferencias en la microestructura se pueden reflejar en la macroestructura de un queso y son percibidas a simple vista, debido a su relación con la composición química del queso y el procedimiento de elaboración (Kalab, 1995). Por ejemplo, los quesos prensados tienen cavidades muy pequeñas y mayor contenido de grasa, mientras que los quesos frescos al contener más agua tienen espacios vacíos más grandes los cuales son observados en el análisis microestructural. En las figuras 14 y

15 se pueden observar cavidades pequeñas ya que los quesos elaborados son quesos prensados semimadurados tipo Manchego.

También se observó la unión de aglomerados de caseína (Figura 14), lo cual podría ser el resultado de la presión aplicada en el queso durante el desuerado. Ali y Robinson (1990) encontraron que la presión durante la elaboración del queso incrementa la unión de los agregados de caseína.

Al realizar un acercamiento de la imagen hasta 2500 x (Figura 15), además de las interacciones, se observaron agregados indeterminados los cuales pueden deberse a fracciones proteicas liberadas de las micelas de caseína y que en un sentido estricto pueden estar interaccionando de manera directa con la membrana del glóbulo de grasa.

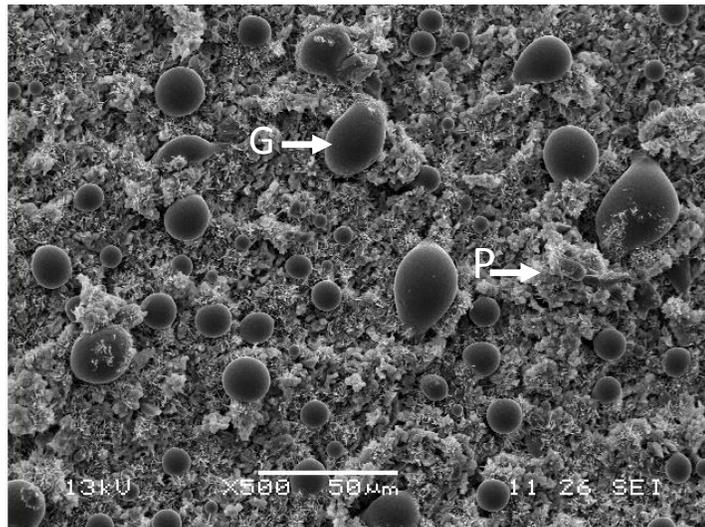


Figura 14. Micrografía del borde del queso inoculado con *L. rhamnosus* GG (500x).
G. Grasa; P. Proteínas.

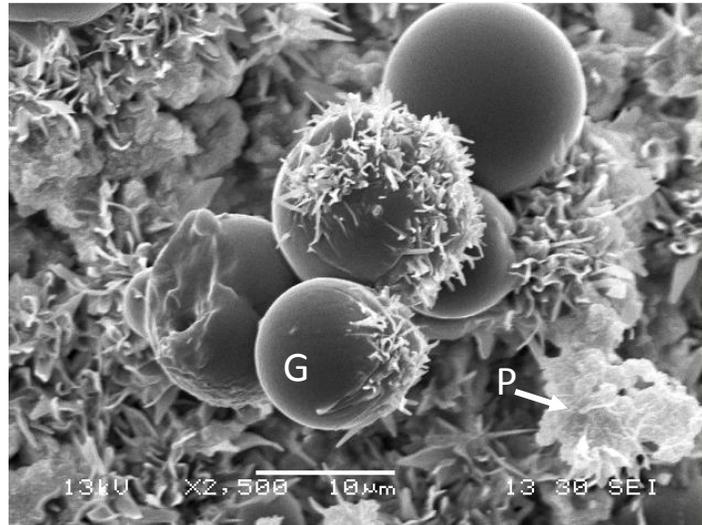


Figura 15 Micrografía del borde del queso inoculado con *L. rhamnosus* GG (2,500x).
G. Grasa; P. Proteínas

En la figura 16 se observa un lactobacilo, el cual puede corresponder a *L. rhamnosus* GG, de acuerdo a la morfología vista por Kostrzynska y Lepp (2011). Estas micrografías no mostraron una alta concentración de lactobacilos en el queso, es decir estos resultados concuerdan con los obtenidos en los análisis de viabilidad.

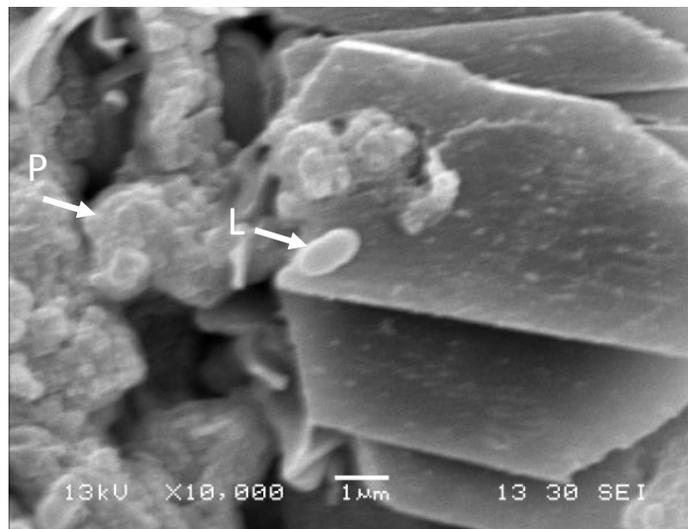


Figura 16. Micrografía del centro del queso inoculado con *L. rhamnosus* GG (10,000x).
P. Proteínas; L. Lactobacilo

Las microfotografías obtenidas por SEM del queso con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 y *L. rhamnosus* GG, se muestran en las figuras 17, 18, 19, 20, 21 y 22.

En la figura 17, se observa la interacción que hay entre las moléculas de grasa dispersadas en la cuajada del queso, rodeado por la matriz proteica.

Los aglomerados de caseína en este sistema, parecen estar mejor fusionados que los observados en el queso inoculado solo con el probiótico. Hassan *et al.* (2002) también observaron que en un queso Feta hecho con un cultivo productor de EPS había grandes aglomerados de caseína que no se encontraban en aquellos donde no había un cultivo productor de EPS. Las características del glóbulo de grasa que se observan en el queso inoculado con ambos microorganismos, reflejaron mayor concentración de los glóbulos que en el queso inoculado con el probiótico.

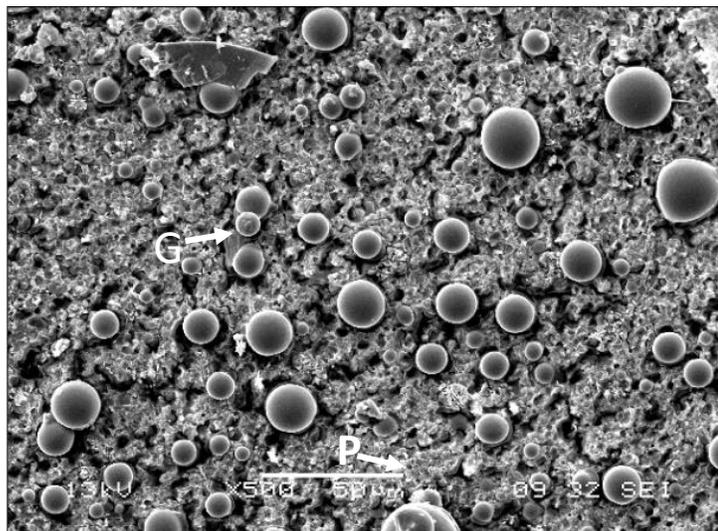


Figura 17. Micrografía del centro del queso (500x) con *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. G. Grasa; P. Proteínas.

En la figura 18 se puede observar un lactobacilo que podría corresponder a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772, ya que de acuerdo a lo visto por Kunkel (2012) y Botazzi (1999), son bacilos largos y aislados; generalmente no se encuentran como agregados.

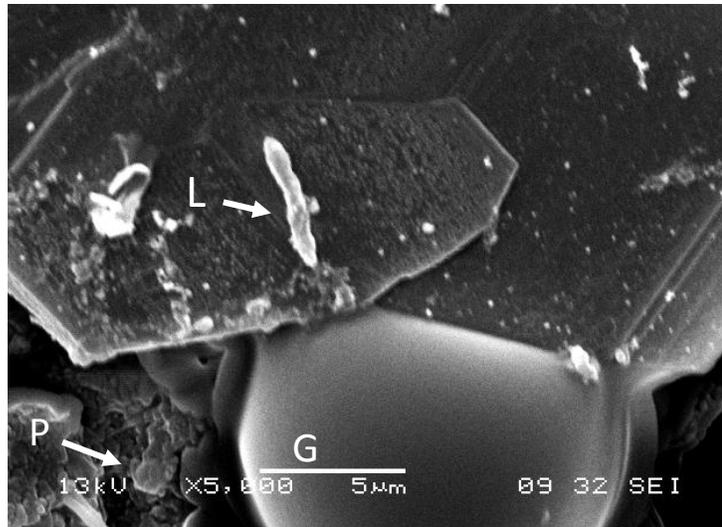


Figura 18. Micrografía del centro del queso (5,000x) con *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. L. Lactobacillus; P. Proteínas; G. Grasa.

Se observó que el exopolisacárido producido por la cepa filante se encontraba interaccionando con la matriz proteica del queso (Figura 19). Hassan *et al.* (2003), reportaron que los EPS pueden permanecer unidos a la célula en forma de cápsula o pueden ser secretados en forma de limo. Algunas cepas producen ambas formas de EPS y otras solo lo secretan, sin embargo hay pocos estudios donde se pueda observar el tipo capsular de EPS. Esto último es debido a que la observación de la cápsula bacteriana por microscopía electrónica de barrido es difícil, porque la luz evapora el agua. Hassan *et al.* (1995) utilizaron microscopía electrónica láser confocal de exploración, lo cual permitió la observación de células bacterianas hidratadas y el EPS capsular producido.

Los EPS incrementan la retención de humedad por enlaces con el agua o por atrapamiento de su red tridimensional (Hassan, 2008). En las observaciones en microscopía electrónica de barrido las interacciones entre los componentes con el agua generaron espacios vacíos al evaporarse durante la preparación de las muestras (Figura 17 y 19). Guzel-Seydim *et al.* (2005) reportaron que los EPS se unen fuertemente al agua dentro de la matriz del queso filante y la retienen por más tiempo que en el queso sin cultivo filante.

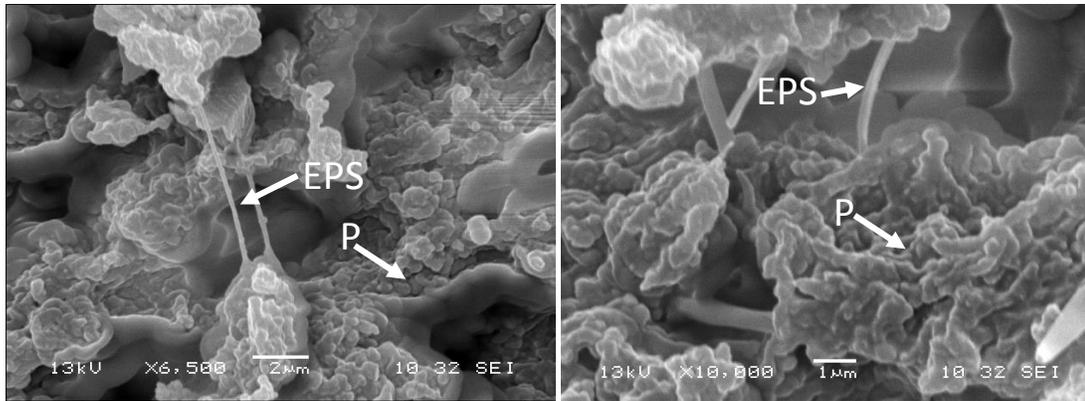


Figura 19. Micrografía del borde del queso (6,500x y 10,000x) con *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. P. Proteínas; EPS. Exopolisacárido.

En la matriz del queso pudimos observar lactococos, provenientes de la leche bronca resistentes a la pasteurización o bien su presencia pudo deberse a que hubo contaminación durante la elaboración. Ya que la leche nativa contiene una gran diversidad de microflora (Figura 20).

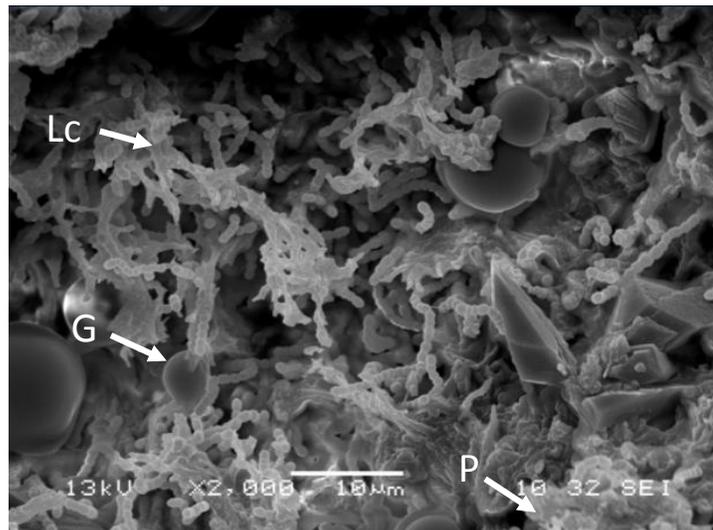


Figura 20. Micrografía del borde del queso (2,000x) con *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. P. Proteínas; G. Grasa; L. Lactococos

Se localizaron los lactobacilos sobre la matriz proteica del queso (Figura 21) y sobre un glóbulo de grasa (Figura 22). Kalab (1993) y Hassan *et al.* (1995) usaron microscopia electrónica de barrido y observaron que la matriz proteica del yogurt consiste en micelas de caseína, interconectadas donde la fase líquida y las BAL son

inmovilizadas en la fase intersticial. Además se observó que las cepas filantes se convierten en parte de la microestructura, por las conexiones que se producen entre la superficie bacteriana y la matriz que rodea el EPS. Esta información concuerda con lo observado en la figura 21, donde los lactobacilos, están inmovilizados en la matriz proteica, que de acuerdo a la morfología, aparentemente, son del género *L. rhamnosus* GG.

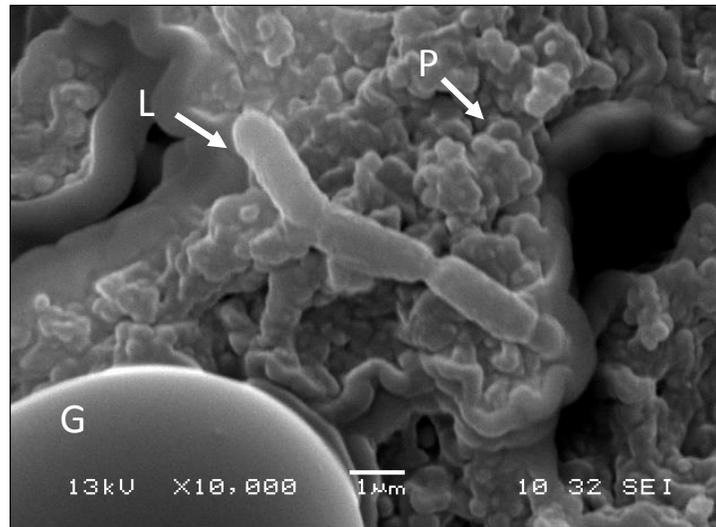


Figura 21. Micrografía del borde del queso (10,000x) con *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. P. Proteínas; G. Grasa; L. Lactobacillus

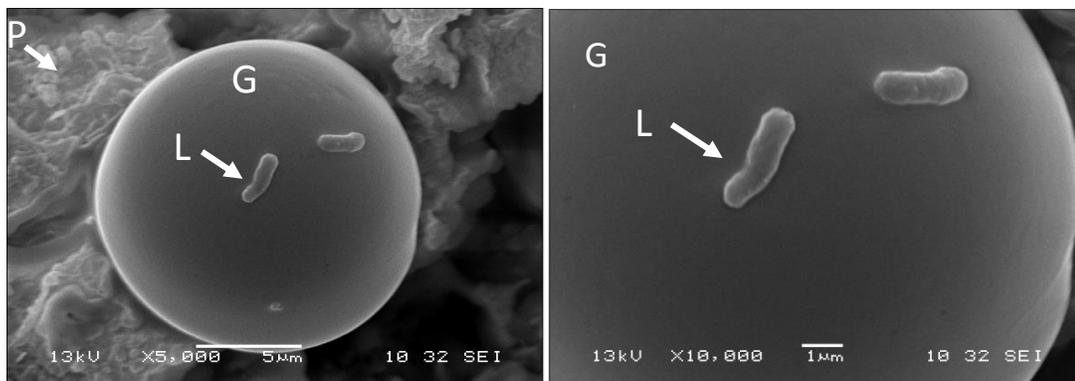


Figura 22. Micrografía del borde del queso (5,000x y 10,000x) con *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. P. Proteínas; G. Grasa; L. Lactobacillus

5.3 Cuantificación del grado de hidrólisis por el método de TNBS

Este estudio fue hecho solo con los quesos inoculados con *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772

La determinación de la concentración de grupos amino libre, para cada uno de las muestras analizadas durante la maduración del queso, a 4 °C y a 14 °C, se realizó por el método de TNBS (Figura 23). Se observó que en el día 0 en ambas temperaturas de maduración hay presencia de grupos amino libre, 0.271 ± 0.005 mg/L para el sistema a 4 °C y 0.339 ± 0.046 mg/L para el sistema a 14 °C.

La presencia de grupos amino libres al inicio del estudio, puede atribuirse al proceso de premaduración. Durante este proceso se promueve la primera proteólisis de caseínas de la leche por las enzimas del sistema proteolítico de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772.

En el sistema madurado a 14 °C la concentración de grupos amino libres no tuvo diferencia significativa entre las semanas 0 a la 4. Sin embargo, respecto a la semana 0, al final del estudio se encontró un incremento en la concentración de péptidos producidos durante el proceso de maduración de 0.339 ± 0.046 a 0.597 ± 0.016 mg/L.

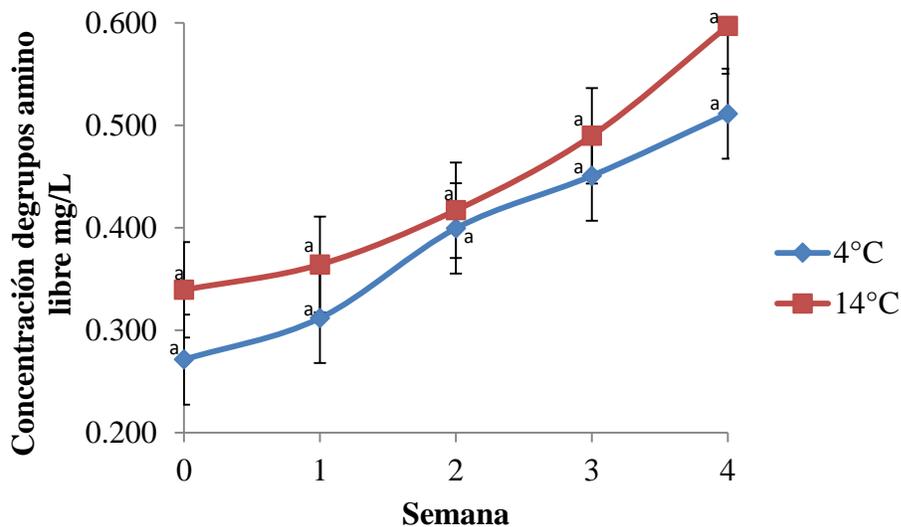


Figura 23. Grupos amino libres generados durante la maduración del queso manchego inoculado con *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 a diferentes temperaturas.

En el sistema de maduración a 4 °C tampoco se encontró un incremento significativo de la concentración de aminos libres (Figura 23). La concentración inicial de grupos amino libres fue de 0.271 ± 0.005 mg/L. El primer incremento se generó en la semana 2 con una concentración de 0.399 ± 0.051 mg/L. Llegando a una concentración final de 0.511 ± 0.039 mg/L.

Ambas temperaturas de maduración se encuentran alejadas de la temperatura y pH óptimo del sistema proteolítico de las BAL, el cual se encuentra entre 25 y 37°C (Juille *et al.*, 2005). Sin embargo, el aumento de la concentración de grupos amino libres a 14 °C se puede deber, a que las enzimas del sistema proteolítico presentan actividad incluso a temperaturas de almacenamiento menores a las de su temperatura óptima (Figuroa-González, 2007).

Existen reportes de que con ambas temperaturas existe una degradación de las caseínas por la acción del sistema proteolítico de las bacterias lácticas y en consecuencia hay generación de péptidos de bajo peso molecular (Savijoki *et al.*, 2005; Rojas-Ronquillo *et al.* 2012).

La degradación de aminoácidos libres y péptidos pequeños es debida al sistema proteinasa-peptidasa del cultivo iniciador (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772). Esta degradación proteica es lo que sustenta el crecimiento de la bacteria, ya que la cantidad de aminoácidos libres que se encuentra principalmente en la leche es insuficiente para que el microorganismo pueda crecer óptimamente (Juillard, 1996).

Se ha demostrado que la contribución de las enzimas de las BAL no iniciadoras en la proteólisis de queso, es poca en cuanto a la producción de péptidos de cadena corta y aminoácidos libres (McSweeney *et al.* 1994; Lane y Fox, 1996).

Kuchroo *et al.* (1983), usaron por primera vez el método de TNBS para monitorear la proteólisis de queso durante 14 semanas. Encontraron un incremento en la proteólisis de la semana 2 a la semana 12 y un aumento mayor hacia el final del estudio (semana 14). El método de TNBS se ha utilizado con éxito en la estimación de aminoácidos libres en queso y como un indicador de la proteólisis, en la maduración por BAL (Bouton y Grappin, 1994).

5.4 Estimación del peso molecular de los péptidos producidos por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La proteólisis primaria en el queso podría ser definida como aquellos cambios en α_s -, β -, κ -caseínas y péptidos, los cuales pueden ser detectados por electroforesis-PAGE (Pavia, 2000). Se muestran las imágenes de los geles de electroforesis con las muestras obtenidas durante la maduración del queso, inoculados con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 y *Lactobacillus rhamnosus* GG en las figuras 24, 25, 26 y 27. La disminución de la zona que corresponde a las proteínas de leche se observa claramente a través del tiempo. Además de estimar el peso molecular de los péptidos producidos durante la maduración del queso. La electroforesis-PAGE nos permite observar también la proteólisis que se produce durante el almacenamiento del queso inoculado con *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772.

La aparición de bandas de fracciones peptídicas menores a 14.2 kDa es de gran importancia, ya que este es el peso molecular correspondiente a la α -lactoalbúmina (α -LA) proteína que tiene el peso molecular más pequeño de todas las proteínas importantes de la leche, aunque cabe señalar que no es una proteína que participe de manera importante en la formación del coágulo del queso. Esta proteína es la referencia para diferenciar entre péptidos y proteínas en una electroforesis de leche (Figuroa-González, 2007). Se logró identificar péptidos con pesos moleculares entre 13.99 a 1.20 kDa, en ambas temperaturas de maduración. Las fracciones menores a 6.5 kDa son importantes, ya que los péptidos reportados como bioactivos, en su mayoría, tienen peso moleculares menores a éste (Meisel, 2005; Visser, 1992; Dionysius *et al.*, 1997).

En las figuras 24 y 25 se puede observar la formación de péptidos debido a la actividad proteolítica en los quesos (a y b) madurados a 4 °C. Se encontraron bandas que correspondían a péptidos menores a 14.4 kDa y bandas menores a los 6.5 kDa que se observaron durante todo el tiempo de maduración. Al mismo tiempo se encontró, que la concentración de estos péptidos generados por la acción del sistema proteolítico va en aumento hasta la cuarta semana. Estos datos concuerdan con los

resultados obtenidos en el análisis de grupos amino libres con el método de TNBS, en el cual se observó un aumento de la concentración de estos grupos al final de la maduración.

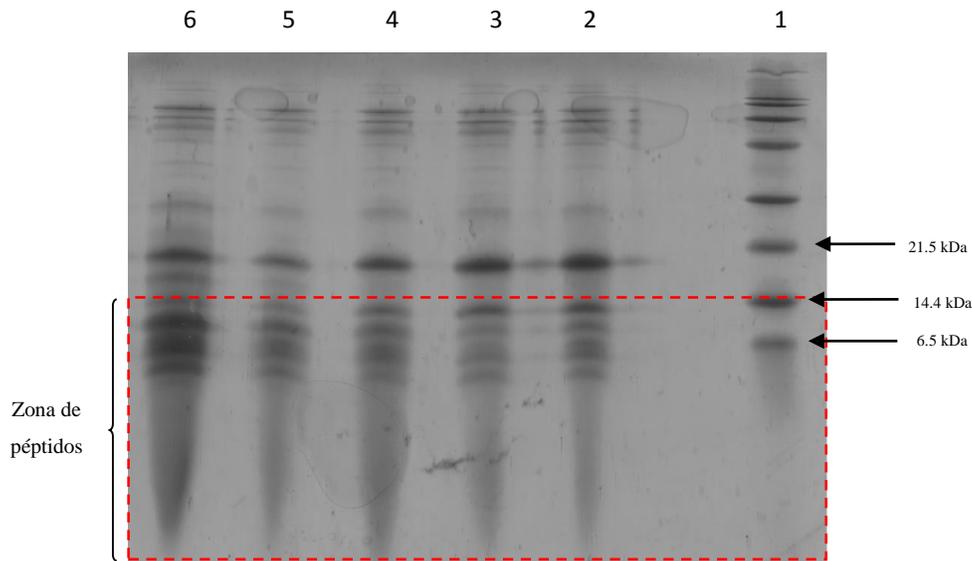


Figura 24. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 4 °C (a).

Carril 1: estándar de polipéptidos; 2: semana 0; 3: semana 1; 4: semana 2; 5: semana 3; 6: semana 4.

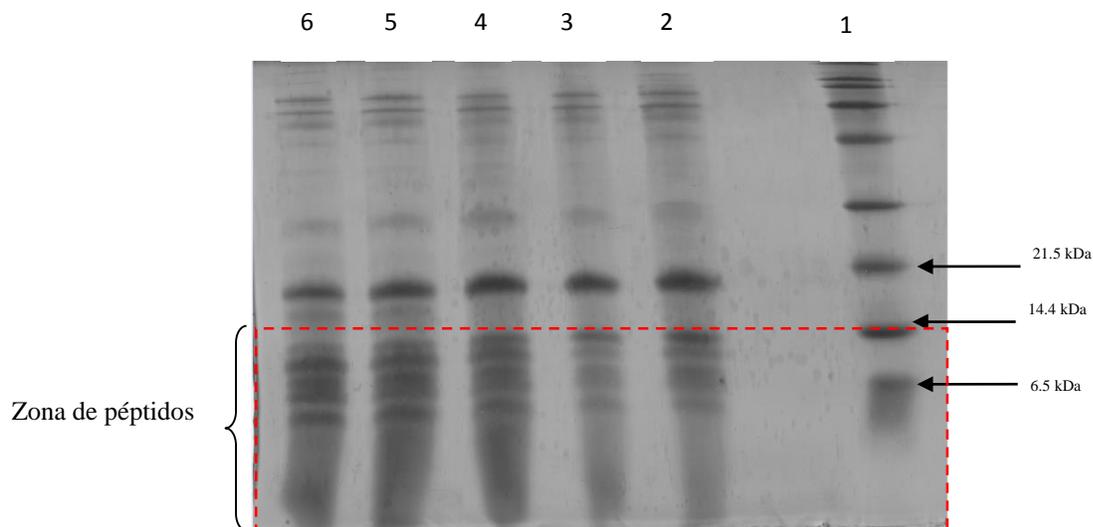


Figura 25. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 4 °C (b).

Carril 1: estándar de polipéptidos; 2: semana 0; 3: semana 1; 4: semana 2; 5: semana 3; 6: semana 4.

Se obtuvo la curva patrón de pesos moleculares y se pudo estimar el peso molecular de los péptidos obtenidos durante la maduración del queso. Los resultados muestran (tabla 4) que a partir de la semana 0 se obtienen péptidos menores a los 6.5 kDa.

Se observó la acumulación de un péptido entre 5.0 y 5.6 kDa que se encontró durante todas las semanas del estudio. Al final de la maduración se observó un péptido de 1.4 kDa y otro entre 2 y 2.8 kDa. Estos péptidos son muy importantes ya que pueden corresponder a secuencias con propiedades bioactivas. De la misma manera se encontraron péptidos de alto peso molecular, superiores a 10 kDa e inferiores a 14.4 kDa; estos péptidos conservaron su concentración aparente en los geles de electroforesis durante todo el estudio y podrían ser potencialmente bioactivos.

Algunos péptidos como los de 6.1 y 6.8 kDa, se encontraron durante todo el proceso, sin embargo estos a diferencia de los de 5.0 y 5.6 kDa, no se acumularon, sino que disminuyó su concentración aparente (figuras 24 y 25). Como se puede observar en los geles, el rango de péptidos obtenidos se encontró entre 14 y 1.4 kDa. Sin embargo los péptidos de menor peso molecular, solo se observaron en semanas específicas de la maduración, que fue en las semanas 1 y 2 uno entre 2 y 2.8 kDa; uno de 3.2 kDa en la semana 3 y al final de la maduración un péptido de 1.4 kDa.

Tabla 4. PM (kDa) de péptidos generados durante la maduración del queso a 4 °C.

Semana	0	1	2	3	4
Peso molecular de péptidos (KDa)					14.9
				14.0	
					11.5
	10.4	10.3	10.3	10.7	
					9.0
	8.6	8.2	8.2	8.6	
	6.3	6.1	6.3	6.6	6.8
	5.1	4.9	5.0	5.2	5.6
				3.2	
		2.0	2.8		1.4

En cuanto a los quesos madurados a 14 °C (a y b), se observó una mayor concentración de péptidos con pesos moleculares menores a 6.5 kDa (Figura 26 y 27). De igual manera se observó una acumulación durante todo el proceso de maduración,

de péptidos de peso molecular menor al de la α -LA. En estos geles es clara la disminución de la concentración de fracciones de peso molecular mayor a 14.4 kDa. Se sabe que el sistema proteolítico de BAL, es un sistema que toma como sustrato las proteínas de alto peso molecular que por medio de un mecanismo de cascada genera péptidos de bajo peso molecular partiendo de péptidos de peso molecular intermedio como sustrato de las enzimas propias del sistema (Law y Haandrikman, 1997; Gasson, 1994; Meisel, 2005).

En los geles de electroforesis se observó, en la zona de péptidos menores a 6.5 kDa, una acumulación de péptidos de bajo peso molecular. Estos datos corresponden a los encontrados en el análisis de grupos amino libres por medio de TNBS.

De acuerdo a los análisis de electroforesis se pudo observar una separación completa de péptidos donde hubo desaparición de proteínas conforme transcurría la maduración, principalmente en lo referente a los péptidos de más de 6.5 kDa. Los péptidos menores a 6.5 kDa aparecieron desde la semana 0.

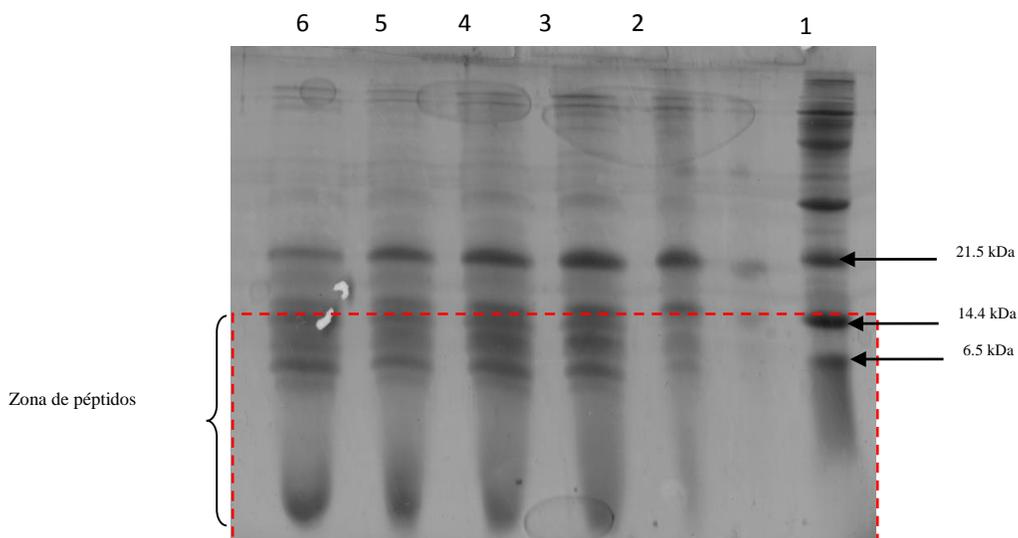


Figura 26. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 14°C (a).

Carril 1: estándar de polipéptidos; 2: semana 0; 3: semana 1; 4: semana 2; 5: semana 3; 6: semana 4.

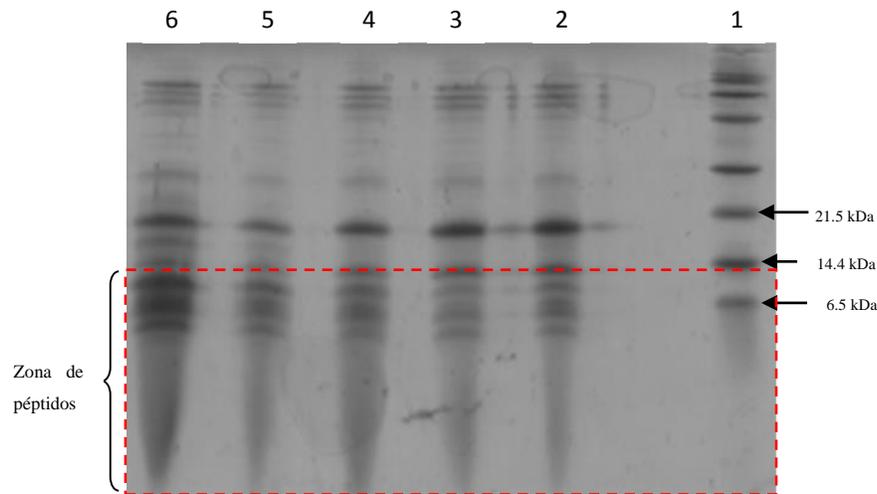


Figura 27. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 14 °C (b)

Carril 1: estándar de polipéptidos; 2: semana 0; 3: semana 1; 4: semana 2; 5: semana 3; 6: semana 4.

Se identificaron por medio del análisis de las imágenes, los péptidos con mayor concentración (Tabla 5). De acuerdo al análisis se pudo observar una acumulación de un péptido de entre 1.3 y 1.5 kDa, que se presentó desde la semana 1 (figuras 26 y 27). De la misma forma se encontraron péptidos de entre 6.5 a 6.7 kDa, que se observan durante todo el proceso de maduración. Hay péptidos de alto peso molecular (superior a 11 kDa) que se generaron en la mitad del proceso de maduración y que se presentaron hasta el final de dicho proceso. De igual manera, péptidos de entre 8.8 y 9.5 kDa, se pudieron observar durante todo el proceso de maduración, pero su concentración fue disminuyendo durante este tiempo.

La formación de péptidos encontrados durante la fermentación del queso oscila entre los 13.4 y 1.3 kDa. En la semana 2 de maduración se obtuvo un mayor número de fragmentos peptídicos.

Tabla 5. PM (kDa) de péptidos generados durante la maduración del queso a 14°C.

Semana	0	1	2	3	4
Peso molecular de péptidos (KDa)				13.4	
	12.6	12.1			
			11.0	11.6	11.35
	9.0	8.8	9.0	9.6	9.4
					8.3
				7.1	
	6.7	6.5	6.6		6.7
			2.34		
	1.5	1.3	1.4	1.4	

Comparando los dos sistemas de maduración, se observó que a 4 °C hubo menos proteólisis. Se encontró solamente un péptido de menos de 2 kDa (1.4 kDa) al final del estudio en este sistema mientras que en el madurado a 14 °C hubo acumulación de péptidos de bajo peso molecular. Los demás péptidos fueron mayores a los 2 kDa.

A través del análisis de SDS-PAGE se observó que a temperaturas más elevadas se incrementó la formación de péptidos de bajo peso molecular. Esta acumulación de péptidos puede estar relacionada al aumento de péptidos que se encontró al final de la maduración respecto a los encontrados en el tiempo 0, en el análisis de grupos amino libres.

Se ha reportado que el uso de temperaturas elevadas acelera la maduración del queso por el incremento de la proteólisis (Folkertsma, Fox y McSweeney, 1996). Además en un estudio realizado por Ong y Shah (2009), se demostró que, quesos madurados a 8 °C tuvieron mayor proteólisis que otros madurados a 4 °C durante 24 semanas. Este estudio tuvo mayor diferencia significativa en los quesos que se habían adicionado con el probiótico *L. casei* y *L. acidophilus*. Sin embargo, donde no se encontró diferencia fue en el peso molecular de los péptidos, ya que a ambas temperaturas de maduración no se observó diferencia significativa en los pesos moleculares de los péptidos obtenidos.

Estos resultados siempre están relacionados con las características del sistema proteolítico de las BAL. Las proteinasas del sistema proteolítico de los lactobacilos están asociadas a la envoltura celular, con propiedades similares a las de los lactococos (Kunji, *et al.*1996). Los lactococos iniciadores poseen en su envoltura

celular proteinasas (PrtP o lactocepin) que contribuyen a la formación de pequeños péptidos (probablemente porque hidrolizan grandes péptidos producidos por la quimosina o plasmina) y una multitud de peptidasas intracelulares son responsables de la hidrólisis de péptidos pequeños y la liberación de aminoácidos en los quesos (Ong y Shah, 2008). Consecuentemente estos microorganismos pueden generar una gran variedad de péptidos incluyendo péptidos bioactivos. Algunos estudios han demostrado que la adición de microorganismos probióticos al cultivo iniciador, mejora la proteólisis, a través de un incremento en la hidrólisis de la caseína (Bergamini *et al.*, 2006; Ong y Shah, 2008).

Folkertsma *et al* (1996), encontraron que la velocidad de degradación de la α_{s1} -CN, se incrementó cuando los quesos se maduraron entre 8 y 16 °C durante 3 meses. Sin embargo, a 9 meses de maduración, el grado de degradación de la α_{s1} - y β -CN, fue mayor en quesos madurados a 16 °C que a temperaturas inferiores. Esto indica que el tiempo de maduración también es un factor determinante en el aumento de la concentración de péptidos de diferentes pesos moleculares.

Adicionalmente se han recomendado temperaturas de maduración elevadas (≤ 15 °C) para acelerar la maduración de los quesos, manteniendo la calidad química (producción de aromas) y la viabilidad de los cultivos iniciadores (Folkertsma *et al.* 1996).

5.5 Caracterización de péptidos mediante HPLC por exclusión molecular

Se realizó la separación de péptidos por HPLC por exclusión molecular. Se analizaron las fracciones peptídicas menores a 6 kDa, ya que la mayoría de los péptidos con actividad biológica están reportados en este rango de peso molecular. En el caso del queso madurado a 4 °C se encontró que, en la semana 0 hubo presencia de seis fracciones peptídicas menores a 6 kDa. Al final del estudio en las semanas 3 y 4 las fracciones peptídicas aumentaron a siete (Tabla 6). Durante el proceso de maduración se observó que algunas fracciones que aparecían desde la semana 0, desaparecían en las semanas subsecuentes. Esto se observó en la fracción de 5.84 kDa, la cual desapareció en la primera semana de maduración.

Otras fracciones después de desaparecer se volvían a presentar en semanas siguientes como es el caso de la fracción de 3.60 kDa que apareció en la semana 0 y volvió a aparecer en la semana 3 (Figura 28). Algunas otras fracciones de pesos moleculares menores a 1 kDa se observaron de la semana 2 hasta el final de la maduración (fracciones de 0.95 y 0.65 kDa).

La fracción de 1.76 kDa inició en la semana 0 con una concentración de 607.74 ppm para finalizar en la semana 4 con una concentración de 730.05 ppm (Tabla 6). En el caso del péptido de 0.43 kDa hubo una concentración de 7.66 ppm y al final de la maduración se tuvo una concentración de 170.95

Tabla 6. Péptidos menores a 6 kDa encontrados en el queso madurado a 4 °C.

Peso Molecular (kDa)	Concentración (ppm)				
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
5.84	93.77	6.71			
3.60	11.91			145.42	82.17
2.52			85.11		4.50
1.76	607.74	627.85		669.50	730.05
1.33	587.64	393.02	474.26	65.13	
0.95			32.75	23.48	15.23
0.65			14.13	45.35	36.7
0.43	7.66	105.92	36.23	142.52	170.95
0.26	12.79	0.62		22.46	13.86

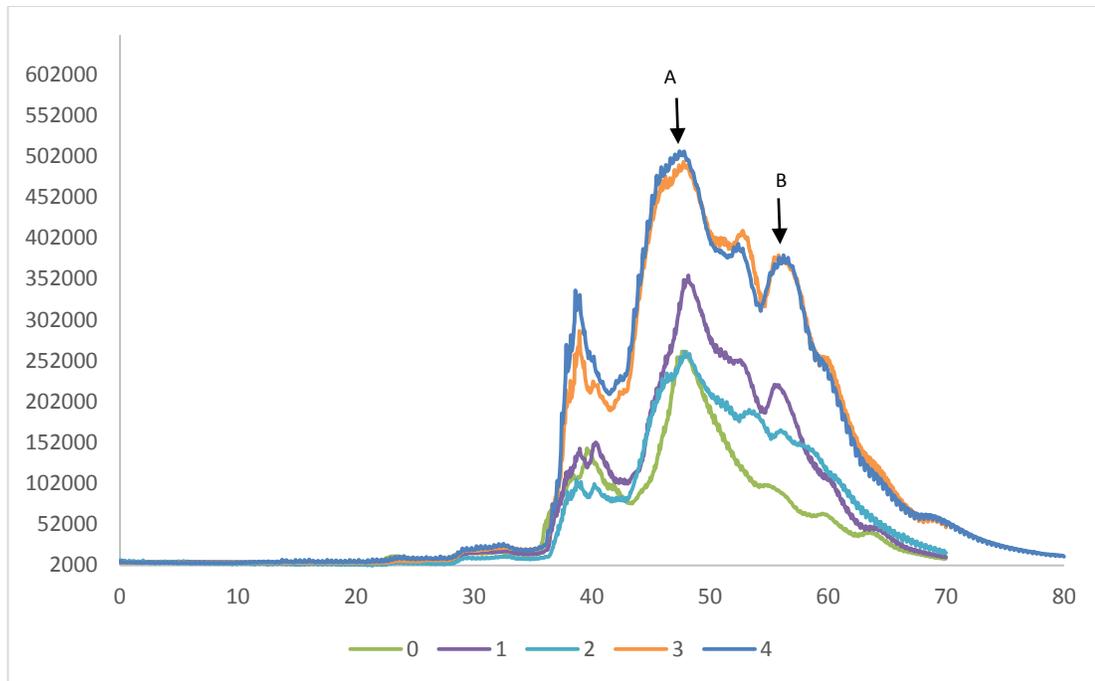


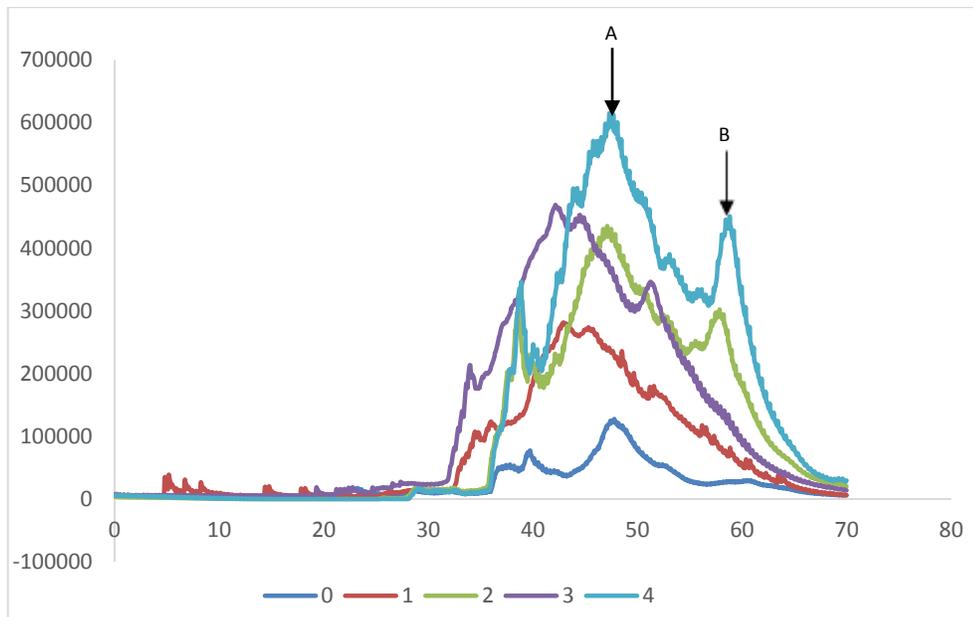
Figura 28. Análisis de las muestras del queso almacenado a 4 °C, analizadas por HPLC de exclusión molecular a 220 nm.
A: 730.05 ppm; B: 170.95ppm

Para el queso madurado a 14 °C las fracciones menores a 6 kDa correspondieron a un grupo de péptidos con pesos moleculares menores a los observados en la maduración a 4 °C. Estos resultados coinciden con lo encontrado en el análisis por electroforesis. Por otro lado en el sistema madurado a 4 °C se observó una fracciones peptídica correspondiente a 3.97 kDa (Tabla 7) en la semana 0 que desapareció y no volvió a presentarse. Fracciones como la de 1.01 kDa y de 0.61 kDa aparecieron en la semana 1, desaparecieron en las semanas subsecuentes y volvieron a desaparecer justo al final de la maduración (Tabla 7).

Se localizaron dos fracciones peptídicas que se acumularon al final de la maduración. Estas fracciones correspondieron a 1.45 kDa y 0.34 kDa, con concentraciones finales de 1053.06 ppm y 273.69 ppm, respectivamente (Figura 29).

Tabla 7. Péptidos menores a 6 kDa encontrados en el queso almacenado a 14°C.

Peso Molecular (kDa)	Concentración (ppm)				
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
3.97	14.91				
2.80	116.47	140.21	22.85	272.88	
1.45	220.31	24.15	0.22	427.73	1053.06
1.01		88.05		21.23	
0.81			33.19	56.51	23.7
0.61		92.54			13.75
0.44					175.68
0.34		109.84	80.25	236.23	273.69

**Figura 29.** Análisis de las muestras del queso almacenado a 14 °C, analizados por HPLC de exclusión molecular a 220 nm.

A: 1053.05 ppm; B: 273.09 ppm

Los péptidos de bajo peso molecular generados durante la maduración pueden provenir directamente de la hidrólisis primaria de caseínas o de péptidos de peso molecular superior a 6 kDa, que a su vez provienen de cadenas proteicas de pesos moleculares superiores y que fueron hidrolizadas por el sistema proteolítico de las BAL (Ramchandran y Shah, 2008).

Los péptidos menores a 3 kDa pueden presentar secuencias con actividad biológica ya que muchos autores han reportado péptidos de menos de 3 kDa biológicamente activos (Meisel, 1998; Meisel, 2001; Clare y Swaisgood, 2000; Rokka *et al.*, 2007).

La acumulación de péptidos en quesos madurados y semimadurados es dependiente de tres factores. El primero está relacionado con la cepa de origen, ya que el crecimiento es dependiente de su sistema proteolítico que a su vez está relacionada con sus necesidades nutricionales. El segundo factor es la temperatura de maduración del queso, ya que la actividad proteolítica depende de las temperaturas óptimas de cada una de las enzimas que componen el sistema proteolítico de las BAL. Finalmente el último factor está relacionado con el tipo y la concentración inicial de proteína (Poolman *et al.*, 1995).

Aun cuando la temperatura óptima de las enzimas del sistema proteolítico de las BAL se encuentra entre 25 y 37°C (Jullie *et al.*, 2005) la actividad continua a temperaturas más bajas, ya sea por el propio crecimiento microbiano en menor proporción o bien por la liberación de enzimas debido a la lisis celular.

Debido a los requerimientos nutricionales de cada especie inoculada, la acumulación de péptidos de bajo peso molecular puede ser variable, con un número de residuos que va de 2 a 6 aminoácidos (Dave y Shah, 1998; Gomes *et al.*, 1998). De igual forma las características de aparición y desaparición de fracciones peptídicas durante la maduración pueden corresponder al sistema de rompimiento en cascada característico del sistema proteolítico, donde las proteínas son el sustrato para la obtención de péptidos de alto peso molecular, que a su vez son los iniciadores en la generación de péptidos de peso molecular intermedio y de bajo peso molecular. Estos últimos pueden provenir tanto de hidrólisis primaria de proteínas como de hidrólisis subsecuente de péptidos (Gasson y De Vos, 1994).

CAPÍTULO 6**CONCLUSIONES**

De acuerdo a los objetivos planteados en este estudio se pudo concluir lo siguiente:

- Cuando *Lactobacillus rhamnosus* GG es inoculado sin la presencia de un cultivo iniciador en un queso tipo manchego, la viabilidad disminuye de manera significativa a 4 °C.
- No hay diferencia significativa en la viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* GG en presencia de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772, durante la maduración de un queso tanto a 4 °C como a 14 °C; sin embargo la cuenta viable del probiótico a la semana 4 de maduración, a ambas temperaturas, fue mayor a 1×10^7 UFC/g, lo que indica que en ambos sistemas, el probiótico puede ejercer efectos positivos en la salud del consumidor.
- En los quesos inoculados solamente con el probiótico los agregados proteicos se encuentran menos fusionados que los quesos inoculados con ambos lactobacilos. Del mismo modo se observa mayor retención de humedad en el queso con ambos lactobacilos por el aumento de cavidades vacías, vistas en el análisis de microscopía.
- Se obtuvo mayor viabilidad de *L. rhamnosus* GG, en el queso inoculado por ambos microorganismos, posiblemente por las modificaciones inducidas por la presencia del EPS, producido por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772, en la matriz proteica.
- La presencia de flora nativa de la leche de origen, puede ejercer también diferencias tanto en la concentración de péptidos como en la viabilidad de la

bacteria probiótica. Sin embargo la presencia de esta flora y sus efectos no fueron objeto de estudio en esta investigación.

- No hubo diferencia significativa en la producción de grupos amino libres tanto a 4 °C como a 14 °C en el queso inoculado con ambos microorganismos. Sin embargo la concentración fue en aumento durante todo el proceso de maduración a las dos temperaturas.
- En el proceso de maduración a 14 °C hubo mayor producción de péptidos de bajo peso molecular (menores a 14 kDa) aunque en ambos sistemas se localizaron péptidos de pesos moleculares menores a 1.5 kDa.
- La formación y acumulación de péptidos de bajo peso molecular durante las últimas semanas de maduración, permiten especular sobre la posible formación de péptidos con actividad biológica.

CAPÍTULO 7

RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

- Evaluar cómo influye el EPS producido por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 sobre la textura y propiedades funcionales del queso.
- Realizar una evaluación sensorial sobre las características de sabor y textura del queso inoculado con *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772.
- Estudiar la actividad antihipertensiva y antitrombótica de las fracciones obtenidas en el queso madurado.
- Purificar y secuenciar los péptidos con actividad biológica generados durante el proceso de maduración del queso inoculado con *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772.

CAPÍTULO 8**REFERENCIAS**

- Alais, C. (1998). Ciencia de la leche. Décima Segunda Reimpresión, Compañía Editorial Continental, México.
- Ali, M. Z. y Robinson, R. K. (1990). Aspects of the structure of a Feta-style cheese made by direct recombination. *Milchwissenschaft*. Vol. **45**. Pp. 699–701.
- Ávila, S. (2011). “Efecto del agente encapsulante en la viabilidad de un microorganismo probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* B442)”. Tesis de maestría. Yauatepec, Morelos.
- Bac Map Genome Atlas. <http://bacmap.wishartlab.com/organisms/960>. Último acceso: 18-01-14
- Badel, S., Bernardi, T. y Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharide. *Biotechnology Advances*. Vol. 29 (1). Pp. 54-66
- Bergamini, C. V., Hynes, E. R., Palma, S.B., Sabbag, N. G. y Zalazar, C. A. (2009). Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *International Dairy Journal*. Vol. **19**. Pp. 467–475.
- Bergamini, C. V., Hynes, E. R. y Zalazar, C. A. (2006). Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*. Vol. **16**. Pp.856–866.
- Botazzi, V. (1999). *Aspetti biotecnologici del Parmigiano Reggiano*. Piacenza, Italia. Mofin s.r.l. Pp. 13-15.
- Bouton, Y. y Grappin, R. (1994). Measurement of proteolysis in cheese: relationship between phosphotungstic acid-soluble N fraction by Kjeldahl and 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-reactive groups in water-soluble N. *Journal of Dairy Science*. Vol. **61**. Pp. 437-440.
- Calvo, M. Bioquímica de los Alimentos. Universidad de Zaragoza. <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/proteins/caseina.html>. Último acceso: 30-11-13.

- Chomorro, M. C. y Losada, M. (2002). El análisis sensorial de los quesos: Tecnología de los alimentos. Mundi-Prensa Libros, S.A. Madrid, España.
- Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Flemming, K. y Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. **149** (3). Pp. 185-193.
- Clare, D. A. y Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*. Vol. **83**. Pp. 1187-1195.
- Dave, R. I. y Shah, N. P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science*. Vol. **81**. Pp. 2804-2816.
- Dionysius, D. A. y Milne, J. M. (1997). Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *Journal of Dairy Science*. Vol. **80** (4). Pp. 667-664.
- Farnworth, E. (2008). Handbook of Fermented Functional Foods. Segunda Edición. CRC Press. Quebec, Canada. Pp.209-260.
- Figuroa-Hernández, C. (2007). Péptidos bioactivos de la leche. Utilización del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* para la generación de péptidos potencialmente bioactivos. Universidad Autónoma Metropolitana, México. Pp. 29-46.
- Figuroa-González, I., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M. y Cruz-Guerrero, A. (2010). Antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* strain shirota co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. **9** (1). Pp.11-16.
- Flores, E. (2008). “Evolución de la Maduración de Queso Gauda Semidescremado con Adición de Cultivo Probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* y del prebiótico Inulina”. Valdivia, Chile.
- Folkertsma, B., Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (1996). Accelerated ripening of Cheddar Cheese at elevated temperatures. *International Dairy Journal*. Vol. **6**. (11-12) Pp. 1117- 1134.

- Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (2003). *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1: Proteins*. Third Edition. Part A. Kluwer Academia/Plenum Publishers, New York.
- García-Garibay, M., Quintero, R. y López-Munguía, A. (2002). *Biotecnología Alimentaria*. Editorial Limusa, S. A. de C. V. Cuarta reimpresión. Pp.166-174.
- Gasson, M. J. y Vos, W. M. (1994). The proteolytic system of lactic acid bacteria, *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, editor Gasson, M. J.; Vos, W. M. Blackie Academic y Professional an Imprint of Chapman and Hall. Pp. 169-210.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F. X., Klaver, F. A. M. y Grande, H. J. (1995). Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. Strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain ki in cheese product. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. Vol. **49**. Pp.71-95.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M. y Recio I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*. Vol. **12** (8). Pp.697–706
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M. y Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*. Vol. **14**. (12). Pp. 1075–1080.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M. y Recio, I. (2004). Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. Vol. **1054** (1-2). Pp. 269–277.
- González, M. “Tecnología para la Elaboración de Queso Blanco, Amarillo y Yogurt”. http://www.argenbio.org/doc/tecnologia_para_la_elaboracion_de_queso.pdf.
Último acceso: 10-12-13
- González-Olivares, L. G., Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L. y García-Garibay, M. (2011). Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. **10** (2). Pp. 179-188.

- Gösta, B. (2003). Manual de industrias lácteas. Mundi-Prensa Libros. Madrid, España.
- Gouldsworthy, A. M., Leaver, J. y Banks, J. (1996). Application of a mass spectrometry sequencing technique for identifying peptides present in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*. Vol. **6** (1-8). Pp. 781-790.
- Guadix, A., Guadix, E. M., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello, P. y Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*. Vol. **41** (1). Pp. 79-89.
- Guzel-Seydim, Z. B., Sezgin, E. y Seydim, A. C. (2005). Influences of exopolysaccharide producing cultures on the quality of plain set type yogurt. *Food Control*. Vol. **16** (3). Pp. 205-209.
- Hassan, A. N. (2008). ADSA Foundation Scholar Award: Possibilities and Challenges of Exopolysaccharide-Producing Lactic Cultures in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*. Vol. **91** (4). Pp. 1282-1298.
- Hassan, A. N. y Awad, S. (2005). Application of exopolysaccharide-producing cultures in reduced-fat Cheddar cheese: Cryo-scanning electron microscopy observations. *Journal of Dairy Science*. Vol. **88** (12). Pp. 4214–4220.
- Hassan, A. N., Corredig, M., Frank, J. F. y Elsoda, M. (2004). Microstructure and rheology of an acid-coagulated cheese (Karish) made with an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strain and its exopolysaccharide non-producing genetic variant. *Journal of Dairy Research*. Vol. **71**. Pp. 116–120.
- Hassan, A. N., Frank, J. F. y Elsoda, M. (2003). Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*. Vol. **13** (9). Pp. 755-762.
- Hassan, A. N., Frank, J. F., Farmer, M. A., Schmidt, K. A. y Shalabi, S. I. (1995). Formation of yoghurt microstructure and three dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy. *Journal of Dairy Science*. Vol. **78** (12). Pp. 2629-2636.
- Herrera, E. (2006). “Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica”. Simposio Regional de Microbiología

- “Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo”, Universidad Libre, Barranquilla, Colombia.
- Hess, S. J., Roberts, R. F. y Ziegler, G. R. (1997). Rheological Properties of Non-Fat Yogurt Stabilized Using *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Producing Exopolysaccharide or Using Commercial Stabilizer Systems. *Journal of Dairy Science*. Vol. **80** (2). Pp.252-263.
- Juillard, V. Furlan, S. Foucaud, C. y Richard, J. (1996). Mixed cultures of proteinase-positive and proteinase-negative strains of *Lactococcus lactis* in milk. *Journal of Dairy Science*. Vol. **79** (6). Pp. 964-970.
- Juille, O. Le Bars, D. y Juillard, V. (2005). The specificity of oligopeptide transport by *Streptococcus thermophilus* resembles that of *Lactococcus lactis* and not that of pathogenic streptococi. *Microbiology*. Vol. **151**. Pp. 1987-1994.
- Kalab, M. (1993). Practical aspects of electron microscopy in dairy research. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. **367**. Pp 247-276.
- Karimi, R., Mortazavian, A. M. y Da Cruz, A. G. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science and Technology*. Vol. **91**. Pp.283–308.
- Keating, P. (2013). Introducción a la lactología. Segunda Edición. Editorial Limusa, México, D.F.
- Kostrzynska, M. y Lepp, D. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* ©SCIMAT 2011. http://www.magma.ca/~pavel/science/L_casei.htm. Último acceso 27-01-14
- Kuchroo, C. N., Rahilly, J. y Fox, P. F. (1983). Assessment of proteolysis in cheese by reaction with trinitrobenzenesulphonic acid. *Food Science and Technology*. Vol. **7**. Pp.129-133.
- Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. y Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. **70**. Pp. 187-221.
- Kunkel, D. <http://visualsunlimited.photoshelter.com/image/I0000uYyy0MbPLBk>. Último acceso: 27-01-14.

- Lane, C. N. y Fox, P. F. (1996). Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*. Vol. **6** (7). Pp. 715-728.
- Law, J. y Haandrikman, A. (1997). Review Article. "Proteolytic Enzymes of Lactic Acid Bacteria". *International Dairy Journal*. Vol. **7**. Pp. 1-11.
- Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M. y Drinan, F. D. (1997). Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait*. Vol. **77** (4). Pp. 441-459.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, L. y Darnell, J. (2005). *Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana. 5^a Edición. Purificación, detección y caracterización de las proteínas. P. 87.
- López, C., Camier, B. y Gassi, J. Y. (2007). Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal* Vol. **17**. Pp. 235-247.
- Lomonte, B. (2009). Electroforesis en Gel de Poliacrilamida. *Inmunología General: Manual de Laboratorio*. Capítulo 13. Pp. 92-101.
- Mangas-Alonso, J. J. (1997). El filado de la sidra. Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria. Boletín informativo. Año II. Vol. **7**.
- Mata, J. A. (2006). "Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salipiger*". Tesis doctoral. Granada, España.
- McSweeney, P. L. H., Olson, N. F., Fox, P. F., Healy, A. y Hojrup, P. (1993). Proteolytic specificity of chymosin on bovine α_{s1} -casein. *Journal of Dairy Science*. Vol. **60**. Pp. 401-412.
- Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current Medicinal Chemistry*. Vol. **12**. Pp. 1905-1919.

- Mulero-Cánovas, J., Zafrilla, P., Martínez-Cachá, A., Leal, M. y Abellán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. Vol. **23** (5). Pp. 219-227.
- Nollet, L. M. L. y Toldrá, F. (2013). Food Analysis by HPLC. Third edition. CRC Press. *HPLC of Food Proteins*. Pp. 97-100.
- Olivera, J. (2011). Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche. Unidad de Tecnología de Alimentos. Universidad de la República.
- Ong, L. y Shah, N. P. (2008). Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *LWT - Food Science and Technology*. Vol. **41** (9). Pp.1555-1566.
- Ong, L. y Shah, N. P. (2009). Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. *LWT - Food Science and Technology*. Vol. **42** (7). Pp. 1260–1268.
- Parra-Huertas, R. A. (2010). Review: “Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos”. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Vol. **8** (1). Pp. 93-105.
- Pavia, M., Trujillo, A. J., Guamis, B. y Ferragut, V. (2000). Proteolysis in Manchego-Type Cheese Salted by Brine Vacuum Impregnation. *Journal of Dairy Science*. Vol. **83** (7). Pp. 1441-1447.
- Perry, D. B., McMahon, D. J. y Oberg, C. J. (1997). Effect of exopolysaccharide-producing cultures on moisture retention in low fat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*. Vol. **80**. Pp. 799–805.
- Phillips, M., Kailasapathy, K. y Tran, L. (2006). Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, sp., *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. **108** (2). Pp. 276–280.

- Poolman, B., Kunji, E. R. S., Hagting, A., Juilliard, V. y Konings, W.N. (1995). The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*. Vol. (79). Pp. 65S-75S.
- Poveda, J. M., Cabezas, L. y McSweeney, P. L. H. (2004). Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. *Food Chemistry*. Vol. **84** (2). Pp.213–218.
- Poveda, J. M., Sousa, M., Cabezas, L. y McSweeney, P. L. H. (2003). Preliminary observations on proteolysis in Manchego cheese made with a defined-strain starter culture and adjunct starter (*Lactobacillus plantarum*) or a commercial starter. *International Dairy Journal*. Vol. **13**. Pp.169–178.
- Pritchard, S. R., Phillips, M. y Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*. Vol. **43**. Pp.1545–1548.
- Ralph, E. (1998). Tecnología de los productos lácteos. Acribia. Zaragoza, España.
- Ramchandran, L. y Shah, N. P. (2008). Proteolytic profiles and angiotensin-I converting enzyme and α -glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*. Vol. **73**. Pp. M75-M81.
- Rokka, T., Syvaaja, E. L., Tuominen, J. y Korhonen, H. (1997). Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT milk. *Milchwissenschaft*. Vol. **52**. Pp. 675-678.
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flóres-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., Jiménez-Guzmán, J. y García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *Food Biotechnology*. Vol. **26** (1). Pp. 1-8.
- Ryhanen, E. L., Pihlanto-Leppala, A. y Pahkala, E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal*. Vol. **2** (4-7). Pp. 441-447.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. y Itoh, T. (2000). Isolation and Structural Analysis of Antihypertensive Peptides That Exist Naturally in Gouda Cheese. *Journal of Dairy Science*. Vol. 83 (7). Pp. (1434-1440)

- Salome, T. (2008). "Microbiólogos ilustres" Grigorov, Stamen (1878-1945) <http://microilustres.blogspot.mx/2008/01/grigorov-stamen-1878-1945.html>.
Último acceso: 24 de noviembre del 2013.
- Samaniego, L. (2000). *Lactobacillus spp. importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora*. Editorial Universitaria (Ciudad de La Habana, Cuba).
- Savijoki, K., Ingmer, H. y Varmane, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. **71**. Pp. 394-406.
- Sierra, I. (2010). Análisis Instrumental. Netbiblo. España. Pp.142-143.
- Torres, M., Vallejo, B. y Gonzalez, A. F. (2005). Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. Vol. **55** (2). Pp. 111-117.
- Villegas, A. (2004). Tecnología Quesera. Trillas 1° Ed. México. Pp. 231-241.
- Visser, S. (1992). Symposium: Proteolytic Enzymes and Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*. Vol. **76**. Pp. 329-350.
- Walstra, P. y Jenness, R. (1986). Química y Física Lactológica. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.
- Walstra, P., Geurts, T., Noomen, A., Jellema, A. y Van, M. (2001). Ciencia de la leche y Tecnología de los productos lácteos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.
- Welman, A. D. y Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*. Vol. **21** (6). Pp. 269-274.
- Kun-Lee, Y. y Salminen, S. (2009). Handbook of Probiotics and Prebiotics. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Zamudio, K. (2005). "Lactobacilos nativos productores de Exopolisacáridos de interés biotecnológico". Tesis de licenciatura. Lima, Perú.

CAPÍTULO 9**APÉNDICE****9.1 Preparación de soluciones****9.1.1 Preparación de soluciones del método de TNBS****Amortiguador de fosfatos 0.2125 M pH 8.2**

9.2525g de fosfato dibásico (K_2HPO_4) aforado a 250 mL

1.4460 g de fosfato monobásico (KH_2PO_4) aforado a 50 mL

Se agrega fosfato de potasio monobásico al fosfato de potasio dibásico hasta alcanzar el pH de 8.2.

Solución de ácido clorhídrico 0.1 N

0.970 mL de ácido clorhídrico (HCl) 10.3 N aforado a 100 mL

Solución de ácido TNBS 0.10%

0.05 mL de TNBS aforado a 50 mL de amortiguador de fosfatos 0.2125 M pH 8.2.

9.1.2 Preparación de soluciones para electroforesis**Solución stock de acrilamida 30% T**

37.5 g de solución stock de acrilamida (40 % acrilamida/Bis Solución, 37.5:1) aforado con 50 mL de agua desionizada.

Composición del gel de separación. (12.5% T)

4.16 mL de solución stock de acrilamida 30 % T

5.84mL de buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8

El %T denota el porcentaje total de concentración de ambos monómeros (acrilamida y bisacrilamida). La solución se almacenó a 4°C.

Solución reguladora Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8

Tris (hidroximetil) amino metano 18.15 g. Se disolvió en 80 mL de agua desionizada y se ajustó el pH a 8.8 con HCl 6 N y por último se aforó a 100 mL con agua desionizada.

Solución reguladora Tris-HCl 1.5 M, pH 6.8

Tris (hidroximetil) amino metano 6.0 g. Se disolvió en 60 mL de agua desionizada y se ajustó el pH a 8.8 con HCl 6 N y por último se aforo a 100 mL con agua desionizada.

Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 %

Dodecil sulfato de sodio 0.1g. Se aforó a 1 mL con agua desionizada y se guardó a 0°C.

Solución de persulfato de amonio al 10%

Se pesó 0.1 g de persulfato de amonio y se disolvió en 1 mL de buffer Tris-HCl pH 6.8 y 8.8.

Nota: Esta solución se preparó inmediatamente antes de usarse.

Solución amortiguadora de la muestra

Agua desionizada 0.95 mL

Solución reguladora Tris-HCl 0.5M pH 6.8. 0.25 mL

Glicerol 0.20 mL

SDS 10% 0.40 mL

Azul de bromofenol 1% 0.10 mL

Solución amortiguadora de corrida tris-glicina-SDS (5x)

Tris (hidroximetil) amino metano 4.5 g

Glicina 21.6 g

SDS 1.5 g

Se ajustó el pH a 8.3 con HCl y se aforó a 300 mL con agua desionizada. Se almacenó a 4°C.

Solución desteñidora ácido acético (7%)- metanol (10%)

Metanol 20 mL

Ácido acético 14 mL

Se aforó a 200 mL con agua desionizada. Se almacenó a 4 °C.

Solución fijadora de ácido acético al 7.5%

Ácido acético 11.25 mL aforado en 150 mL con agua desionizada.

Solución de azul de Coomassie

Etanol al 96% 450 mL

Ácido acético glacial 50 mL

Azul de coomassie 2.5 g

Agua desionizada 500 mL

Se agito durante toda la noche para que el tinte se disuelva bien. Se filtró y se guardó en bote ámbar evitando la exposición a la luz.

9.1.3 Preparación de soluciones para el método HPLC de exclusión molecular**Amortiguador de fosfatos 0.15 M pH 6.8**

8.238 g de fosfato de sodio dibásico

11.33 g fosfato de sodio monobásico

Se ajusta a un pH de 6.8 y se afora a 1 L con agua desionizada

9.2 Estándar de pesos moleculares**9.2.1 Estándar de pesos moleculares para electroforesis SDS-PAGE**

SDS-PAGE Molecular Weight Standards (Daltons), Broad-Range

Catalog Number 161-0317

Marca BIO-RAD

Miosina	200,000
β -galactosidasa	116,250
Phosphorilase b	97,400
Bovine serumalbumin	66,200
Ovalbumin	45,200
Carbonicanhydrase	31,000
Soybean trypsininhibitor	21,500
Lysozyme	14,400
Aprotinina	6,500

9.2.2 Estándar de pesos moleculares para HPLC de exclusión molecular

Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (Daltons)

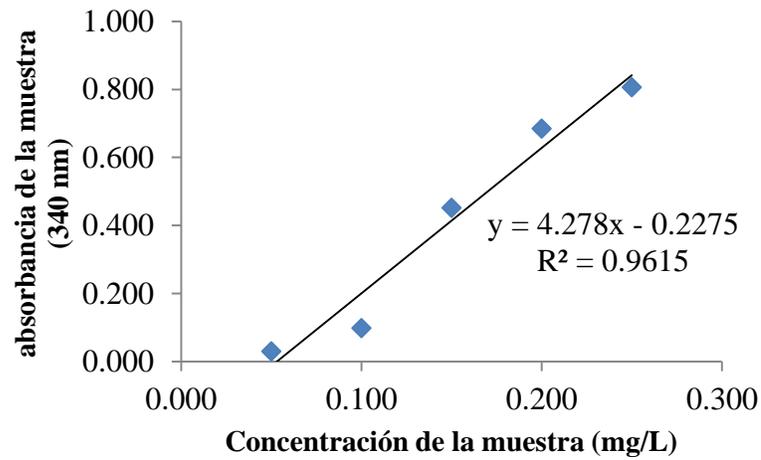
Catalog Number 161-0326

Marca BIO-RAD

Triosephosphate isomerase	26, 625
Myoglobin	16,950
α -Lactalbumin	14,437
Aprotinin	6,512
Insulin b chain, oxidized	3,496
Bacitracin	1,423

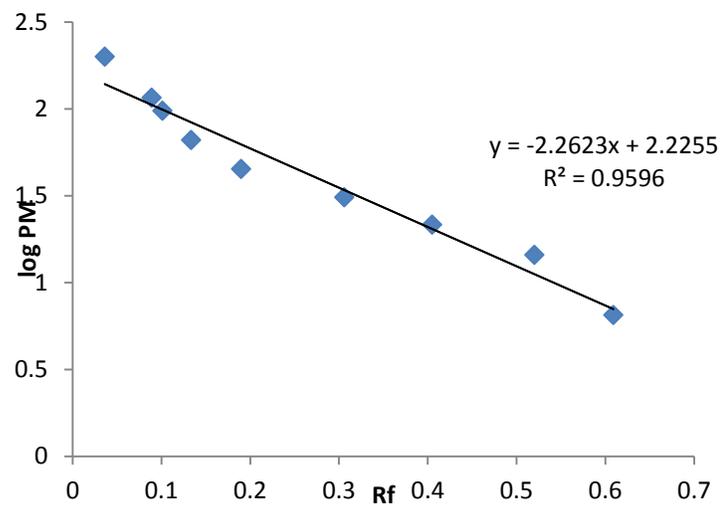
9.3 Curvas patrón

9.3.1 Curva patrón de TNBS

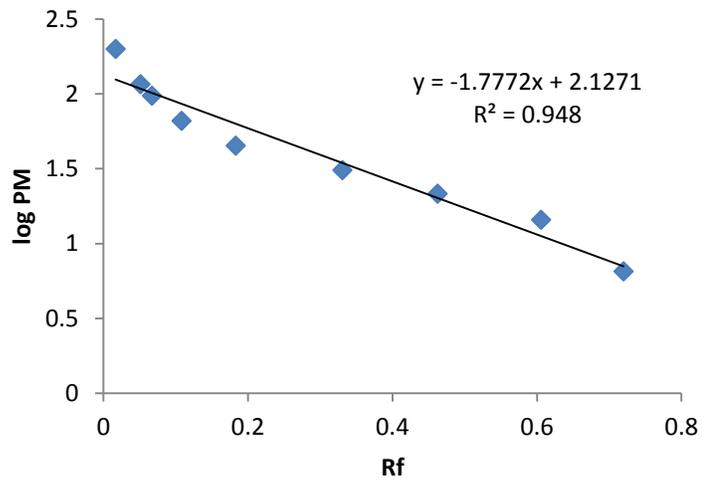


9.3.2 Curva para la determinación de pesos moleculares por electroforesis

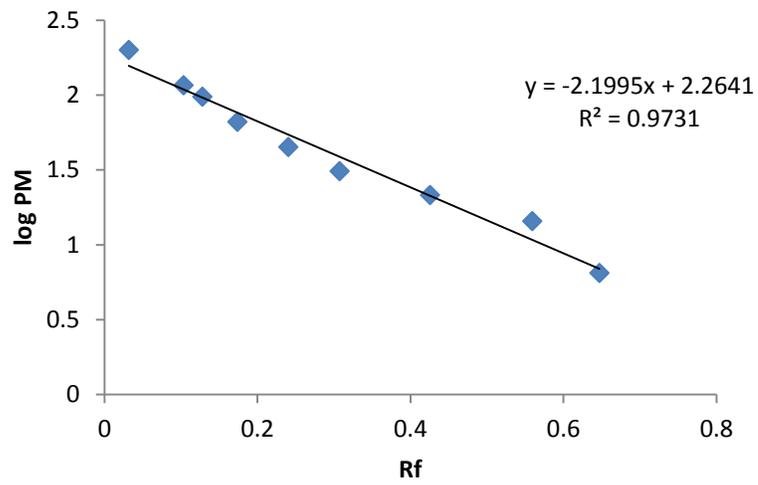
9.3.2.1 Curva patrón de sistema de maduración a 4°C (a)



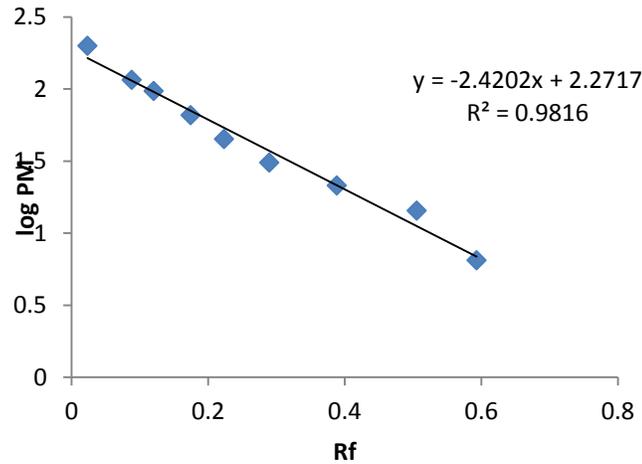
9.3.2.2 Curva patrón de sistema de maduración a 4°C (b)



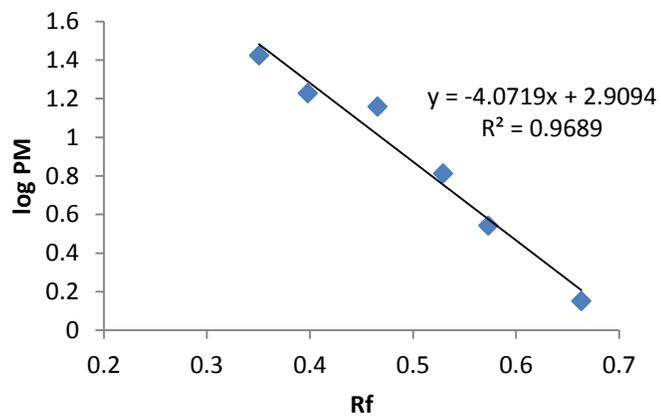
9.3.2.3 Curva patrón de sistema de maduración a 14°C (a)



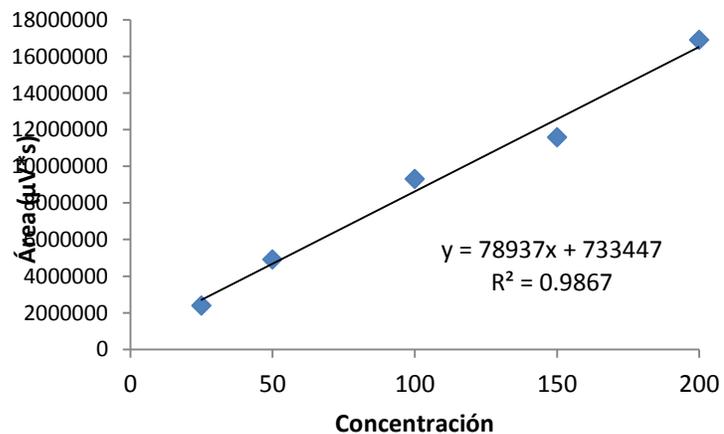
9.3.2.4 Curva patrón de sistema de maduración a 14°C (b)



9.3.3 Curva de pesos moleculares para HPLC por exclusión molecular



9.3.4 Curva de concentración (ppm) para HPLC por exclusión molecular



9.4 Viabilidad de *L. rhamnosus* GG (Log UFC/g) durante la maduración de un queso.

Muestra	Semana			
	0	1	2	3
14 °C A	6.11	5.85	6.08	5.85
	5.90	6.28	5.60	5.48
14 °C B	5.90	5.78	5.60	5.48
	5.48	5.30	5.00	5.00
4 °C A	5.70	5.00	5.48	5.00
	5.00	5.00	5.00	0.00
4 °C B	5.00	5.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.00

	Semana							
	0		1		2		3	
	V	DS	V	DS	V	DS	V	DS
4°C	3.92 ^a	0.40	3.75 ^a	0.00	2.62 ^a	0.34	1.25 ^a	0.00
14°C	5.85 ^a	0.27	5.80 ^a	0.40	5.57 ^a	0.44	5.45 ^b	0.35

9.5 Viabilidad de *L. rhamnosus* GG y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 (Log UFC/g) durante la maduración de un queso.

Muestra	Semana				
	0	1	2	3	4
14 °C A	7.90	7.85	7.60	7.48	7.60
	8.15	8.28	7.30	7.30	7.85
14 °C B	7.78	7.78	7.48	7.78	8.28
	7.30	0.00	7.00	7.30	8.11
4 °C A	8.48	8.49	7.70	7.95	7.60
	8.26	8.18	7.00	7.70	7.78
4 °C B	7.85	8.36	7.78	7.30	7.00
	7.48	8.11	0.00	7.00	0.00

Muestra	0		1		2		3		4	
	V	DS								
4°C	8.01 ^a	0.44	8.29 ^a	0.17	7.49 ^a	0.43	7.49 ^a	0.42	7.46 ^a	0.41
14°C	7.78 ^a	0.36	7.97 ^a	0.27	7.35 ^a	0.26	7.46 ^a	0.23	7.96 ^a	0.3

9.6 Concentración de los grupos amino libres (mg/L) durante la maduración de un queso.

Muestra	Semana				
	0	1	2	3	4
4 °C A	0.268	0.315	0.363	0.442	0.539
4 °C B	0.275	0.309	0.436	0.460	0.483
14 °C A	0.307	0.343	0.402	0.505	0.608
14 °C B	0.372	0.386	0.432	0.475	0.585

	Semana									
	0		1		2		3		4	
	C	DS								
4°C	0.271 ^a	0.005	0.312 ^a	0.004	0.399 ^a	0.051	0.451 ^a	0.012	0.511 ^a	0.039
14°C	0.339 ^a	0.046	0.364 ^a	0.030	0.417 ^a	0.021	0.490 ^a	0.021	0.597 ^a	0.016



[Galería del Congreso](#)

[Memorias del Congreso](#)
Descarga aquí (archivo .zip)



Congreso Internacional **Biología, Química** y **Agronomía**

“Innovación para el Desarrollo Sustentable”
25, 26 y 27 de septiembre de 2013





Congreso Internacional
**Biología, Química
y Agronomía**

La Universidad Autónoma de Guadalajara
a través de la
Facultad de Ciencias Químicas y de la
Escuela de Ciencias Biológico-Agropecuarias

otorga el presente

Reconocimiento

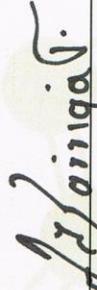
a Zaira Liliana López Cuellar, Luis Guillermo González Olivares, Javier Castro Rosas, Melitón Jesus Franco Fernández,
Elizabeth Contreras López, Judith Jaimez Ordaz, Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

por su trabajo titulado: *Estudio de la viabilidad y la capacidad proteolítica de Lactobacillus bulgaricus 2772 y Lactobacillus rhamnosus GG durante la maduración de un queso (tipo manchego).*

4o. Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía

“**Innovación para el Desarrollo Sustentable**”, celebrado del 25 al 27 de septiembre de 2013.

Zapopan, Jalisco, México, septiembre de 2013.


Ing. José Antonio Barriga de la Torre
Decano de la Unidad Académica de
Diseño, Ciencia y Tecnología


Ing. Tomás Ornelas Salas
Director de la Facultad de Ciencias Químicas

Trasciende
con VALORES



Estudio de la viabilidad y la capacidad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* 2772 y *Lactobacillus rhamnosus* GG durante la maduración de un queso (tipo Manchego)

Z. L. López_Cuellar^{1,*}, L.G. González_Olivares^{2,+}, J. Castro_Rosas³, M.J. Franco_Fernández⁴, E. Contreras_López⁵, J. Jaimez_Ordaz⁶, G.M. Rodríguez_Serrano⁷

¹Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/ Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México/lili_23899@hotmail.com

²Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/ Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México/ lgonzales@uaeh.edu.mx

³Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/ Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México/jcastro@uaeh.edu.mx

⁴Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Rancho Universitario Av. Universidad Km. 1 Ex-Hda. de Aquetzalpa AP 32, Tulancingo, Hgo. / chuchofranco@yahoo.com

⁵Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/ Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México/ elilopez@yahoo.com

⁶Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/ Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México/jjaimezordaz@gmail.com

⁷Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa/ AP 55-355 México D.F./ gmrs@xanum.uam.edu

* Autor que presentará trabajo.

+ Autor a quien la correspondencia deba ser enviada; Tel.: (52)-(771)-712000, Ext.2513; Centro de Investigaciones Químicas, Departamento de Biotecnología.

Área del Conocimiento: Biotecnología alimentaria

Resumen: Hoy en día, las proteínas de la leche son consideradas como una fuente importante de péptidos bioactivos, y estos se han identificado en hidrolizados de proteínas de leche y productos lácteos, como el queso. En este estudio se determinó la sobrevivencia de *L. rhamnosus* GG y *L. bulgaricus* 2772, durante la maduración de un queso manchego a dos diferentes temperaturas de refrigeración (4 y 14°C). Se midió la concentración de grupos amino libres para conocer el grado de hidrólisis de las proteínas del queso, mediante el método del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS). Se probaron dos diferentes temperaturas de maduración para determinar en cual de estos medios se podía producir una mayor cantidad de péptidos. Se observó que a una temperatura de 4°C la sobrevivencia disminuye con el tiempo y a 14°C hay un aumento de las colonias. Para la

cantidad de grupos amino libres se encontró que hay mayor actividad proteolítica a una temperatura de 14°C de maduración. La cantidad de péptidos fue determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE con una T=15%. El análisis de las imágenes de los geles de electroforesis se efectuó mediante el analizador de imágenes ImageJ. Se encontró que en el queso madurado a una temperatura de 14°C hubo una mayor cantidad de péptidos menores a 14 kDa que a una temperatura de 4°C.

Palabras Clave: Probióticos, péptidos bioactivos, proteólisis

Abstract: Today, the milk proteins are considered as an important source of bioactive peptides, and these have been identified in protein hydrolysates of milk and dairy products such as cheese. In this study we determined the survival of *L. rhamnosus* GG and *L. bulgaricus* 2772, during maturation of Manchego cheese to two different cooling temperatures (4 and 14 ° C). Free amino groups concentration to determine the degree of hydrolysis of proteins in the cheese was measured through the trinitrobenzenesulfonic acid method (TNBS). Production of peptides in two different temperatures of maturation were teste. It was observed that at a temperature of 4 ° C survival decreases at the end of study and 14 ° C there is an increase in the colonies number. For the amount of free amino groups was found that there is more proteolytic activity at a temperature of 14 ° C for ripening. The amount of peptides was determined by polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE with a T = 15%. Analyzing images of gel electrophoresis was performed using the Image-J image analyzer. Was found in ripened cheese at a temperature of 14 ° C there was a greater quantity of less than 14 kDa peptides that a temperature of 4 ° C.

Keywords: Probiotic, bioactive peptides, proteolysis

1. Introducción

Actualmente se sabe que la gran variedad de quesos se produce por la alteración de diferentes aspectos en la fabricación: el tipo de cultivo iniciador, cultivos adicionales, condiciones de fermentación, la adición de cuajo, el corte de la cuajada, escaldado, el desuerado, formación de queso, salazón, la adición de especias, y maduración. La gran variedad de quesos hace rentable su producción como una pequeña industria artesanal, así como para los productores de alimentos nacionales y multinacionales, pues ambos son mercados gourmet. La variedad del mercado y el crecimiento constante de la producción de queso proporcionan la oportunidad de adoptar nuevas tendencias alimentarias. En los últimos años una tendencia importante de alimentos en los países desarrollados ha sido la

introducción de los alimentos funcionales, especialmente en el sector lácteo, la introducción del concepto probiótico se ha realizado con éxito debido principalmente a la producción de metabolitos que se liberan durante la fermentación, principalmente péptidos de bajo peso molecular con actividades biológicas potencialmente benéficas a la salud. Aunque la mayoría de los productos con probióticos se basan en las leches fermentadas se han comenzado a desarrollar nuevos productos, algunos ejemplos son visibles en el sector del queso. [1]

Tras la administración oral, los péptidos bioactivos pueden ejercer un efecto positivo sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso, lo cual es dependiente de las secuencias de aminoácidos. Los péptidos bioactivos podrían influir en el metabolismo celular y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores. [2]

Como ya se mencionó, los productos fermentados son asociados principalmente con bacterias ácido lácticas (BAL), principalmente las denominadas probióticas. Estas pueden constituir un valor terapéutico y preventivo contra una serie de enfermedades en los seres humanos y en animales. Este efecto protector se ha estudiado en ciertas bacterias como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y se ha encontrado que tienen la capacidad de generar péptidos bioactivos durante la fermentación láctea[3]. La generación de péptidos bioactivos se da, debido a que las bacterias ácido lácticas poseen un sistema proteolítico compuesto de proteinasas, peptidasas y sistemas de transporte, que les permite degradar las proteínas de la leche (principalmente caseínas) a aminoácidos y péptidos. Estos péptidos bioactivos (péptidos de bajo peso molecular 3 a 20 aminoácidos aproximadamente), tras la administración oral, pueden ejercer un efecto positivo sobre los sistemas cardiovascular, digestivo, inmunológico y nervioso, lo cual es dependiente de la secuencia de aminoácidos que los conformen [4]. El sistema proteolítico asegura su crecimiento de las BAL en el medio y está conformado por:

1. Proteinasas localizadas en la envoltura celular, que permite la degradación de caseínas a oligopéptidos.
2. Sistema de transporte de péptidos que permite la internalización de los oligopéptidos liberados.
3. Peptidasas intracelulares que hidrolizan los oligopéptidos en péptidos o en aminoácidos, para ser utilizados por la célula.

El primer paso en la descomposición de proteínas de la leche consiste en proteinasas que son responsables de liberar péptidos de las caseínas. A continuación, los péptidos liberados son hidrolizados

por peptidasas para liberar aminoácidos y pequeños péptidos que toma la célula mediante los sistemas de transporte [5].

Durante la elaboración de los quesos son formados una gran variedad de péptidos y algunos han mostrado tener algún tipo de actividad biológica. En la maduración, los caseinofosfopéptidos que se encuentran de forma natural en los quesos generan péptidos (proteólisis secundaria) con actividad antihipertensiva y su generación es muy dependiente de la etapa de maduración en la que se encuentre el queso.[2]

Para conferir un efecto benéfico a la salud del consumidor los microorganismos probióticos deben sobrevivir el prolongado periodo de almacenamiento requerido para la maduración del queso, ya que algunos quesos requieren periodos de maduración por más de 6 meses, añadiéndosele el periodo de vida de anaquel propio del producto. En la elaboración del queso con probióticos se necesita que las cepas crezcan a altas cantidades durante la maduración, o que se incorporen durante la elaboración en altas concentraciones para que sobrevivan al proceso de maduración. Ya sea durante la elaboración o maduración del queso, los microorganismos probióticos no deben producir metabolitos que pudieran causar defectos, e interfirieran con la actividad de otros microorganismos esenciales en el queso.

Para el aprovechamiento de las propiedades funcionales de las bacterias probióticas, los procesos de fabricación de productos de queso pueden ser modificados y adaptados a los requisitos de los probióticos [1]. En esta investigación se estudio la viabilidad y actividad proteolítica de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus bulgaricus* 2772 durante la maduración de un queso (tipo manchego), almacenado a 4°C y 14°C, durante 4 semanas.

2. Materiales y Métodos

Elaboración del queso manchego. El queso madurado se realizó a partir de leche de vaca pasteurizada y estandarizada a un 3.6% de contenido de grasa, se llevó a una temperatura de 36°C y se le agregó un 0.20% (% p/v) de CaCl₂ para después agregársele 1% de inóculo (*Lactobacillus rhamnosus* GG y *L. bulgaricus* 2772). La premaduración se realizó a 37°C y 18.5°C durante un periodo de 30 a 40 min. Se cuajó durante 5 min y se cortó la cuajada, se agito sin calor durante 40 min, se procedió a desuerar. Después se presó durante 24 h y se envaso al vacío para después almacenarlo a 4°C y 14°C, las muestras se realizaron por duplicado.

Preparación de las muestras. Se tomaron muestras de los días 0, 7, 14, 21 y 28 para los posteriores análisis. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4°C.

Determinación de viabilidad. La viabilidad de los microorganismos se determinó mediante siembra en placa tomándose una alícuota de 10 g, disolviéndolo con 90 mL de agua peptona al 1% estéril a temperatura ambiente. Se mezcló en stomacher a 260 rpm durante 3 min hasta que se obtuvo una suspensión completa y homogénea. Se diluyó 1 ml de la suspensión homogénea en agua peptona al 1%, considerando una dilución final de 1×10^{-6} . Se sembró en un medio de agar MRS (Man Rogossa y Sharpe) ajustado a pH 5.20 con ácido acético 0.1 N, se incubó a 42°C por 72 h en condiciones anaerobias. Posteriormente se realizó tinción Gram para comprobar pureza de la cepa y recuento en placa.

Determinación de grupos amino libres por el método de Ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS). La actividad proteolítica se midió con el ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico TNBS (esta técnica es capaz de detectar en cantidades de μg , sin embargo no es sensible a variaciones de grupos amino terminales específicos), para lo cual se tomó una alícuota de 20 g de queso y se le agregaron 50 mL de agua desionizada, se mezcló en stomacher a 260 rpm durante 3 min, se tomaron 10 mL y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min a 4°C, se filtraron en papel whatman n. 4 a vacío y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 5000 rpm, durante 10 min a 4°C, los sobrenadantes se almacenaron a una temperatura de -4°C.

Se agregó 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.21 M pH 8.2 en tubos de ensayo forrados con papel aluminio y 125 μL de muestra. En caso del tubo blanco en lugar de muestra se agregó agua desionizada. Se incorporó 1 mL de TNBS al 0.10% en amortiguador de fosfatos 0.21 M pH 8.2, y se agitó cada tubo en vórtex. Se incubó la mezcla durante 1 h a 50°C en la oscuridad. La reacción se paró después de 60 minutos adicionando 2 mL de ácido clorhídrico 0.1N. Se leyó en un espectrofotómetro a 340 nm de longitud de onda contra el blanco.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó de acuerdo a Laemmli (1970) con geles de poliacrilamida T=15%. Se usó un estándar de pesos moleculares de amplio rango (Bio-Rad, EUA). Los geles se tiñeron con azul de coomassie. Se siguió la metodología realizada según González-Olivares y col., (2011).

Todos los análisis se realizaron por duplicado y los resultados se sometieron a una prueba de análisis de varianza por comparación de medias según el análisis de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

3. Resultados

Determinación de viabilidad

Muestra	Días				
	0	7	14	21	28
14°C	7.88	7.90	7.40	7.54	8.04
4°C	8.16	8.31	7.48	7.65	7.48

Tabl.1. Sobrevivencia (log UFC) de *L. bulgaricus* 2772 y *L. rhamnosus* GGa las diferentes temperaturas de almacenamiento.

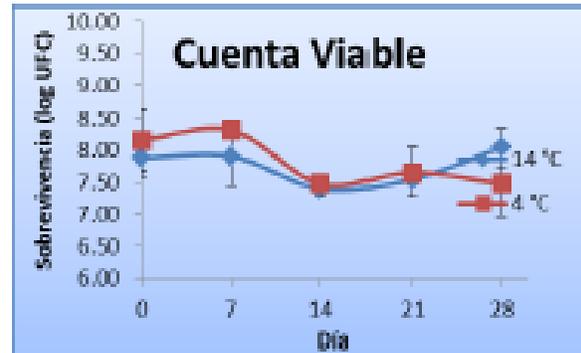


Figura 1. Determinación de viabilidad durante la maduración de un queso manchego, a diferentes temperaturas de refrigeración.

Determinación de grupos amino libres por el método de Ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS)

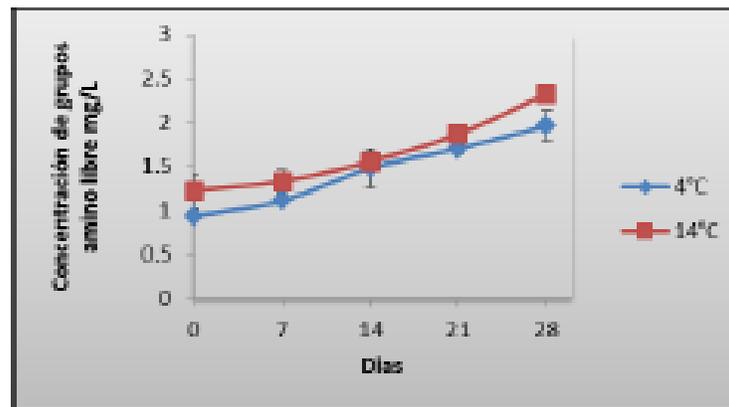


Figura 2. Concentración de los grupos amino libres durante la maduración del queso manchego, a diferentes temperaturas.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) T=15%

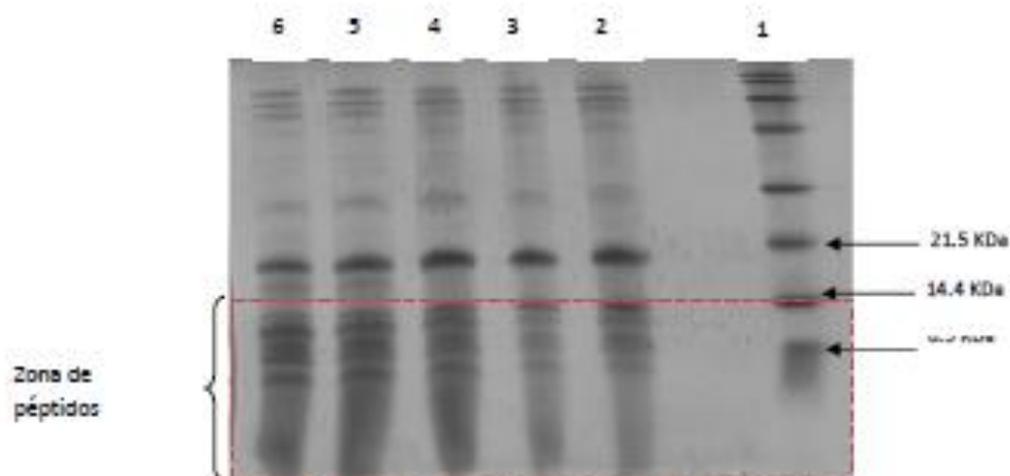


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-page. Queso manchego a temperatura de 4°C. Carril 1: estándar de polipéptidos, 2: día 0, 3: día 7, 4: día 14, 5: día 21, 6: día 28

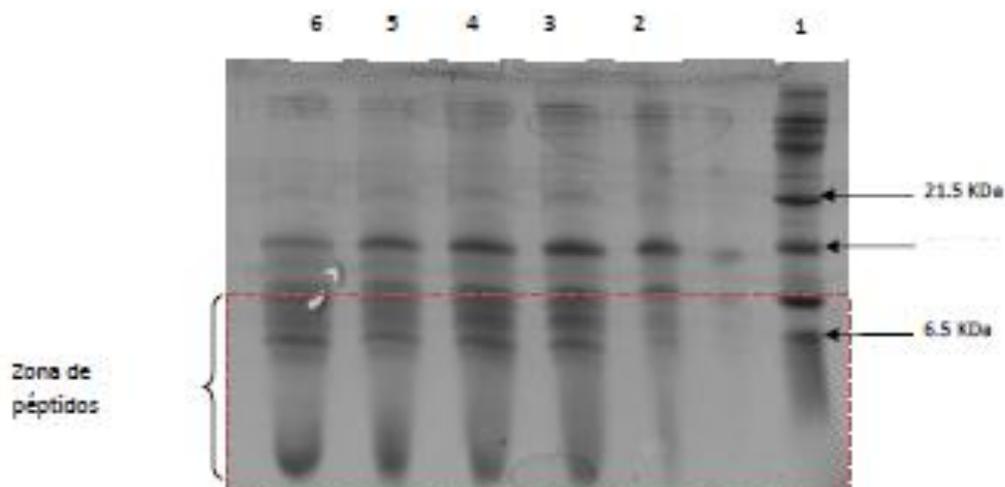


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-page. Queso manchego a temperatura de 14°C. Carril 1: estándar de polipéptidos, 2: día 0, 3: día 7, 4: día 14, 5: día 21, 6: día 28

4. Discusión de resultados

Sobrevivencia

La menor temperatura (4°C) de almacenamiento del queso madurado mostró una fase de adaptación casi nula, pues la sobrevivencia se vio en disminución, lo que indica que el microorganismo tuvo un mayor tiempo de estrés y así mismo no pudo reproducirse y con ello la muerte celular aumentó. En almacenamiento de 14°C se pudo observar una mayor sobrevivencia pues el factor de estrés, la temperatura, permitió la sobrevivencia de los microorganismos y la adaptación de ellos al medio (Tabla 1 y Figura 1).

Varios estudios han mostrado insatisfactoria la supervivencia de los microorganismos probióticos durante la maduración del queso o efectos adversos con el sabor, pero la idoneidad del enfoque de la adición de los probióticos como complementos junto con el cultivo iniciador pareció tener éxito para otros autores. Diferentes enfoques se han aplicado para mejorar la supervivencia de los microorganismos probióticos durante la maduración. Estos enfoques incluyen la microencapsulación, además de factores estimulantes de crecimiento, adición de cultivos preparados de otra manera, y maduración empaquetados a vacío. En 1999, se concedió una patente para la producción de queso probiótico, y en el 2000, el queso probiótico que contenía *Lactobacillus GG* se introdujo en el mercado finlandés. *Lb. GG* es una de las mejores cepas bacterianas probióticas caracterizados con propiedades probióticas bien establecidos, sin embargo, no existen datos sobre sus propiedades probióticas cuando son suministrados en una matriz de queso [1].

Determinación de grupos amino libres por el método de Ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS)

A partir de la determinación de la concentración de grupos amino libres para cada uno de los puntos analizados en la maduración del queso manchego, realizados a diferentes temperaturas (4°C y 14°C) se generó la Figura 2. En este gráfico se observa que a partir del día 0 hay generación de grupos amino libre de 1.224 y 0.933 mg/L para 14°C y 4°C, respectivamente, esto se debe a que la adición del inóculo se realizó antes de la coagulación, y a partir de esto empezó a haber proteólisis. A una temperatura de 14°C la cantidad de grupos amino libres del día 0 al 14 no tubo diferencia significativa, se muestra un incremento significativo del día 14 al 28, teniendo una concentración final de 2.325 mg/L, lo que indica un aumento de los péptidos generados. Para una temperatura de 4°C hay diferencia significativa del día 0 al 21 y del día 21 al 28 no hubo diferencia significativa, llegando a una concentración final de 1.9595

mg/L, durante este periodo se observa una disminución significativa de la concentración de grupos amino libres con respecto a la obtenida a 14°C, lo cual puede deberse a las proteinasas y peptidasas de su sistema proteolítico que no se encuentran a su temperatura y pH óptimo. A una temperatura de 14 °C existe un mayor aumento de los grupos amino libres en comparación a la temperatura de 4°C, esto se debe a que las enzimas del sistema proteolítico lograron adaptarse a las condiciones de temperatura ya que al ser BAL termófilas tienen una mayor actividad proteolítica a esta temperatura [2].

En ambas temperaturas existe una degradación de las proteínas del queso por la acción del sistema proteolítico de las bacterias lácticas y en consecuencia hay generación de péptidos. Esta degradación de las proteínas del queso, principalmente las caseínas, es lo que sustenta el crecimiento de la bacteria, ya que la cantidad de aminoácidos libres que se encuentra principalmente en la leche es insuficiente para que el microorganismo pueda crecer óptimamente [8].

Corrida en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

En las figuras 3 y 4 se muestra la imagen de los geles de electroforesis con las muestras obtenidas durante la maduración del queso manchego a 4 y 14°C, respectivamente, inoculados con *Lactobacillus bulgaricus* 2772y *Lactobacillus rhamnosus* GG. La proteólisis primaria en el queso podría ser definida como aquellos cambios en α_1 -, β -, y γ -caseínas y péptidos, los cuales pueden ser detectados por PAGE [9]. La disminución de las proteínas de leche se observa claramente a través del tiempo. Uno de los objetivos de este trabajo era determinar la capacidad proteolítica de *L. rhamnosus* GGy *Lactobacillus bulgaricus* 2772 en un queso madurado, y con ayuda de la electroforesis, fue posible determinar en las dos diferentes temperaturas de maduración, secuencias peptídicas que oscilan entre 13.97 a 1.32 kDa. Las fracciones menores a 14.4 kDa tienen gran importancia, ya que los péptidos reportados como bioactivos tienen peso moleculares menores a éste [10-12]. A 14°C, se observa una mayor separación de los péptidos menores a 6.5 kDa, lo cual concuerda con la producción de grupos amino libre (Figura 4). La concentración de péptidos siguió aumentando hasta el último día de maduración en ambas temperaturas. La generación de péptidos se genera de caseínas α_1 y β , ya que las bacterias lácticas las hidrolizan con más frecuencia (11,13).

De acuerdo a los análisis de electroforesis se pudo observar una separación completa de péptidos donde hubo aparición y desaparición de péptidos principalmente en lo referente a los péptidos de más de 6.5 kDa. Los péptidos menores a 6.5 kDa aparecieron desde el día 1 y su acumulación es consante, aunque la formación de péptidos de peso molecular más pequeño se observan con mayor concentración en queso madurado a 14°C.

5. Conclusiones

La temperatura de 14°C mostró ser adecuada para la sobrevivencia de los microorganismos, con ello la degradación de proteínas a péptidos de bajo peso molecular que a su vez podrían ser bioactivos aumenta conforme el tiempo, ya que la temperatura permite a los microorganismos adaptarse al medio y con el tiempo sede la multiplicación celular, lo cual se busca en un queso madurado para conferir beneficios al hospedador.

Referencias

- [1] Farnworth, E. (2008). *Handbook of Fermented Functional Foods*. Segunda Edición. CRC Press. Quebec, Canada. 209-260.
- [2] Figueroa, C. (2007). Péptidos bioactivos de la leche. *Utilización del sistema proteolítico de Lactococcus lactis para la generación de péptidos potencialmente bioactivos*. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 29-46.
- [3] Mulero, C.J. et al. (2011). Péptidos bioactivos. *Clinica e Investigación en Arteriosclerosis*, 9.
- [4] Figueroa-González, I., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano G., Gómez-Ruiz L., García-Garibay M., Cruz-Guerrero A. (2010) *Antimicrobial effect of Lactobacillus casei strain Shirota co-cultivated with Escherichia coli UAM0403*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9, 11-16.
- [5] Gasson, M. J. y Vos, W. M. de., 1994, Cap.4 : The proteolytic system of lactic acid bacteria, *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, editor Gasson, M. J.; Vos, W. M. de., ed. Blackie Academic y Professional an Imprint of Chapman y Hall. 169-210
- [6] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- [7] González-Olivares, L. G., Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M. (2011). Liberación de Péptidos Bioactivos por Bacterias Lácticas en Leches Fermentadas Comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10:2, 179-188.
- [8] Juillard, V., Furlan, S., Foucaud, C., Richard, J., (1996) Mixed cultures of proteinase-positive and proteinase-negative strains of *Lactococcus lactis* in milk *Journal of Dairy Science* 79, 964-970
- [9] Pavia, M., Trujillo, B., Guamis, B., and Ferragut V., (2000) Proteolysis in Manchego-Type Cheese Salted by Brine Vacuum Impregnation *Journal of Dairy Science* 83, 1441-1447
- [10] Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1905-1919.
- [11] Visser, S. (1992). Symposium: Proteolytic Enzymes and Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science* 75, 329-350
- [12] Dionysius, D., & Milne, J., (1997) Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *Journal of Dairy Science* 80: 667-664
- [13] Gasson, M. J. y Vos, W. M. de., 1994, Cap.4 : The proteolytic system of lactic acid bacteria, *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, editor Gasson, M. J.; Vos, W. M. de., ed. Blackie Academic y Professional an Imprint of Chapman y Hall. 169-210