

EVALUACIÓN DE LA PROTEÓLISIS DEL QUESO COTIJA REGIÓN DE ORIGEN^{MC} ASOCIADO AL TIEMPO DE MADURACIÓN.

A. L. Alonzo- Paz^a, E. C. Lugo- Cervantes^a, E. G. Tovar-Pérez^b y M. P. Chombo-Morales^a.

^a Unidad de Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, 44270, México. pchombo@ciatej.mx

^b Cátedras – CONACYT - Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos (LIIA), Instituto Tecnológico de Tepic, Av. Tecnológico 2595, Fracc. Lagos del Country, Tepic, Nayarit, 63175, México.

Resumen

En la presente investigación se evaluó el contenido proteico, grado de hidrólisis y perfil electroforético de extractos solubles acuosos de queso Cotija a diferentes tiempos de maduración (8, 30, 60 y 90 días), con la finalidad de dar seguimiento a la proteólisis y liberación de péptidos por la acción de la microbiota autóctona del queso. Con respecto al tiempo de maduración, se observó la disminución en el contenido de proteínas, así como el aumento de la concentración de péptidos en los complejos caseínicos, lo cual se debió a los enlaces peptídicos escindidos durante la maduración. Lo anterior se identificó a través de los perfiles electroforéticos (de proteínas y péptidos) de los complejos. Por lo tanto, se logró determinar la proteólisis que se lleva a cabo durante la maduración del Queso Cotija.

Introducción

El queso Cotija Región de Origen^{MC} es un producto lácteo artesanal, madurado, que se elabora a partir de leche cruda desde hace más de cuatro siglos, en la región serrana (Sierra Jalmich) [1]. Durante la maduración de los quesos la proteólisis es el principal evento bioquímico, la cual implica al desdoblamiento y fraccionamiento de la matriz de caseína en una gama de péptidos y aminoácidos libres, asociados a su calidad sensorial y a sus propiedades bio-funcionales. Dicha proteólisis puede ser catalizada por enzimas a partir de: 1) el coagulante (quimosina, pepsina, o proteinasas ácidas de plantas y hongos); 2) la leche (plasmina, catepsina D y proteinasas de células somáticas); 3) bacterias iniciadoras; 4) bacterias no iniciadoras; o 5) bacterias secundarias [2]. En general, los quesos muestran similares tendencias de proteólisis; sin embargo, las diferencias en la naturaleza del queso, los procesos de fabricación, la temperatura y el tiempo de almacenamiento afectan el patrón proteolítico [3, 4]. En la mayoría de las variedades de queso, la hidrólisis inicial de las caseínas es causada por el coagulante y en menor medida por la plasmina y proteinasas de células somáticas, lo que resulta en la formación de péptidos grandes (insolubles en agua) y péptidos de tamaño intermedio (solubles en agua, que son posteriormente degradados por el coagulante y las enzimas de la flora iniciadora y no iniciadora del queso) en una proteólisis secundaria. En seguida, la producción de pequeños péptidos y aminoácidos libres es causada por la acción de proteinasas microbianas y peptidasas [5]. En el queso Cotija es probable que la fermentación y la maduración estén asociadas a la microbiota autóctona de la leche, a las prácticas artesanales de fabricación y al ambiente [1].

Metodología

Material: Las muestras de queso Cotija empleadas en este estudio fueron elaboradas de acuerdo a la norma NMX735, se maduraron por diferentes tiempos (8, 30, 60 y 90 días) y se conservaron a -20 °C hasta antes de su evaluación.

Obtención del extracto soluble en agua (WSE): Se realizó una extracción 1:10 (p/v) de las muestras de queso en H₂O desionizada a los diferentes tiempos de maduración. Posteriormente se realizó una homogenización a 17500 rpm durante 5 min, centrifugación a 5000 g por 20 min a 4 °C y el sobrenadante obtenido se agitó durante 4 h (4°C). Finalmente las muestras se liofilizaron y se almacenaron a – 20°C [3].

Cuantificación del contenido proteico en el extracto: Se realizó por el método de Bradford en un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific Multiskan GO) [6], previa realización de curva de calibración con BSA (Albúmina Sérica Bovina).

Grado de hidrólisis: Se determinó por cuantificación de los grupos amino primarios que reaccionan con ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS) en un lector de microplacas, previa realización de curva de calibración con L-Leucina, se realizó la hidrólisis total de las muestras con HCl 6N durante 24 horas a 120 °C, se utilizó la fórmula $\% GH = \left(\frac{h}{h_T}\right) \times 100$ para calcular el grado de hidrólisis [7, 8].

Perfil electroforético: Para el monitoreo de la proteólisis se realizó el perfil electroforético SDS-PAGE de las muestras en mini-placas (Modelo Mini-Protean III, Bio-Rad) utilizando un gel concentrador y un gel de separación (4 y 12% p/v de poliacrilamida, respectivamente) [9]. Para la identificación de péptidos se aplicaron las muestras a geles de poliacrilamida en presencia de SDS-PAGE y Tricina [10], se utilizó un gel concentrador, un gel espaciador y un gel de separación (4%, 10% y 16.5% de poliacrilamida, respectivamente).

Resultados

En la (Figura 1), se observa que el contenido proteico en el WSE disminuyó con respecto al tiempo de maduración, obteniéndose este comportamiento desde los 8 días hasta los 90 días de maduración, presentando una disminución de 5.4 a 2.4 mg de proteína/g de queso, lo cual coincide con lo reportado en los primeros meses de maduración en otros quesos (Ragusano, São Jorge y queso artesanal de leche de cabra) [11, 12, 13]. Con respecto a la concentración de péptidos, se observó una relación directa con el tiempo de maduración, es decir una disminución del contenido de proteína y un aumento de la concentración de péptidos liberados (Figura 2).

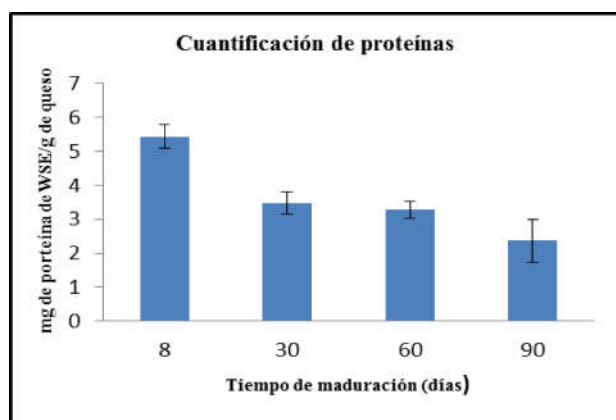


Figura 1. Contenido proteico de las muestras de queso a diferente tiempo de maduración.

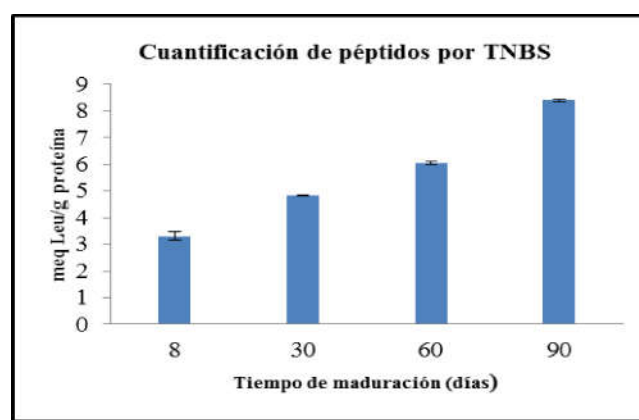


Figura 2. Cuantificación de péptidos de las muestras de queso a diferente tiempo de maduración.

En la (Figura 3) se muestra el incremento en el grado de hidrólisis de las muestras a los diferentes tiempos aumentando los niveles de péptidos liberados debido a la acción de enzimas provenientes de la microbiota del queso, tal comportamiento también fue observado en los quesos (Tipo Brie, Feta y Teleme) por [14, 15].

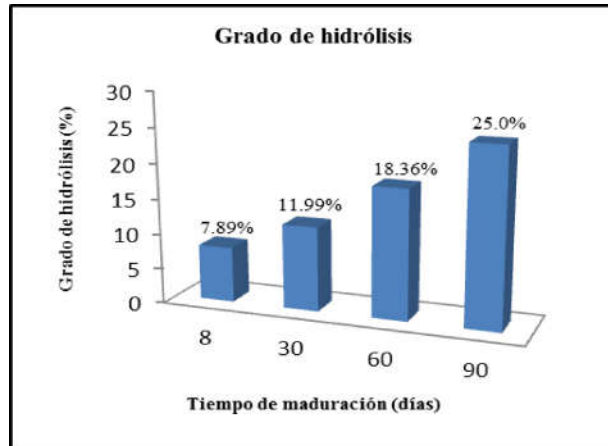


Figura 3. Grado de hidrólisis de las muestras de queso a diferente tiempo de maduración.

En el perfil SDS-PAGE (Figura 4) se identificó la hidrólisis de las proteínas con respecto al tiempo de maduración, obteniéndose distintos perfiles para cada tiempo de maduración: 8 días (32, 30, 26 y 16 kDa), 30 días (31, 27 y 16 kDa), a los 60 días (30 y 27 kDa) y finalmente a los 90 días (30 y 27 kDa) adicionalmente se observó una disminución en la intensidad de las bandas [16, 17]. La hidrólisis de las proteínas caseínicas α_{s1} - y β - se atribuye comúnmente a la actividad proteolítica del cuajo y la plasmina, los cuales están presentes en la cuajada como enzimas residuales, lo anterior explica la disminución en la intensidad de las bandas con forme avanza el tiempo de maduración y concuerda con lo observado por [16, 11, 12].

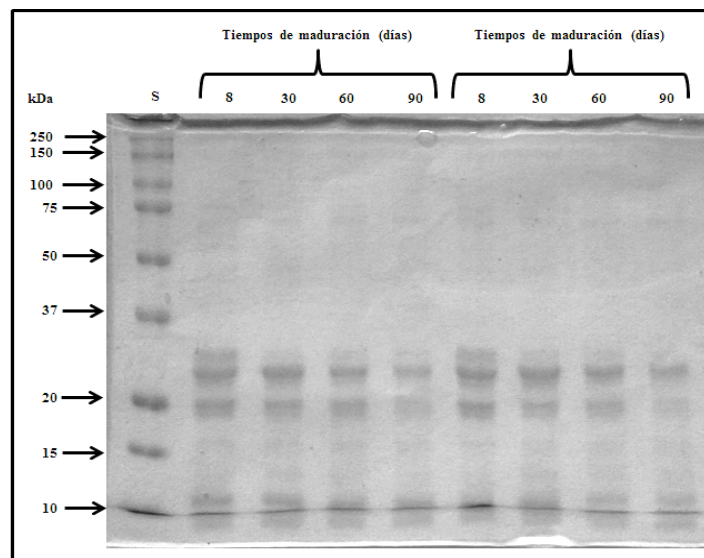


Figura 4. Perfil electroforético SDS-PAGE de las muestras de queso a diferente tiempo de maduración.

Los resultados obtenidos con SDS-PAGE anteriormente presentados (Figura 4) mostraban proteínas de pesos moleculares pequeños por lo cual se realizaron geles de Tris-Tricina-SDS-PAGE mediante el método de [10]. En la (Figura 5) se observa una mayor resolución de las proteínas que no fueron totalmente separadas por SDS-PAGE, obteniendo a los 8 días de maduración Mw (6 – 32 kDa), los cuales van disminuyendo con respecto al tiempo de maduración.

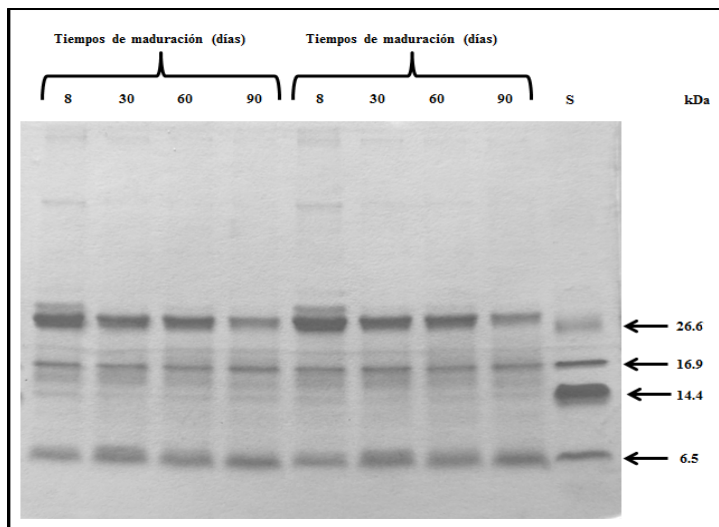


Figura 5. Perfil electroforético Tris-Tricina-SDS-PAGE de las muestras de queso a diferente tiempo de maduración.

En la (Figura 6) se muestra una electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE en la que se agregó 2-mercaptoetanol y se puede observar que en la banda de 16 kDa hubo una mayor separación en todos los tiempos de maduración, esto debido a su capacidad de reducir los puentes disulfuro.

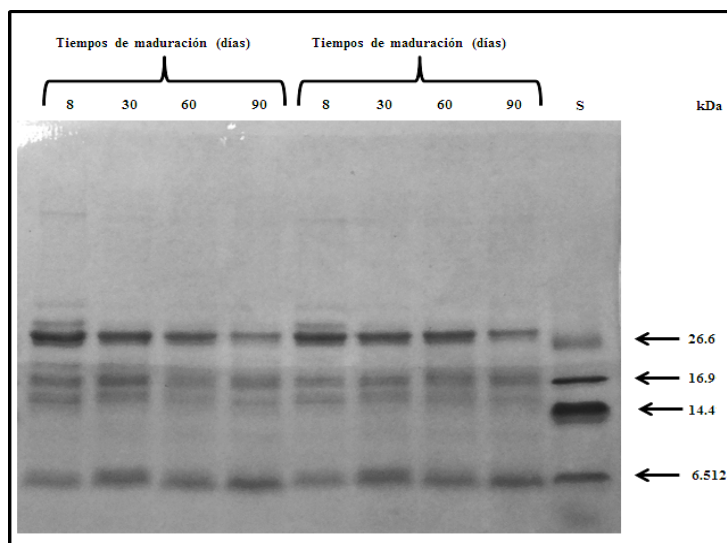


Figura 6. Perfil electroforético Tris-Tricina-SDS-PAGE de las muestras de queso a diferente tiempo de maduración con 2-mercaptoetanol.

Conclusiones

En el estudio se evidenció la proteólisis y formación de péptidos mediante la cuantificación de proteínas por el método de Bradford y la cuantificación de grupos amino libres por el método de TNBS, respectivamente durante la maduración del queso Cotija, mostrando así una tendencia similar a la observada en otros quesos (Ragusano, São Jorge, queso artesanal de leche de cabra, Tipo Brie, Feta y Teleme).

El perfil electroforético mostró que las proteínas se fueron hidrolizando respecto al tiempo de maduración probablemente debido a la actividad de enzimas de microorganismos, y la fisicoquímica propia del queso en parámetros como pH, a_w y contenido de grasa. Se recomienda realizar la identificación utilizando electroforesis en Urea-PAGE.

Este es el primer estudio de la proteólisis del queso Cotija y de la cuantificación de péptidos, a los cuales se pretende evaluar su bio-funcionalidad como inhibidores de la ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina I).

Referencias

1. Chombo-Morales M. P., Kirchmayr M., Gschaedler A., Lugo-Cervantes E., Villanueva-Rodríguez S., "Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE", *LWT – Food Science and Technology*, Vol. 65, p. 1153-1161, 2016.
2. McSweeney P. L. H., "Biochemistry of cheese ripening", *International Journal of Dairy Technology*, Vol. 57, p. 127-144, 2004.
3. Ayyash M. M., Shah N. P., "Proteolysis of low-moisture Mozzarella cheese as affected by substitution of NaCl with KCl", *American Dairy Science Association*, Vol. 94, p. 3769-3777, 2011.
4. Lawrence R. C., Creamer R. K., Gilles J., "Texture Development During Cheese Ripening", *Journal of Dairy Science*, Vol. 70, p. 1748 – 1760, 1987.
5. Fox P. F., Stepaniak L., "Enzymes in cheese technology". *International Dairy Journal*, Vol. 3, p. 509-530, 1993.
6. Bradford M. M., "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, p. 248-254, 1976.
7. Tóvar-Pérez E. G., Guerrero-Legarreta I., Farrés-González A., Soriano-Santos J., "Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain", *Food Chemistry*, Vol. 116, p. 437-444, 2009.
8. Adler-Nissen J., "Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 27, No. 6, p. 1256-1262, 1979.
9. Laemmli U. K., "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". *Nature*, Vol. 227, p. 680-685, 1970.
10. Schägger H., Von Jagow G., "Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa", *Analytical Biochemistry*, Vol 166, p. 368-379, 1987.
11. Kongo J. M., Gomes A. M., Malcata F. X., McSweeney P.L.H., "Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge – a raw milk cheese from the Azores (Portugal)", *Food Chemistry*, Vol. 112, p. 131 – 138, 2009.
12. Gagnaire V., Carpino S., Pediliggieri C., Jardin J., Lortal S., Licitra G., "Uncommonly Thorough Hydrolysis of Peptides during Ripening of Ragusano Cheese Revealed by Tandem Mass Spectrometry", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 59, p. 12443 – 12452, 2011.
13. Sánchez-Macías D., Morales-delaNuez A., Hernández-Castellano L. E., Mendoza-Grimón V., Castro N., Argüello A., "Lipolysis and proteolysis profiles of fresh artisanal goat cheese made with raw milk with 3 different fat contents", *Journal of Dairy Science*, Vol. 94, p. 5786 – 5793, 2011.
14. Polychroniadou A., "A simple procedure using trinitrobenzenesulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese", *Journal of Dairy Research*, Vol. 55, p. 585-596, 1988.
15. Humbert G., Guingamp M. F., Kouomegne R., Linden G., "Measurement of proteolysis in milk and cheese using trinitrobenzene sulphonic acid and a new dissolving reagent", *Journal of Dairy Research*, Vol. 57, p. 143 – 148, 1990).

16. Vicente M. S., Ibáñez F. C., Barcina Y., Barron L. J. R., “Casein breakdown during ripening of Idiazabal cheese: influence of starter and rennet type”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 81, p. 210 – 215, 2000.
17. Sánchez-Macías D., Morales-de-laNuez A., Hernández-Castellano L. E., Mendoza-Grimón V., Castro N., Argüello A., “Lipolysis and proteolysis profiles of fresh artisanal goat cheese made with raw milk with 3 different fat contents”, *Journal of Dairy Science*, Vol. 94, p. 5786 – 5793, 2011.