



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ENRIQUECIDOS EN PÉPTIDOS DE QUESO PRENSA DE GUERRERO

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

Presenta:

JOSÉ ALBERTO MENDOZA CUEVAS

Bajo la dirección de:

DRA. DIANA GUERRA RAMÍREZ



Chapingo, Estado de México, diciembre 2019.



REGISTRADO EN LA ACADÉMIA
NACIONAL DE SERVICIOS ESCOLARES
CONSEJO DE EXAMENES PROFESIONALES

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS
ENRIQUECIDOS EN PÉPTIDOS DE QUESO PRENSA DE GUERRERO**

Tesis realizada por **José Alberto Mendoza Cuevas**, bajo la supervisión del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGIA
AGROALIMENTARIA**

DIRECTOR: 
DRA. DIANA GUERRA RAMÍREZ

ASESOR: 
M.C. ARMANDO SANTOS MORENO

ASESOR: 
M.C. BEATRIZ TERESA ROSAS BARBOSA

ASESOR: 
DRA. MA. CARMEN YBARRA MONCADA

ASESOR: 
DR. EMMANUEL FLORES GIRÓN

Contenido

Lista de cuadros.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Lista de abreviaturas.....	xii
Agradecimientos	xiii
Dedicatorias	xvi
Datos biográficos	xviii
RESUMEN GENERAL.....	xix
GENERAL ABSTRACT.....	xx
1 INTRODUCCION GENERAL.....	1
2 Revisión de literatura	3
2.1.1 Queso.....	3
2.1.2 Clasificación	4
2.1.3 Proceso de elaboración de quesos	4
2.2 Queso de prensa	5
2.3 Microbiota presente en quesos.....	5
2.3.1 Hongos.....	6
2.3.2 Levaduras	6
2.3.3 Bacterias	7
2.4 Cambios bioquímicos en el proceso de maduración de los quesos	11
2.5 Péptidos bioactivos.....	12

2.5.1	Principales propiedades biológicas de los péptidos bioactivos	14
2.6	Bibliografía.....	20
3	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ENRIQUECIDOS EN PÉPTIDOS DE QUESO PRENSA DE CUAJINICUILAPA, GUERRERO	27
	Resumen.....	27
	Abstract	28
3.1	Introducción	29
3.2	Materiales y métodos.....	32
3.2.1	Muestras de queso.....	32
3.2.2	Desgrasado del queso	32
3.2.3	Obtención de extractos enriquecidos en péptidos (EPP)	32
3.2.4	Determinación de proteína total soluble	33
3.2.5	Determinación del grado de hidrólisis (DH).....	33
3.2.6	Actividad antioxidante del queso	34
3.2.7	Análisis estadístico.....	35
3.3	Resultados y discusión	37
3.3.1	Determinación de proteína total soluble durante la maduración del queso	37
3.3.2	Contenido de proteína total por quesería.....	38
3.3.3	Determinación del grado de hidrólisis	39
3.3.4	Actividad antioxidante durante la maduración del queso	41
3.3.5	Capacidad antioxidante por quesería.....	43
3.4	Conclusión	48
3.5	Bibliografía.....	49

4	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ENRIQUECIDOS EN PÉPTIDOS DE QUESO DE PRENSA DE CUAJINICUILAPA, GUERRERO ...	53
	Resumen.....	53
	Abstract	54
4.1	Introducción	55
4.2	Materiales y métodos.....	57
4.2.1	Extractos enriquecidos péptidos de queso de prensa	57
4.2.2	Prueba de esterilidad de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa	57
4.2.3	Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos enriquecidos en péptidos de queso prensa	57
4.2.4	Recuento del inóculo utilizado.....	59
4.2.5	Verificación de viabilidad e identidad de los aislamientos	59
4.2.6	Análisis estadístico.....	60
4.3	Resultados y discusión	61
4.3.1	Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa	61
4.4	Conclusiones	69
4.5	Agradecimientos	70
4.6	Bibliografía.....	71
5	Anexo	75
	Análisis microbiológico de quesos artesanales, en diferentes etapas de maduración, de Cuajinicuilapa Guerrero.....	76
	Resumen.....	76
	Abstract	77
5.1	Introducción	78

5.2	Materiales y métodos.....	80
5.2.1	Muestras de queso.....	80
5.2.2	Preparación de la muestra	80
5.2.3	Determinación de microorganismos aerobios (BMA)	80
5.2.4	Determinación de coliformes totales (CT)	81
5.2.5	Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>	81
5.2.6	Determinación de bacterias ácido lácticas (BAL)	81
5.2.7	Análisis estadístico.....	81
5.3	Resultados y discusión	83
5.3.1	Determinación de bacterias mesófilas aerobios (BMA) durante el tiempo de maduración del queso.....	83
5.3.2	Determinación de coliformes totales (CT) durante el tiempo de maduración del queso	86
5.3.3	Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> durante el tiempo de maduración del queso	88
5.3.4	Determinación de bacterias ácido lácticas (BAL)	90
5.4	Conclusión	93
5.5	Bibliografía.....	94

Lista de cuadros

Cuadro 1. Actividad antimicrobiana de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero contra <i>Listeria monocytogenes</i> Scott a en los diferentes tiempos de maduración.	65
--	----

Lista de figuras

Figura 1. Metabolismos de las BAL homofermentativas Fuente: Parra Huertas (2010).	8
Figura 2. Metabolismo de las BAL heterofermentativas Fuente: Parra Huertas (2010).	9
Figura 3. El papel de las BAL durante el proceso de fermentación o maduración del queso. Diferentes mecanismos y factores se encuentran involucrados durante la liberación de estos compuestos bioactivos. Fuente: Santiago-López et al. (2018).	13
Figura 4. Papel de los péptidos bioactivos de la leche en el sistema corporal. Fuente: Mohanty et al. (2016).	14
Figura 6. Contenido de proteína total de extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería.	37
Figura 7. Contenido de proteína total en extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero, a los 30 días de maduración (T1). Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).	38
Figura 8. Contenido de proteína total de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa por quesería. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).	39
Figura 9. Grado de hidrólisis (% GH) de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero en el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería.	40

Figura 10. Grado de hidrólisis (%GH) de los extractos enriquecidos en péptidos de queso prensa de Guerrero, a los 30 días de maduración (T1). Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$). 40

Figura 11. Capacidad antioxidante (ABTS) de extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero en el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. 42

Figura 12. Capacidad antioxidante (ABTS) de extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero, a los 60 días de maduración (T2). Las barras de indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$). 42

Figura 13. Capacidad antioxidante (ORAC) de los extractos enriquecidos en péptidos de queso prensa de Guerrero durante el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. . 43

Figura 14. Capacidad antioxidante (ORAC) de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero a los 30 días de maduración (T1). Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$). 44

Figura 15. Capacidad antioxidante (ABTS) de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero por quesería. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$). 44

Figura 16. Capacidad antioxidante (ORAC) de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero por quesería. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos

seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).....	45
Figura 17. Resultados de la determinación antimicrobiana de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero. Se presentan de izquierda a derecha las pruebas para <i>Salmonella</i> San Diego, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922 y <i>Listeria monocytogenes</i> Scott. Halo de inhibición presentado en las 4 cajas, corresponde al control positivo ampicilina 10 μg	61
Figura 18. Halos de inhibición del desarrollo de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott por contacto de extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero. Simple vista.....	64
Figura 19. Halo de inhibición del desarrollo de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott por contacto con extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero. Quesería C (T1).....	66
Figura 20 Actividad antimicrobiana de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero en el tiempo de maduración contra <i>L. monocytogenes</i> Scott. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería.	67
Figura 21. Recuento microbiológico de bacterias mesófilas aerobias en queso de prensa de Guerrero durante el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos recolectados en las cuatro queserías.	84
Figura 22. Bacterias mesófilas aerobias en queso de prensa, a los 0 y 90 días de maduración (T1 y T3). Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en las cuatro queserías. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).	84
Figura 23. Recuento microbiológico de coliformes totales en queso prensa de Guerrero. Durante el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos recolectados en las cuatro queserías.	86
Figura 24. Coliformes totales en queso de prensa, a los 0 y 90 días de maduración (T1 y T3). Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en las	

cuatro queserías. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).	87
Figura 25. Recuento microbiológico de <i>S. aureus</i> en queso de prensa de Guerrero durante el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos recolectados en las cuatro queserías.	88
Figura 26. <i>S. aureus</i> en queso de prensa, a los 0 y 90 días de maduración (T1 y T3). Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en las cuatro queserías. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).	89
Figura 27. Recuento de bacterias ácido lácticas en queso de prensa de Guerrero durante el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos recolectados en las cuatro queserías.	91
Figura 28. Bacterias ácido lácticas en queso de prensa, a los 0 y 90 días de maduración (T1 y T3) Las barra indican el error estándar de los quesos colectados en las cuatro queserías. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).	91

Lista de abreviaturas

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

AMH: Agar Müller Hinton

ASTEL: Agar soya tripticaseína con 0.6 % de extracto de levadura

BAL: Bacterias ácido lácticas

BMA: Bacterias mesófilas aerobias

CT: Coliformes totales

EEP: Extractos enriquecidos en péptidos

ORAC: Capacidad de absorción de radicales de Oxígeno

PAM: Péptidos antimicrobianos

SDS: Dodecilsulfato sódico

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría, y por acogerme durante dos años.

Al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, por la oportunidad de pertenecer a la 16 generación de maestría y por todos los conocimientos adquiridos durante mi estancia.

A la Dr. Diana Guerra Ramírez por su apoyo incondicional, paciencia, tiempo y su dirección. Infinitas gracias por depositar su confianza en mí y en mi trabajo; de igual manera por compartir sus conocimientos durante estos más de dos años, que me han ayudado a crecer como profesional, pero más aún como persona.

Al M.C Armando Santos Moreno por su apoyo, tiempo y disposición; por haber creído en mis capacidades y habilidades para poder aprender y desenvolverme durante la maestría y el trabajo de tesis.

A la M.C. Beatriz Teresa Rosas Barbosa por su apoyo incondicional desde mi etapa de Licenciatura. Gracias por impulsarme a seguir adelante y por la oportunidad de adentrarme al mundo de la investigación. Por verle siempre el lado positivo a las cosas.

A la Dra. Ma. Carmen Ybarra por su atención, apoyo y asesorías durante mi estancia en el posgrado.

Al Dr. Emmanuel Flores Girón por su atención y sus recomendaciones para esta investigación.

A la M.C. Verénice Torres Salas por todo el tiempo, comprensión, apoyo incondicional; así como sus acertados consejos, sugerencias, comentarios y aportaciones al trabajo de tesis, los cuales fueron de vital para culminar.

A la M.C. Guillermina Hernández Rodríguez por su apoyo incondicional, tiempo, consejos, sugerencias, comentarios y aportaciones a este trabajo de investigación. Pero principalmente por tu amistad y compañerismo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Preparatoria Agrícola gracias por su apoyo y consejos. Pero especialmente a: Guille, Magali Cañarejo y Paulina González con quienes compartí muchas experiencias y horas de trabajo.

A mis compañeros de la XVI de la MCyTA, especialmente a Dulce, Diana, Dalila y Silvia por los gratos momentos de aprendizaje. Gracias por hacer mi estancia fuera más amena.

A la estudiante de la Licenciatura en Ciencia de los Alimentos Teresa Lías por su ayuda y apoyo incondicional durante el desarrollo de la etapa de la actividad antimicrobiana.

A mis colegas y amigos de la VIII generación de la Licenciatura en Ciencia de los Alimentos: Marina, Sarai, Karina, Anabel, Alan, Jaqui, H, Caro, Day, Perli, Ani, Ciro, Gris, Gabi, Karla, Nancy. ¡¡Muchas gracias!!, por darme ánimos cuando pensé en claudicar. Sarai!! Siempre estaré muy agradecido por el apoyo brindado en diseño y logísticos.

A la M.C. Marlene Hernández, muchísimas gracias por estar al pendiente de mí; asimismo agradezco infinitamente por darme ánimos para seguir adelante. Gracias por confiar en mí. ¡Arriba Sonora!

A la M.C. Verónica Estela Olivares, agradezco al destino por habernos hecho coincidir. Gracias, pero muchas gracias por darme ánimos cuando los necesitaba, por ser mi confidente y amiga, de igual manera por apoyarme en mis

locuras. Sin lugar a duda eres de las personas que marcaron esta etapa llamada maestría.

A mi tía Valentina, Tío Félix y mis primas porque ellas me sembraron la semillita de la curiosidad por estudiar y seguir preparándome.

A mi tía Samira y mis primos Fabby y Jesús, por su apoyo incondicional, por dame ánimos cuando los necesitaba, así como estar al pendiente de mí. ¡Gracias!

A mi tío Ángel Romero y Tía Martha Cuevas por su apoyo incondicional, por darme animo cuando lo necesite. Muchas gracias tios!!

Agradezco infinitamente a mis padres: Diohema y José Alberto; y Hermanos: Jazmín y Sergio. Por su apoyo incondicional, comprensión, pero sobre todas las cosas por darme ánimo, coraje y valentía para enfrentar las vicisitudes de la etapa de maestría y no claudicar.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas que de manera indirecta aportaron un granito de arena para concluir con éxito esta investigación.

Dedicatorias

A mis padres Díoheima Cuevas y José Alberto Mendoza por todo el cariño, amor, apoyo y confianza incondicional que me han brindado a lo largo de la vida. Gracias por estar siempre para mí cuando los necesito. Por apoyarme en cada una de las decisiones sin juzgar cuales fueran estas. Agradezco cada uno de los valores que me han inculcado, los cuales me han ayudado a ser una mejor persona día con día. Sé que el camino no ha sido fácil, pero gracias a ustedes este ha sido más ligero, lo cual me ha permitido lograr algunas metas, como la es de este documento. Este logro está dedicado para ustedes que son mi principal motor de vida.

A mis hermanos Jazmín y Sergio Mendoza por todo el cariño, amor, confianza y amistad que me han brindado. Gracias por estar para mí cuando necesitaba palabras de aliento, las cuales hicieron que no me rindieran y siguiera adelante con mi sueño de la maestría. Gracias por creer en mí. Recuerden que los hermanos estaremos siempre en las caídas, así como en los éxitos. En las caídas para ayudar a reconstruir los pedazos que queden de alguno de nosotros, sin importar cual sea el descalabro; y en los éxitos para mantener los pies sobre la tierra.

A mis abuelos: Ciria † y Efrén †; Antonia † y Leopoldo †, aunque ya no se encuentran con nosotros, los cuales me enseñaron a hacer una mejor persona, gracias por los recuerdos y enseñanzas para conmigo.

A mis tías (o), primas (os) y demás familiares que estuvieron al pendiente de mí, durante esta etapa. Infinitas gracias por todas sus palabras de ánimo.

A mis amigos y colegas de la Licenciatura en Ciencia de los alimentos de la 8° generación. Gracias por formar parte de esta travesía, sin duda alguna ustedes también fueron un pilar de suma importancia.

A todos mis amigos con los que tuve la maravillosa oportunidad de coincidir en esta etapa: Vero, Maggi, Pauli, Guille, Vere, Nata, Tere, César, Sandoval. Infinitas gracias por todos los bellos momentos que me regalaron.

Montserrat gracias por estar allí cuando necesitaba una opinión, en verdad aprecio el cariño que me has brindado.

Marlene gracias por confiar en mí, desde el primer día que te dije que aplicaría a un posgrado, recuerdo que no dudaste de mi capacidad, por eso también este logro lo comparto contigo.

A mis compañeros de maestría: Dulce, Diana, Silvia, Dalila, Perlita, Lupita, Carla y Madgiel.

Ludo y Mario, gracias por escucharme y darme palabras de aliento cuando las necesite. Ustedes también son parte esencial de que lograra este objetivo.

“No abandones las ansias de hacer algo extraordinario, no dejes de creer que las palabras y poesías pueden cambiar al mundo. Pase lo que pase nuestra esencia está intacta. Somos seres llenos de pasión. La vida es un desierto y oasis, nos derriba, nos lastima, nos enseña, nos convierte en protagonistas de nuestra propia historia”. Walt Whitman.

Datos biográficos



José Alberto Mendoza Cuevas nació en Acapulco, Guerrero, México, el 28 de junio de 1992. Realizó sus estudios de educación media superior en la Preparatoria 8, perteneciente a la Universidad de Guadalajara. Posteriormente estudio la Licenciatura en Ciencia de los Alimentos en la Universidad de Guadalajara (2011-2015). Se desempeñó como administrador del Sistema de Gestión de la Inocuidad de los alimentos en la empresa “Compañía especializada de productos al consumo S.A de CV” (2015-2017).

RESUMEN GENERAL

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ENRIQUECIDOS EN PEPTIDOS DE QUESO PRENSA DEL ESTADO DE GUERRERO

La leche y sus derivados son catalogados como alimentos de alto valor nutricional, entre los componentes de estos alimentos, los péptidos, liberados por diferentes procesos de hidrólisis de la caseína, ejercen diversas actividades biológicas tales como: antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva, antiproliferativa, antitrombótica. El objetivo de esta investigación fue establecer el potencial antioxidante y antimicrobiano de quesos artesanales en diferentes etapas de maduración, mediante la determinación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas en sus extractos enriquecidos en péptidos. Las muestras de quesos sin madurar y madurados a 30, 60 y 90 días, fueron adquiridos en cuatro queserías del municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero, México. Para determinar la calidad microbiológica (anexo) de los quesos se determinó la presencia de coliformes totales, bacterias mesófilas aerobias, bacterias ácido lácticas y *Staphylococcus aureus* en Placas 3M™ Petrifilm™, Los extractos liofilizados enriquecidos en péptidos (EEP) se obtuvieron, mezclando una muestra de queso desengrasado con agua en proporción (1:3, p/v) ajustando a pH 4.6, después de centrifugar el sobrenadante fue liofilizado. La actividad antioxidante fue evaluada en los EPP por los ensayos ABTS y ORAC; la actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método del antibiograma disco en placa para: *Listeria monocytogenes* Scott, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella* San Diego. De acuerdo con los resultados contenido de microorganismos disminuyó conforme avanzó el tiempo de maduración. En general la actividad antioxidante de todos los extractos enriquecidos en péptidos mostró una mayor actividad antioxidante a los 30 días de maduración. Asimismo, todos los extractos enriquecidos en péptidos presentaron actividad inhibitoria contra de *Listeria monocytogenes* Scott. En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que los péptidos en el queso de prensa tienen potencial bioactivo.

Palabras claves: queso prensa, antioxidante, maduración, antimicrobiana

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: LCA. José Alberto Mendoza Cuevas

Director de Tesis: Dra. Diana Guerra Ramírez

GENERAL ABSTRACT

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PEPTIDE-ENRICHED EXTRACTS OF PRENSA CHEESE FROM THE STATE OF GUERRERO

Milk and dairy products are classified as high nutritional value foods. Among the components of these foods, the peptides, released by different casein hydrolysis processes, carry out several biological activities such as antioxidant, antimicrobial, antihypertensive, antiproliferative, antithrombotic. The aim of this research is to establish the antioxidant and antimicrobial potential of artisanal cheeses at different stages of ripening, by determining the antioxidant and antimicrobial properties in their peptide-enriched extracts. Samples of unripened cheeses and ripening at 30, 60 and 90 days were acquired in four cheese factories in the municipality of Cuajinicuilapa, Guerrero, Mexico. To determine the microbiological quality of the cheeses (attached), the presence of total coliforms, aerobic mesophilic bacteria, lactic acid bacteria and *Staphylococcus aureus*, 3M™ Petrifilm™ Plates were used. Lyophilized peptide-enriched extracts (LPEEs) were obtained by mixing a sample of defatted cheese with water in proportion (1: 3, w / v) and adjusting to pH 4.6. The supernatant was centrifuged and then lyophilized. The antioxidant activity was evaluated in the PEEs by the ABTS and ORAC tests. Antimicrobial activity was evaluated using the disk-plate antibiogram method for *Listeria monocytogenes* Scott, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella* San Diego. According to these results, microorganisms content decreased as ripening time progressed. In the main, the antioxidant activity of all peptide-enriched extracts showed increased antioxidant activity at 30 days of ripening. Likewise, all extracts enriched in peptides evidenced inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* Scott. Finally, the results obtained suggested that the peptides in the prensa cheese have bioactive potential.

Keywords: prensa cheese, antioxidant, ripening, antimicrobial.

Thesis : Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo

Author: LCA. José Alberto Mendoza Cuevas

Advisor: Dra. Diana Guerra Ramírez

1 INTRODUCCION GENERAL

En los últimos años se ha demostrado que la leche y sus derivados, además de tener un alto valor nutritivo, poseen ciertos compuestos bioactivos capaces de ejercer un gran número de actividades biológicas, benéficas para la salud. Se ha documentado que los péptidos, liberados por diferentes procesos de hidrólisis de las proteínas, tienen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antihipertensivas, antiproliferativas, antitrombóticas (Lucarini, 2017; Park & Nam, 2015; Sánchez y Vázquez, 2017; Santiago-López *et al.*, 2018; Sultan, Huma, Butt, Aleem, Abbas, 2016). Estos compuestos deben ser liberados para que su actividad se desempeñe, debido a que se encuentran dentro de una proteína madre (Bottesini, Paoletta, Lambertini, Galavera, Tedeschi, Dossena, Marchelli & Sforza, 2013; Chakrabarti, Guha & Majumder, 2018; Mora, Aristoy & Toldrá, 2018). Actualmente, los quesos artesanales, han atraído el interés de investigadores debido a que son una fuente de péptidos bioactivos. Las caseínas, proteínas constituidas por alrededor de 200 aminoácidos podrían dar origen a una gran diversidad de péptidos, dichos compuestos, además de otros, están involucrados en las propiedades benéficas atribuidas a dichos quesos. Entre los factores que contribuyen a la generación de péptidos en los quesos se encuentran: las enzimas proteolíticas propias de la leche, la actividad proteolítica del agente coagulante residual, las proteasas y las peptidasas provenientes de las bacterias ácido lácticas. Estas últimas, son las principales generadoras de dichos péptidos, ya que están presentes durante el almacenamiento y maduración de los quesos (Silva, Pihlanto & Malacata, 2006). Por otro lado, La actividad de los péptidos bioactivos depende de su peso molecular, estructura,

composición, secuencia de aminoácidos (Barac *et al.*, 2019; Barac *et al.*, 2017; Sah *et al.*, 2016).

La principal característica de los péptidos antioxidantes es impedir que otras moléculas se unan a especies reactivas del oxígeno, al interactuar más rápido con los radicales libres que estos con el resto de las moléculas presentes en el microambiente de la membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. Hoy en día se sabe que los péptidos que contienen residuos de aminoácidos tales como: Ala, Arg, Asp, Cys, His, Leu, Met, Pro, Trp y Tyr, presentan mayor actividad antioxidante (Ruiz *et al.*, 2013; Mora *et al.*, 2018).

Los péptidos antimicrobianos pueden actuar contra un amplio espectro bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Los efectos provocados por este tipo de péptidos dependen de su carga neta positiva, provocando la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos y propiciando la muerte celular (Mohanty, Mohapatra, Misra, & Sahu, 2016).

En diversas comunidades de México, se fabrican quesos artesanales a partir de leche cruda, rica en bacterias ácido lácticas. Por lo tanto, es muy probable que durante la maduración de estos productos se liberen péptidos con alguna propiedad biológica de interés. El propósito del presente trabajo fue establecer el potencial antioxidante y antimicrobiano de quesos de prensa, sin madurar y a diferentes tiempos de maduración, mediante la determinación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas en sus extractos enriquecidos en péptidos. En México son escasas las investigaciones acerca del potencial benéfico para la salud de los quesos artesanales, por lo que esta investigación aportará elementos para recomendar a los productores en qué etapa de maduración sus productos son apropiados para el consumo.

2 Revisión de literatura

2.1.1 Queso

El queso además de ser un alimento esencial utilizado en la gastronomía local de diferentes sociedades alrededor del mundo es una rica fuente de diversos nutrientes esenciales, en particular de proteínas, grasas, vitaminas y minerales (López-Expósito, Miralles, Amigo, & Hernández-Ledesma, 2017; Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2012). Es definido como el producto fresco o madurado de la precipitación de las caseínas (Santiago-López *et al.*, 2018). Actualmente existen aproximadamente 2,000 variedades de quesos, dicha diversidad se encuentra dada por los procesos tecnológicos empleados para su elaboración. De igual manera las diferencias en textura, aroma y sabor son debidos a factores como: origen de la leche, relación grasa-proteína, tipos de cultivos y de enzima coagulante; la forma y tamaño del queso, condiciones de maduración (Badui Dergal, 2006; Kongo & Malcata, 2015).

De acuerdo con la NOM 223 (2018), el queso es el producto blando, semiduro, duro y extraduro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto; en dicho producto, la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no deben ser superiores a la de la leche. Un queso se puede obtener mediante la coagulación total o parcial de la proteína de leche entera, descremada parcialmente descremada, crema, mantequilla, o de cualquier combinación de estos productos, por acción de un cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación. Es importante mencionar, que la elaboración de un queso consiste en la concentración de proteína láctea, especialmente la porción de caseína; por consiguiente, el contenido de proteína del queso debe ser más alto que el de la mezcla de los productos lácteos utilizados para su elaboración.

Walstra *et al.* (2006) Definió al queso con un enfoque fisicoquímico como un sistema tridimensional tipo gel, este se encuentra conformado primordialmente por caseína la cual está en la forma en un complejo caseinato fosfato cálcico, que, mediante la coagulación, engloba glóbulos de grasas, agua, lactosa, albuminas, globulinas, minerales, vitaminas y otras sustancias menores que contiene la leche, las cuales permanecen absorbidas en el sistema.

Los quesos madurados, de acuerdo con la norma 233, se caracteriza por ser de pasta dura, semidura o blanda y puede tener o no corteza; la maduración es mediante adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para inducir en él cambios bioquímicos y físicos característicos de los quesos madurados, lo que permite prolongar su vida de anaquel, esta puede o no requerir condiciones de refrigeración.

2.1.2 Clasificación

Los quesos pueden ser clasificados teniendo en cuenta diversos aspectos durante el proceso de su elaboración (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2012; Santiago-López *et al.*, 2018).

- Tipo de materia prima: leche de vaca, oveja, cabra, etc.
- Tipo de coagulación: acida, enzimática o mixta
- Tipo de pasta: untable, fiable, hilada, etc.
- Contenido de humedad: fresco (87-73 %), blando (76-48%), semiduro (52-42%), duro (40-30%) y extraduro ($\leq 30\%$)
- Contenido de grasa: doble (85-65%), crema (65-50%), grasas (50-40%), semigrasas (25-10 %) y magros ($\leq 10\%$).
- Por el grado de maduración: frescos (6 días), semi-maduros (40 días) y maduros (≥ 70 días).
- Por agentes de maduración: bacterias, mohos, la combinación de ambos.

2.1.3 Proceso de elaboración de quesos

En general el proceso de elaboración de quesos implica 3 etapas primordiales (Bottesini *et al.*, 2013; Fox *et al.*, 2017):

1.- Coagulación de la leche, este fenómeno se lleva a cabo por la desestabilización de las caseínas originando así la aglomeración de las micelas libres y la formación de un gel en donde el resto de los componentes de la leche quedan atrapados. Este proceso comprende dos fases, en la primera, el cuajo o quimosina comienza con la hidrólisis del enlace peptídico entre la fenilalanina (Phe) y la metionina (Met) en la posición 105 y 106 de la K-caseína, liberándose así el glicomacropéptido. Mientras en la segunda fase: las micelas se combinan entre sí, mediante el fosfato de calcio, originando la formación del gel o coagulo.

2.-Sinéresis, durante este proceso se elimina el lactosuero, por lo cual el gel obtenido debe ser sometido a un proceso mecánico y físico con el fin de separar la cuajada del suero. Por lo que se emplean procesos tales como el cortado del coagulo en pequeños cubos, cocción y/o prensado.

3.- Maduración o afinación de la pasta, en esta etapa puede ser menor a una semana o máximo 12 meses, esto depende del queso en cuestión. Durante esta fase el queso experimenta ciertas reacciones bioquímicas que se transcriben en atributos sensoriales del queso (sabor, textura, aroma, etc.). Agrupándose estas reacciones en primarias (lipólisis, proteólisis, y metabolismo de la lactosa, lactato, citrato), y secundarias (metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos).

2.2 Queso de prensa

El queso de prensa o también conocido como queso costeño es un queso semi-madurado, hasta tres meses de maduración. Se elabora con leche de vaca, sin pasteurizar. Su color va del blanco al amarillo, tiene forma rectangular, su consistencia es firme, y su peso es de 1 a 14 kg por pieza. Este producto se comercializa principalmente en la región de la Costa Chica del estado de Guerrero, en el municipio de Cuajinicuilapa (Sandoval-Alarcón, 2016).

2.3 Microbiota presente en quesos

La diversidad microbiana presente en los quesos juega un papel vital en el desarrollo de las características sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas, siendo en las etapas de proceso y maduración de los quesos, son estas

comunidades microbianas se interrelacionan entre sí y con el sustrato (queso). Entre las principales comunidades microbianas se encuentran los hongos, levaduras y bacterias (Neviani, Bottari, Lazzi, & Gatti, 2013; Yeluri Jonnala, McSweeney, Sheehan, & Cotter, 2018).

2.3.1 Hongos

En general, la presencia de hongos es considerada indeseable en los quesos debido a la generación de ciertas enzimas, las cuales pueden modificar de forma negativa las propiedades organolépticas y sensoriales de estos. Por otra parte, producen metabolitos secundarios (micotoxinas) que representan un riesgo a la salud (Cotter & Beresford, 2017; Irlinger, Helinck, & Jany, 2017). Sin embargo, algunos tipos de hongos son capaces de usar el ácido láctico como fuente de crecimiento provocando así un incremento en el pH y como consecuencia una proteólisis, la cual confiere suavidad al queso. Además, los hongos tienen la capacidad de generar ciertas sustancias a través de su metabolismo, tales como las metilcetonas así como sus alcoholes secundarios, obtenidos de la β -oxidación de los ácidos grasos, los cuales contribuyen en el sabor. Por otra parte, la producción de ésteres, aldehídos y aminas responsables del aroma (Cotter & Beresford, 2017; Irlinger *et al.*, 2017).

2.3.2 Levaduras

Estos microorganismos, al igual que los hongos pueden ser indeseables debido a que pueden producir alteraciones, sin embargo, en el proceso de maduración de quesos las levaduras provocan un incremento en el pH debido a que utilizan los ácidos orgánicos que se generan como producto del metabolismo del cultivo iniciador (Cardozo, Fusco, & Carrasco, 2017).

Algunas especies de levaduras dan origen a la producción de precursores de aromas (aminoácidos, ácidos orgánicos y ésteres), que pueden contribuir en los cambios de textura (Cardoso *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2017).

2.3.3 Bacterias

Entre las bacterias que componen la microbiota de los quesos se encuentran las ácido lácticas, ácido lácticas no iniciadoras, bacterias del ácido propiónico, bacterias deterioradoras y patógenas. El grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) ejerce un rol de vital importancia en procesos de fermentación, su función consiste en fermentar la glucosa para la obtención de ácido láctico. Asimismo, son responsables de generar metabolitos secundarios como alcoholes, aldehídos, ácidos orgánicos, ésteres, péptidos, etc., que contribuyen para al desarrollo de la textura y sabor en el queso (Bintsis, 2018; del Carmen *et al.*, 2013; Santiago-López *et al.*, 2018).

Las BAL son un grupo diverso de bacterias Gram positivas, no esporuladas, generalmente inmóviles, catalasa negativa, microaerofílicas, ácidos tolerantes, con forma de coco o bacilos. Este grupo se encuentra conformado por más de 20 géneros, teniendo un grupo central conformado por *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Bennani, Mchiouer, Rokni, & Meziane, 2017; Bintsis, 2018; Parra Huertas, 2010). De acuerdo con sus productos finales se pueden clasificar en dos grupos: homofermentativas y heterofermentativas (Khalid, 2011; Parra Huertas, 2010; Ramírez-Ramírez, Rosas-Ulloa, Velázquez-González, Ulloa, & Arce-Romero, 2011). El grupo de BAL homofermentativas se caracteriza por la generación de ácido láctico, más del 85 %, como producto final de la fermentación. Utilizando la ruta de Embden –Meyerhof (glucolisis) para su obtención, Figura 1. Estas poseen enzimas aldosa y hexosa isomerasa que les ayudan a obtener dicho metabolito o producto final. Algunos géneros que pertenecientes a esta clasificación son: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pedicococcus*, algunos *Lactobacillus* (Khalid, 2011; Parra Huertas, 2010; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2011).

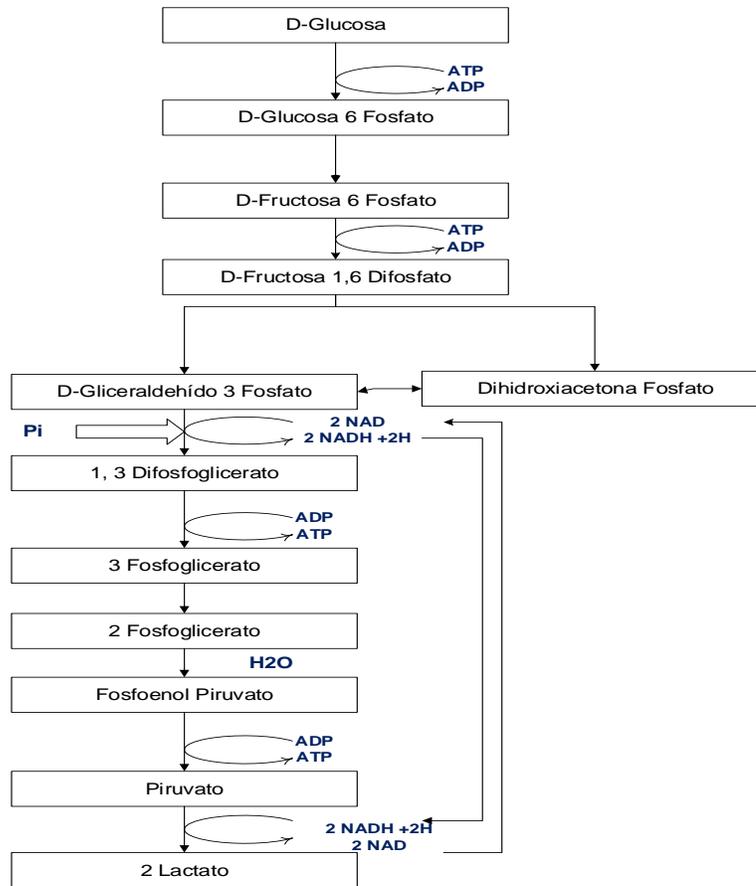


Figura 1. Metabolismos de las BAL homofermentativas Fuente: Parra Huertas (2010). El grupo de BAL heterofermentativas, además de producir ácido láctico (aproximadamente el 50 %), generan otros productos finales como etanol, aldehídos y dióxido de carbono. Transforman las hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa, (Figura 2). Entre los géneros que pertenecen a esta clasificación se encuentran: *Leconostoc*, *Weisella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, (Khalid, 2011; Parra Huertas, 2010; Ramírez-Ramírez *et al.*, 2011).

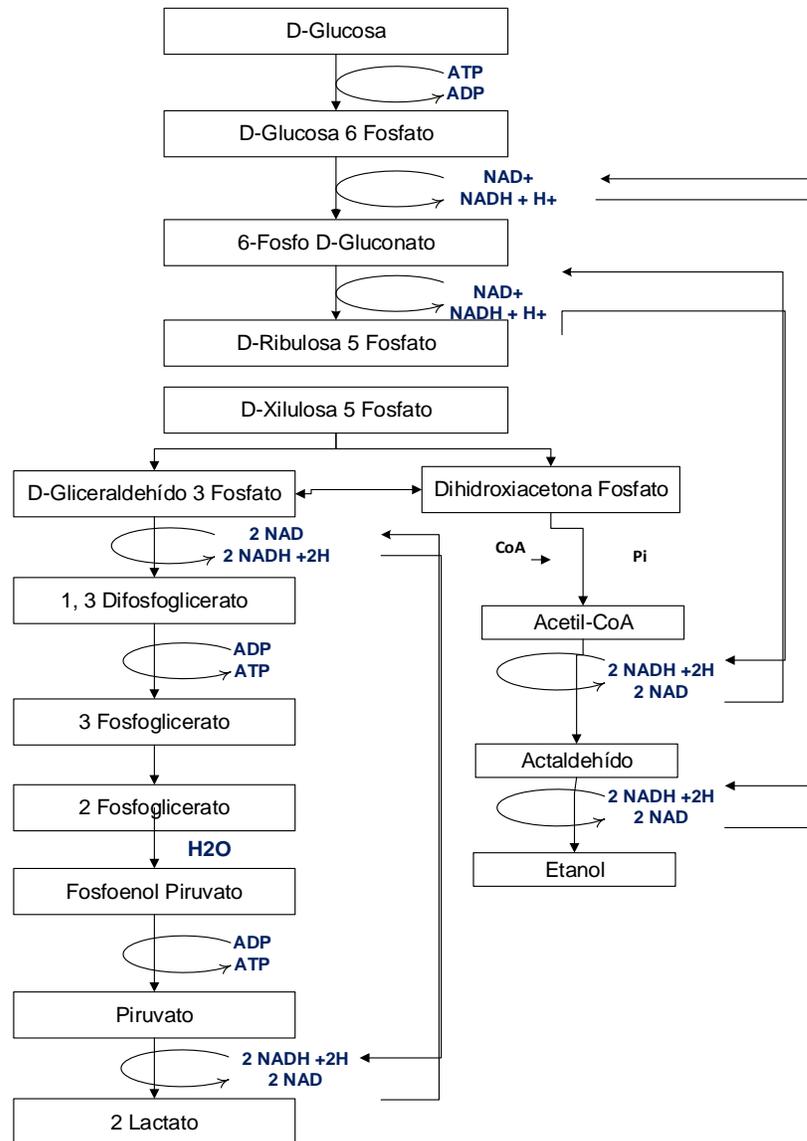


Figura 2. Metabolismo de las BAL heterofermentativas Fuente: Parra Huertas (2010).

Las BAL se encuentran en una gran diversidad de productos fermentados, además de impartirles características organolépticas, pueden ejercer actividades antagónicas contra microorganismos patógenos debido a las sustancias antimicrobianas generadas durante su metabolismo (Bennani *et al.*, 2017; Khalid, 2011; Parra Huertas, 2010).

Después del grupo de las BAL, las bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB, por sus siglas en inglés) son la microbiota dominante en los quesos. Diversos investigadores mencionan que se desarrollan de forma espontánea en

todos los quesos independientemente de la forma de elaboración (artesanales o industriales). Pueden encontrarse en la mayoría de las etapas de proceso preparación del queso debido a su presencia desde la materia prima (Leche) y en el medio ambiente de las queserías (Gatti, Bottari, Lazzi, Neviani, & Mucchetti, 2014; Gobbetti, De Angelis, Di Cagno, Mancini, & Fox, 2015; Losito *et al.*, 2014). El grupo de NSLAB se compone generalmente de *Lactobacillus* mesófilos facultativos y estrictos como son: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus*, *L. brevis*, no obstante, puede incluir otros *Lactobacillus* homofermentativos tales como: *Pedococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc* (Irlinger *et al.*, 2017; Parente, Cogan, & Powell, 2017). A las NSLAB se les atribuye más del 80 % de los defectos en el queso, asociados con la post-acidificación, formación de sabores indeseables, hendiduras, gas. Sin embargo, se tiene el conocimiento de que algunas NSLAB ayudan a la formación de sabores agradables y alargan la vida útil del queso, debido a la producción de compuestos antimicrobianos y a la competencia y antagonismo contra microorganismos indeseables y patógenos (Gobbetti *et al.*, 2015).

Por otro lado, las bacterias del ácido propiónico (BAP) se caracterizan por aparecer en algunas variedades de quesos justo al final del periodo de maduración. Son las responsables de los típicos ojos de los quesos suizos, que aparecen como consecuencia de la acumulación de gas durante la fermentación de los azúcares y lactato a propionato, acetato, agua y dióxido de carbono. Las BAP se dividen en dos grupos: bacterias del ácido propiónico cutáneas y bacterias del ácido propiónico clásicas (Irlinger *et al.*, 2017).

El grupo de bacterias deterioradoras es el causante de los cambios organolépticos y físicos, convirtiéndose en defectos en los quesos. El crecimiento de microorganismos psicrotróficos se encuentra asociado a la proliferación de sabores a malta, rancidez, amargo, fruta, podrido; mientras que las bacterias de los géneros *Clostridium* son las responsables de la rancidez e hinchazón. Entretanto las bacterias de los géneros *Pseudomona*, *Acinetobacter*, *Rahnella*, *Serratia* y *Klebsiella* están asociadas a la formación de coloración amarilla y café

en los quesos, asimismo exhiben una alta actividad proteolítica y lipolítica la cual origina sabores desagradables, así como arrugas y una subsecuente exfoliación en la superficie del queso (Irlinger *et al.*, 2017).

Las bacterias patógenas pueden estar presentes en los productos lácteos y provocan alrededor del 5 % de las enfermedades transmitidas por alimentos. En quesos frescos, la mayoría de las infecciones se encuentran asociadas a enterobacterias patógenas como *Salmonella* o *E. coli*, mientras tanto en quesos semi-madurados o madurados *S. aureus* y *L. monocytogenes* son los principales microorganismos patógenos (Fox *et al.*, 2017; Irlinger *et al.*, 2017).

2.4 Cambios bioquímicos en el proceso de maduración de los quesos

La maduración del queso es una etapa compleja durante la cual se llevan a cabo numerosas reacciones que involucran la glucólisis, lipólisis y proteólisis, así como varias transformaciones químicas y bioquímicas de componentes de la leche a compuestos de bajo peso molecular (Fox *et al.*, 2017; Santiago-López *et al.*, 2018).

La proteólisis es el proceso bioquímico de mayor importancia llevado a cabo durante la maduración. Es un proceso enzimático en el cual las caseínas son hidrolizadas primeramente por la actividad residual del coagulante que se encuentra retenido en la cuajada, asimismo por la plasmina y por otras enzimas proteolíticas provenientes de las NSLAB generando péptidos de tamaños intermedio, que posteriormente son hidrolizados por proteasas y peptidasas nativas de las BAL obteniendo así péptidos cortos y aminoácidos (Bottesini *et al.*, 2013; Fox *et al.*, 2017).

En esta etapa se presentan cambios bióticos y abióticos en el queso que repercuten de forma directa sobre la microbiota. La humedad disminuye, se favorece el incremento de la acidez como consecuencia del desarrollo y actividad microbiana, limitando así el crecimiento de otros microorganismos (Fox *et al.*, 2017).

2.5 Péptidos bioactivos

La leche presenta diversos compuestos bioactivos, los cuales pueden ejercer diversas funciones sobre el cuerpo humano (Figura 3). Siendo uno de estos compuestos bioactivos las proteínas que además de desempeñar su función como nutrientes, de igual manera son consideradas promotoras de péptidos bioactivos que pueden ejercer funciones en el organismo (Figura 4) (Lucarini, 2017; Park & Nam, 2015; Sánchez & Vázquez, 2017; Santiago-López *et al.*, 2018).

Los péptidos bioactivos son definidos como fragmentos específicos de proteínas compuestos por hasta 20 residuos de aminoácidos, los cuales tras su liberación pueden influir en los procesos biológicos y ejercer un efecto positivo en la salud (Bottesini *et al.*, 2013; Chakrabarti, Guha, & Majumder, 2018; Mohanty, Mohapatra, Misra, & Sahu, 2016; Mora, Aristoy, & Taldrá, 2018).

Dichos péptidos pueden ser liberados por diferentes maneras tales como: hidrólisis enzimática (pepsina, tripsina, quimotripsina o pancreatina), fermentación con cultivos iniciadores, proteólisis originada por BAL, hidrólisis por la acción de microorganismos o por enzimas provenientes de plantas, o en la elaboración de alimentos (Bottesini *et al.*, 2013; Mohammadian, Salami, Emam-Djomeh, & Alavi, 2017; Pritchard, Phillips, & Kailasapathy, 2010; Sah, Vasiljevic, McKechnie, & Donkor, 2016; Sultan, Huma, Butt, Aleem, & Abbas, 2016).

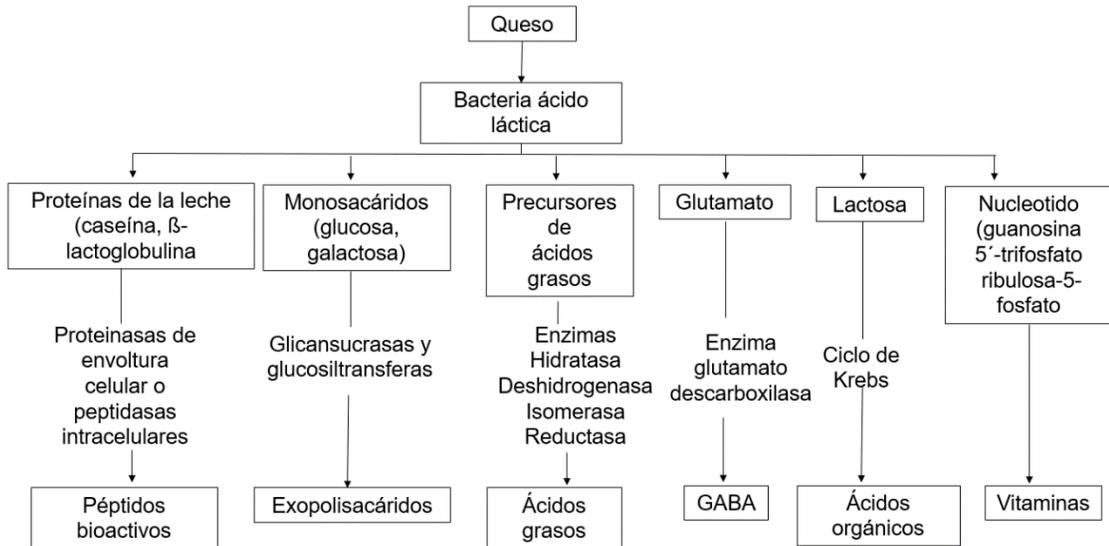


Figura 3. El papel de las BAL durante el proceso de fermentación o maduración del queso. Diferentes mecanismos y factores se encuentran involucrados durante la liberación de estos compuestos bioactivos. Fuente: Santiago-López *et al.* (2018).

Hoy en día se han descrito ciertas actividades biológicas que pueden ejercer los péptidos bioactivos: antioxidantes, antimicrobianas, antihipertensivas, antitrombóticas, inmunomoduladores, opioides, entre otras más (Bottesini *et al.*, 2013; Pritchard *et al.*, 2010; Santiago-López *et al.*, 2018; Sultan *et al.*, 2016). La actividad de los péptidos bioactivos se encuentra relacionada con los siguientes factores: peso molecular, estructura, la composición y secuencia de aminoácidos.

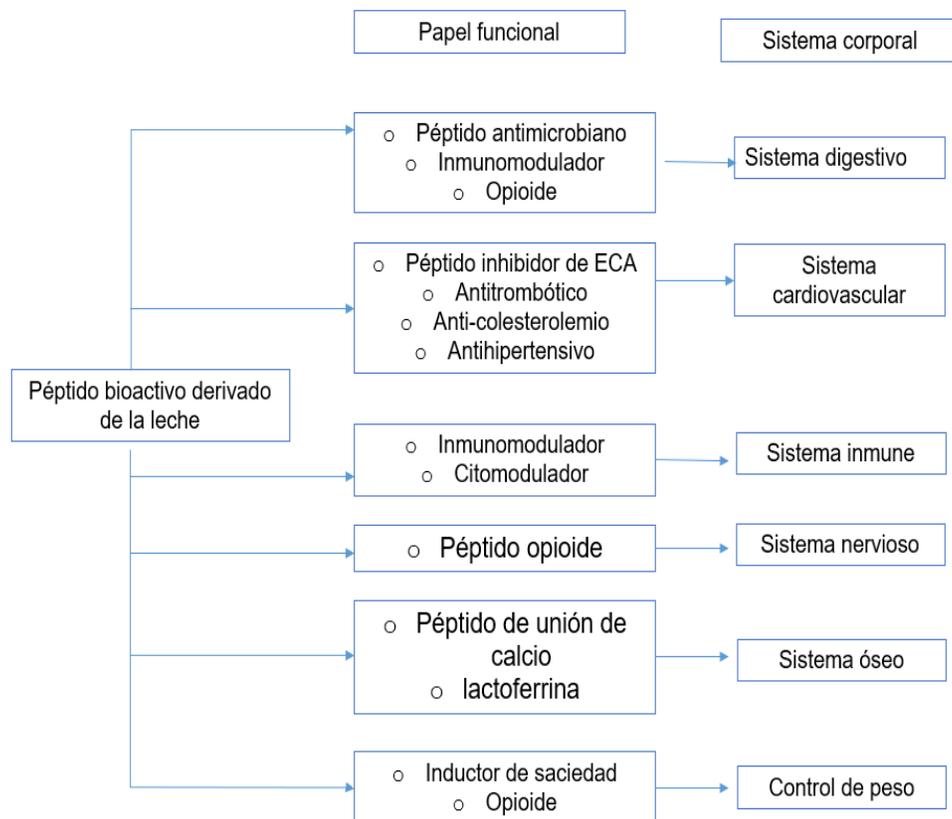


Figura 4. Papel de los péptidos bioactivos de la leche en el sistema corporal. Fuente: Mohanty *et al.* (2016).

2.5.1 Principales propiedades biológicas de los péptidos bioactivos

Los péptidos que poseen actividad antihipertensiva influyen en el sistema de renina angiotensina inhibiendo la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y por consecuencia previenen la hipertensión (Bottesini *et al.*, 2013; Mora *et al.*, 2018). De acuerdo con diversos investigadores la regulación de la presión arterial depende del sistema de la renina angiotensina. La renina actúa sobre la angiotensina, obteniendo así la angiotensina I, la cual posteriormente se convierte en angiotensina II, que es un potente vasoconstrictor, por la ACE (Bottesini *et al.*, 2013; Sánchez & Vázquez, 2017; Sultan *et al.*, 2016). De acuerdo con Mohanty *et al.* (2016) y Mohammadian *et al.* (2017) los péptidos inhibidores de la ECA son di o tripéptidos que contienen prolina, lisina o arginina en el carbono terminal. Asimismo, señalan que estos péptidos comúnmente contienen

entre 2-12 residuos de aminoácidos, no obstante, se han reportado péptidos mayores a de 27 residuos de aminoácidos con esta actividad biológica. Hoy en día se han identificado en las proteínas de la leche (caseínas y proteínas del lactosuero) péptidos inhibidores de ECA. Por ejemplo, en las fracciones (177-183) y (193-202) de la β -caseína, al igual que en (194-199) de α_{s1} -caseína; (58-76), (88-90), (102-104), (133-138) de la β -CN, (162-164) α_{s1} -CN, (17-19) β -lg, Siendo estas fracciones las que en ensayo in vitro han mostrado inhibir la enzima ECA (Mohammadian, Salami *et al.*, 2017; Mohanty *et al.*, 2016). La secuencia de aminoácidos Ile-Pro-Pro proveniente de la caseína y Val-Pro-Pro de la β -caseína son los péptidos antihipertensivos con mayor actividad (Bottesini *et al.*, 2013). La actividad antihipertensiva ha sido estudiada en diferentes quesos alrededor del mundo: Feta, Roquefort, Mozzarella, Italico, Cheddar, Emmental, Manchego, Gouda, Roca, Cabrales, Brie, entre otros. Mientras que en México: Queso fresco, Queso bola de Ocasingo, Queso Cotija (López-Expósito *et al.*, 2017; Santiago-López *et al.*, 2018).

Los péptidos con actividad antitrombótica tienen la capacidad de reducir o inhibir la formación de coágulos en la sangre, por tal motivo ayudan a prevenir la trombosis (Park & Nam, 2015; Sultan *et al.*, 2016). De acuerdo con Sultan *et al.* (2016) en la leche hay péptidos dentro de la secuencia del glicomacropéptido que son liberados a través de la hidrólisis de la κ -caseína por la renina o quimosina, lo cual les confiere la habilidad para inhibir la agregación plaquetaria y la unión del fibrinógeno con los receptores plaquetarios de la superficie y por ende evitar la formación de trombos. Esta habilidad para inhibir la agregación puede estar relacionada con la similitud entre la coagulación de la leche y de la sangre. En la leche esta interacción se lleva a cabo por la κ -caseína y quimosina o renina, mientras que la coagulación de la sangre se debe a la de fibrinógeno y trombina. En la leche de vaca se han reportado ciertas fracciones de la caseína que poseen la habilidad de reducir o impedir la formación de trombos: (106-116), (106-112), (113-116). Igualmente se han identificado en diversos productos lácteos tales como el yogurt (113-116) proveniente de la κ -caseína, en extractos solubles de leches fermentadas (Sultan *et al.*, 2016).

De acuerdo con Park & Nam (2015) un opioide es cualquier químico que presenta características farmacológicas similares al opio. Los péptidos con esta actividad biológica presentan características farmacológicas similares a las de un opioide. Estos pueden derivar de encefalinas, endorfinas y dinorfinas, igualmente tienen gran afinidad para interactuar con receptores opioides, los cuales pueden tener una actividad agonista o antagónica, generalmente ubicados en los principales sistemas nervioso, endocrino e inmunológico. Los péptidos con estas características contienen entre 5-31 residuos de aminoácidos (López-Expósito *et al.*, 2017; Mora *et al.*, 2018; Sánchez & Vázquez, 2017). Por otro lado. Entre los péptidos con actividad opioide se encuentran las β -casomorfina, derivado de la β -caseína (López-Expósito *et al.*, 2017). En los extractos de los quesos Brie y Gouda se identificaron los péptidos BCM7 y BCM5, respectivamente, mientras en quesos semimaduros fueron detectadas ambas β -casomorfina (Edamski, Gouda y Kaszakan).

Los péptidos con actividad inmunomoduladora son capaces de estimular el sistema inmune, por lo cual exhiben un efecto protector sobre el organismo (Mohanty *et al.*, 2016). Los péptidos bioactivos inmunomoduladores provenientes de las proteínas de la leche se encuentran relacionadas a la estimulación y proliferación de linfocitos en células humanas, así como de la actividad fagocítica de macrófagos, síntesis de anticuerpos y regulación de citocinas (Mohanty *et al.*, 2016; Mora *et al.*, 2018).

Los péptidos antiproliferativos tienen como función principal inhibir la reproducción celular en especial de células cancerosas (Gashti & Prakash, 2016).

Las proteínas de la leche como la lactoferrina y lactoferricina pueden suprimir el crecimiento de células cancerígenas tanto *in vitro* como *in vivo*, al ser utilizado como inductores apoptóticos en el desarrollo tumoral (López-Expósito *et al.*, 2017). Asimismo, a la fecha no han reportado dicha actividad en quesos. Sin embargo, Sah *et al.* (2016) señalaron que existe la presencia de varios péptidos con esta actividad en las proteínas de la leche, como las fracciones (17-22) y (41-45) proveniente de la κ -CN.

Según Ruiz *et al.* (2013) la principal característica de los péptidos antioxidantes es que ayudan a impedir que otras moléculas se unan a especies reactivas del oxígeno, al interactuar más rápido con los radicales libres que estos con el resto de las moléculas presentes en el microambiente de la membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. Los péptidos que poseen esta actividad presentan pesos moleculares que oscilan entre 200 a 2000 Da (Mora *et al.*, 2018; Ruiz *et al.*, 2013), por lo general se encuentran conformados por 5 a 11 residuos de aminoácidos siendo los hidrofóbicos los de mayor presencia en dichas secuencias de residuos (Mohammadian *et al.*, 2017; Mora *et al.*, 2018; Ruiz *et al.*, 2013). La actividad antioxidante de los péptidos depende de diversos factores, tales como la composición y secuencia de aminoácidos, la hidrofobicidad, la estructura física y el peso molecular (Barac *et al.*, 2019; Barac, Pešić, Vučić, Vasić, & Smiljanić, 2017; Sah *et al.*, 2016). Igualmente, Sah *et al.* (2016) indican que los péptidos que contienen residuos de aminoácidos como: Ala, Arg, Asp, Cys, His, Leu, Met, Pro, Trp y Tyr, muestran mayor actividad antioxidante. En la actualidad el mecanismo que llevan a cabo tanto los péptidos y proteínas para esta actividad no está muy claro. Algunos investigadores le atribuyen este efecto a un solo aminoácido en la secuencia de la proteína, mientras que otros indican que se debe al resultado de interacciones entre las múltiples cadenas laterales de los aminoácidos (Barac *et al.*, 2017). De acuerdo con el modo de acción, la actividad antioxidante se clasifica en dos grupos: primarios y secundarios.

Los antioxidantes primarios son capaces de reducir o neutralizar los radicales libres mediante la donación de hidrogeno, y los secundarios son aquellos aptos de transferir un electrón para reducir un oxidante. Para la medición de la actividad antioxidante son utilizados diversos ensayos como: ABTS, FRAP, DPPH, TRAP, entre otros (Mora *et al.*, 2018; Sah *et al.*, 2016). En los últimos años se ha reportado la actividad antioxidante en diversos quesos artesanales: Cheddar, Coalho, Parmigiano-Reggiano, Cottage, queso tipo Burgos, queso tipo Feta, queso tipo Roquefort, queso tipo Pecorino, queso blanco en salmuera, queso Tulum, queso crema de Chiapas, Cotija Los resultados obtenidos en estos

trabajos sugieren que la actividad antioxidante en quesos depende principalmente a los días de maduración del queso (Barac *et al.*, 2017; Hernández-Galán *et al.*, 2016; López-Expósito *et al.*, 2017; Öztürk & Akin, 2017; Santiago-López *et al.*, 2018).

Finalmente, los péptidos con actividad antimicrobiana contienen entre 10 a 100 residuos de aminoácidos en su secuencia. Asimismo, son considerados moléculas anfipáticas; los péptidos antimicrobianos se pueden agrupar como catiónicos y aniónicos. Los primeros tienen la particularidad de interactuar con moléculas cargadas negativamente; mientras que los aniónicos interactúan por la formación de puentes salinos o amidación del carbono terminal (López-Pérez, Grimsey, Bourne, Mikut, & Hilpert, 2017; Peters, Shirliff, & Jabra-Rizk, 2010). Existen diversos mecanismos de acción de estos péptidos. Uno de ellos tiene como objetivo común desestabilizar la membrana causando la muerte celular. Pero también pueden inhibir a la proteína, o la síntesis de la pared celular, por la intervención en la síntesis del ADN o ARN, o al relacionarse con ciertos compuestos intracelulares (Bahar & Ren, 2013; Guilhelmelli *et al.*, 2013; Rai, Pandit, Gaikwad, & Kövics, 2016).

Mohammadian *et al.* (2017) señalan que diferentes factores como la carga, la hidrofobicidad, el momento hidrofóbico, así como la conformación y la naturaleza de los péptidos pueden contribuir a la actividad antimicrobiana.

Los péptidos antimicrobianos pueden actuar contra un amplio espectro de microorganismos, siendo las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, así como levaduras y hongos filamentosos (Mohammadian *et al.*, 2017; Peters *et al.*, 2010). Existen diversos estudios en los que se indican que los péptidos derivados de la caseína presentan actividad inhibitoria contra diversas bacterias como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Porphyromas gingivalis*, *Streptococcus sobrinus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Sánchez & Vázquez, 2017). Por otra parte, en la última década se ha comenzado a estudiar la actividad antimicrobiana en péptidos provenientes de extractos solubles en agua de quesos como: Mozzarella, Cheddar, Asiago d'Alleva, Pecorino Romano, Canestrato Pugliese,

Crescenza, Caprino del Piemonte, Caciacavallo Emmental de Savoie, entre otros. En estos estudios se ha mostrado evidencia de inhibición sobre diversos microorganismos (López-Expósito *et al.*, 2017).

2.6 Bibliografía

- Alejo-Martínez, K., Ortiz-Hernández, M., Recino-Metelin, B. R., González-Cortés, N., & Jiménez-Vera, R. (2015). Tiempo de maduración y perfil microbiológico del queso de poro artesanal. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(5), 15–24. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1097/01.chi.0000205707.78818.a6>
- Amran, A. M., & Abbas, A. A. (2011). Microbiological Changes and Determination of Some Chemical Characteristics for Local Yemeni Cheese. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 4(2), 93–100.
- Badui Dergal, S. (2006). *Salvador Badui Dergal. Química de los alimentos*.
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- Barac, M., Pešić, M., Vučić, T., Vasić, M., & Smiljanić, M. (2017). White cheeses as a potential source of bioactive peptides. *Mljekarstvo*, 67(1), 3–16. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2017.0101>
- Barac, M., Vucic, T., Zilic, S., Pesic, M., Sokovic, M., Petrovic, J., Milincic, D. (2019). The effect of in vitro digestion on antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial potentials of traditional Serbian white-brined cheeses. *Foods*, 8(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/foods8030094>
- Bennani, S., Mchiouer, K., Rokni, Y., & Meziane, M. (2017). Characterisation and Identification of lactic acid bacteria isolated from Moroccan raw cow's milk. *Materials and Environmental Sciences*, 8(S), 4934–4944.
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria: their applications in foods. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 6(2), 89–94. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00182>
- Bottesini, C., Paoletta, S., Lambertini, F., Galaverna, G., Tedeschi, T., Dossena, A., Sforza, S. (2013). Antioxidant capacity of water soluble extracts from Parmigiano-Reggiano cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(8), 953–958. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.821696>
- Cardoso, V. M., Borelli, B. M., Lara, C. A., Soares, M. A., Pataro, C., Bodevan, E. C., & Rosa, C. A. (2015). The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Research International*, 69, 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.040>
- Cardozo, M. C., Fusco, Á. J. V., & Carrasco, M. S. (2017). Yeast microbiota in artisanal cheeses from Corrientes, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(2), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.006>
- Castro-Castillo, G., Martínez-Castañeda, F. E., Martínez-Campos, Á. R., & Espinoza-Ortega, A. (2013). Characterization of the native microflora of

traditional Oaxaca cheese in three phases of production. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, (33:105-109), 105–109.

- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S., & Mañas, P. (2010). Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 140(1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.017>
- Chakrabarti, S., Guha, S., & Majumder, K. (2018). Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. *Nutrients*, 10(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu10111738>
- Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., & Le Loir, Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 131(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.032>
- Correa Morales, J. C., & Salazar Uribe, J. C. (2016). *Introducción a los modelos mixtos*.
- Cotter, P. D., & Beresford, T. P. (2017). Microbiome Changes During Ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* (Fourth Edi, Vol. 1, pp. 389–409). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00015-6>
- del Carmen, S., de Moreno de LeBlanc, A., Miyoshi, A., Azevedo, V., Bermúdez-Humarán, L. G., Langella, P., & LeBlanc, J. G. (2013). Anti-Inflammatory Properties of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Bioactive Food as Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*, 581–600. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397156-2.00225-8>
- Flores-Magallón, R., Oliva-Hernández, A. A., & Narváez-Zapata, A. A. (2011). Characterization of microbial traits involved with the elaboration of the Cotija cheese. *Food Science and Biotechnology*, 20(4), 997–1003. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0137-z>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Guinee, T. P., ... McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of Cheese Science*. *Fundamentals of Cheese Science*. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_19
- Gashti, A. B., & Prakash, H. S. (2016). Characterization of antioxidant and antiproliferative activities of Indian salmon (*Eleutheronema tetradactylum*) protein hydrolysates. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(5), 102–108.
- Gatti, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E., & Mucchetti, G. (2014). Invited review:

- Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal of Dairy Science*, 97(2), 573–591. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7187>
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Mancini, L., & Fox, P. F. (2015). Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.016>
- González-Montiel, L., & Franco-Fernández, M. J. (2015). Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. *Brazilian Journal of Food Technology*, 18(3), 250–257. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.7514>
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L. da S., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. M. (2013). Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>
- Haddad, M., & Yamani, M. (2017). Microbiological Quality of Soft White Cheese Produced Traditionally in Jordan. *Journal of Food Processing & Technology*, 8(12), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000706>
- Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., Picque, D., Spinnler, H. E., López-del-Castillo Lozano, M., & Martín del Campo, S. T. (2016). ACEI and antioxidant peptides release during ripening of Mexican Cotija hard cheese. *Journal of Food Research*, 5(3), 85–91. <https://doi.org/10.5539/jfr.v5n3p85>
- Irlinger, F., Helinck, S., & Jany, J. L. (2017). Secondary and Adjunct Cultures. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* (Fourth Edition, Vol. 1, pp. 273–300). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00011-9>
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 1(3), 1–13.
- Kirdar, S. S., Köse, S., Yurdakul, O., & Ocak, E. (2017). a Survey on the Microbiological and Chemical Characteristics of Akçakatik Cheese in the West. *European International Journal of Science and Technology*, 6(7), 25–35. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/320448293_A_SURVEY_ON_THE_MICROBIOLOGICAL_AND_CHEMICAL_CHARACTERISTICS_OF_AKÇAKATIK_CHEESE_IN_THE_WEST_MEDITERRANEAN_REGION
- Kongo, J. M., & Malcata, F. X. (2015). Cheese: Types of Cheeses - Soft. In *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed., pp. 768–773). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00132-X>
- López-Expósito, I., Miralles, B., Amigo, L., & Hernández-Ledesma, B. (2017).

- Health Effects of Cheese Components with a Focus on Bioactive Peptides. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 239–273). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00011-X>
- López-Pérez, P. M., Grimsey, E., Bourne, L., Mikut, R., & Hilpert, K. (2017). Screening and optimizing antimicrobial peptides by using SPOT-synthesis. *Frontiers in Chemistry*, 5(APR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00025>
- Losito, F., Arienzo, A., Bottini, G., Priolisi, F. R., Mari, A., & Antonini, G. (2014). Microbiological safety and quality of Mozzarella cheese assessed by the microbiological survey method. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 1–10. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7026>
- Lucarini, M. (2017). Bioactive Peptides in Milk: From Encrypted Sequences to Nutraceutical Aspects. *Beverages*, 3(4), 1–10. <https://doi.org/10.3390/beverages3030041>
- Mirzaei, H. (2011). Microbiological changes in Lighvan cheese throughout its manufacture and ripening. *African Journal of Microbiology Research*, 5(13), 1609–1614. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.111>
- Mohammadian, M., Salami, M., Emam-Djomeh, Z., & Alavi, F. (2017). Nutraceutical properties of dairy bioactive peptides. In *Dairy in Human Health and Disease across the Lifespan* (pp. 325–342). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809868-4.00025-X>
- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., & Sahu, P. S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.005>
- Mora, L., Aristoy, M. ., & Taldrá, F. (2018). Bioactive peptides. *Secondary Metabolite and Functional Food Components: Role in Health and Disease*, 1–9. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>
- Neviani, E., Bottari, B., Lazzi, C., & Gatti, M. (2013). New developments in the study of the microbiota of raw-milk, long-ripened cheeses by molecular methods: The case of Grana Padano and Parmigiano Reggiano. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00036>
- NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018. (2019). Secretaria de economia. *NORMA Oficial Mexicana NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018, Queso-Denominación, Especificaciones, Información Comercial Y Métodos de Prueba.*, 10.
- Ortiz-Hernández, M., Jiménez-Vera, R., Ara-Chan, S. del C., González-Cortés, N., Alejo-Martínez, K., Perera-García, M. A., & Lozano-López, E. (2016). Calidad Sanitaria del Queso Crema Elaborado Artesanalmente en Tenosique

- , Tabasco. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(2), 1–11. <https://doi.org/2334-2501>
- Öztürk, H. İ., & Akin, N. (2017). Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk tulum cheeses during ripening. *Food Science and Technology*, 38(4), 674–682. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.11917>
- Panda, A., Ghosh, K., Ray, M., Nandi, S. K., Parua (Mondal), S., Bera, D., ... Mondal, K. C. (2016). Ethnic preparation and quality assessment of Chhurpi, a home-made cheese of Ladakh, India. *Journal of Ethnic Foods*, 3(4), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.jef.2016.12.004>
- Parente, E., Cogan, T. M., & Powell, I. B. (2017). Starter Cultures: General Aspects. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* (Fourth Edi, Vol. 1, pp. 201–226). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00008-9>
- Park, Y. W., & Nam, M. S. (2015). Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(6), 831–840. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.6.831>
- Parra Huertas, R. (2010). Review. bacterias acido lacticas: papel funcional en los alimentos. *Bioteconología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial: BSAA*, 8(1), 93–105.
- Peters, B. M., Shirliff, M. E., & Jabra-Rizk, M. A. (2010). Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens*, 6(10), 4–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001067>
- Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5), 1545–1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>
- Rai, M., Pandit, R., Gaikwad, S., & Kövics, G. (2016). Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3381–3394. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2318-5>
- Ramírez-López, C., & Vélez-Ruiz, J. F. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 131–148.
- Ramírez-Ramirez, J. C., Rosas-Ulloa, P., Velázquez-González, M. Y. ., Ulloa, J. A., & Arce-Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 7, 1–16.
- Ramírez-Rivera, E. de J., Ramón-Canul, L. G., Torres-Hernández, G., Herrera-

- Corredor, J. A., Juárez-Barrientos, J. M., Rodríguez-Miranda, J., ... Díaz-Rivera, P. (2018). Tipificación de quesos madurados de cabra producidos en la zona montañosa central del estado de Veracruz, México. *Agrociencia*, 52(1), 15–34.
- Ruiz, J., Segura, M., Betancur, D., & Chel, L. (2013). Proteínas y péptidos biológicamente activos con potencial nutracéutico. In *Bioactividad De Péptidos Derivados De Proteínas Alimentarias* (pp. 11–27).
- Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., & Donkor, O. N. (2016). Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(5), 726–740. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1217825>
- Sainz, R. C., & Montero, G. (2004). Caso Práctico De Modelización Del Crecimiento Y Producción De Las Masas Forestales, 321, 317–321.
- Sánchez-Gamboa, C., Hicks-Pérez, L., Gutiérrez-Méndez, N., Heredia, N., García, S., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2018). Microbiological changes during ripening of Chihuahua cheese manufactured with raw milk and its seasonal variations. *Foods*, 7(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods7090153>
- Sánchez-Valdés, J. J., Colín-Navarro, V., López-González, F., Avilés-Nova, F., Castelán-Ortega, O. A., & Estrada-Flores, J. G. (2016). Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan, Estado de México. *Salud Publica de Mexico*, 58(4), 461–467. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i4.8027>
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>
- Sandoval-Alarcón, F. (2016). *Caracterización y análisis de la productiva del queso de prensa de la Costa Chica de Guerrero y Oaxaca*. Universidad Autónoma Chapingo. Tesis de Maestría.
- Santiago-López, L., Aguilar-Toalá, J. E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Liceaga, A. M., & González-Córdova, A. F. (2018). Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3742–3757. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13465>
- Sultan, S., Huma, N., Butt, M. S., Aleem, M., & Abbas, M. (2016). Therapeutic potential of dairy bioactive peptides: A contemporary perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1), 105–115. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1136590>
- Torres-Llenez, M. J., Vallejo-Cordoba, B., Díaz-Cinco, M. E., Mazorra-Manzano,

- M. A., & González-Córdova, A. F. (2006). Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control*, 17(9), 683–690. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.04.004>
- Vasek, O., Cardozo, M., & Fusco, A. J. (2008). Producción artesanal de quesos. Sistema de transformación agroalimentario en la región Correntina (Argentina), (September), 1–32.
- Vásquez, V. A., Gerardo, J. G., Jiménez, L. A., & Abanto, L. M. (2018). Evaluación De La Calidad Bacteriológica De Quesos Frescos En Cajamarca Evaluation of the Bacteriological Quality of Fresh Cheeses From Cajamarca. *Ecología Aplicada*, 17(1), 45–51. <https://doi.org/10.21704/rea.v17i1.1172>
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology. A Companion to the Gilded Age and Progressive Era*. <https://doi.org/10.1002/9781118913994.ch19>
- Yeluri Jonnala, B. R., McSweeney, P. L. H., Sheehan, J. J., & Cotter, P. D. (2018). Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>

3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ENRIQUECIDOS EN PÉPTIDOS DE QUESO PRENSA DE CUAJINICUILAPA, GUERRERO

Resumen

Los quesos artesanales preparados a partir de leche sin pasteurizar contienen bacterias ácido-lácticas tales como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, las cuales hidrolizan las proteínas durante la maduración del queso, produciendo péptidos. A la fecha hay poca información de la actividad biológica de péptidos producidos en quesos artesanales. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antioxidante de extractos enriquecidos en péptidos (EEP), obtenidos a partir de quesos artesanales, adquiridos en cuatro queserías de la Costa Chica de Guerrero, México (A, B, C, D), sin madurar y madurados a 30, 60 y 90 días. Para la obtención de los EEP, una muestra de queso previamente desengrasada fue mezclada con agua ajustando a pH 4.6. La mezcla se centrifugó, se filtró y el sobrenadante fue liofilizado. El contenido de proteínas en los EEP liofilizados se cuantificó mediante el método Bradford, la actividad antioxidante se evaluó por los ensayos ABTS y ORAC. En general, los EEP de la quesería B mostraron un mayor contenido proteico, el cual disminuyó a través de los días de maduración. La actividad antioxidante, determinada por ABTS y ORAC, de todos los EEP fue mayor a los 30 días de maduración ($63.66 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ EEP y $246.93 \text{mmol ET g}^{-1}$ EEP, respectivamente). Los EEP de las queserías D y A mostraron los valores más altos de actividad antioxidante. Los resultados obtenidos sugieren que los péptidos contenidos en el queso Prensa tienen potencial bioactivo.

Palabras clave: maduración, actividad antioxidante, proteínas, péptidos

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: LCA. José Alberto Mendoza Cuevas

Director de Tesis: Dra. Diana Guerra Ramírez

ANTIOXIDANT ACTIVITY PEPTIDE-ENRICHED EXTRACTS OF PRENSA CHEESE FORM CUAJINICUILAPA, GUERRERO

Abstract

Artisan cheeses made from unpasteurized milk contain lactic acid bacteria (LAB), such as *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*. These bacteria hydrolyze proteins during cheese ripening process producing peptides. Until today, there is little information about biological activity of peptides produced in artisan cheeses. The purpose of this investigation was to determine the antioxidant activity of peptide-enriched extracts (PEE), obtained from artisan cheeses acquired from four artisan cheese factories from the region of Costa Chica, Guerrero, México (A, B, C, D), without ripened and ripened for 30, 60 and 90 days. To obtain the PEE, a sample of cheese, previously defatted, was mixed with water adjusting pH to 4.6. This mixture was centrifuged, filtered and the supernatant was lyophilized. The protein content in the lyophilized EEP was quantified by Bradford method, the antioxidant activity was evaluated by ABTS and ORAC tests. In general, the EEP from cheese factory "B" showed a higher protein content, which decreased through the maturation days. The antioxidant activity, determined by ABTS y ORAC, from all the EEP was higher at 30 days of ripening ($63.66 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ EEP y $246.93 \text{ mmol ET g}^{-1}$ EEP, respectively). The EEP from cheese factories D and A showed the higher values of antioxidant activity. These results suggest the peptides content in the artisan pressed cheese have bioactive potential.

Key words: ripening, antioxidant activity, proteins, peptides

Thesis : Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo

Author: LCA. José Alberto Mendoza Cuevas

Advirsor: Dra. Diana Guerra Ramírez

3.1 Introducción

Las proteínas de la leche son las fuentes más conocidas de péptidos con alguna actividad biológica (Mushtaq, Gani, Shetty, Masoodi, & Ahmad, 2015; Ruiz, Segura, Betancur, & Chel, 2013). La leche es uno de los alimentos básicos en la alimentación humana debido a que aporta nutrientes esenciales para el desarrollo, siendo las proteínas uno de los nutrientes de mayor importancia debido a sus diversas funciones dentro de los organismos vivos (Badui Dergal, 2006). El contenido de proteínas en la leche oscila entre 3.2-3.5 %, las cuales se clasifican en dos grupos, caseínas y proteínas de lactosuero. Las caseínas son el principal componente proteico de la leche debido a que representan el 80 %, mientras que el otro 20 % restante pertenece a las proteínas del lactosuero. Dicho contenido de proteínas puede estar dado por múltiples factores tales como la dieta, lactación, edad del animal, infecciones en las glándulas mamarias y la época del año (Fox et al., 2017).

En productos lácteos las proteínas y péptidos con actividad antioxidante provienen de la leche. La formación de estos compuestos se lleva a cabo durante el proceso de elaboración debido a la hidrólisis de las caseínas por la acción de enzimas como proteasas, peptidasas, pepsina, tripsina, quimosina, las cuales pueden ser provenientes de la leche, cuajo, cultivos iniciadores o microflora natural. Mientras que en los quesos la generación de péptidos se lleva a cabo durante la etapa de maduración y la proteólisis (Barac, Pešić, Vučić, Vasić, & Smiljanić, 2017; López-Expósito, Miralles, Amigo, & Hernández-Ledesma, 2017; Mushtaq *et al.*, 2015; Power, Jakeman, & Fitzgerald, 2013).

Los péptidos bioactivos son definidos como fragmentos específicos de proteínas constituido hasta por 20 residuos de aminoácidos, los cuales pueden ser liberados de la proteína madre por diversas formas, entre las que destacan: hidrólisis enzimática, acción de microorganismos, enzimas de plantas, o la elaboración de alimentos. Después de ser ingeridos pueden ejercer ciertas funciones en el organismo (Barac *et al.*, 2017; Mushtaq *et al.*, 2015). Las características que determinan el contenido de péptidos en un queso, así como

el grado de formación de estos son: el tipo de leche utilizada, el tratamiento térmico que se aplica, las condiciones de elaboración y las condiciones de almacenamiento (Barac *et al.*, 2017). La actividad biológica de los péptidos se encuentra relacionada con el peso molecular, la estructura, la composición y secuencia de aminoácidos, la estructura física, la hidrofobicidad y la naturaleza de las cadenas laterales (Barac *et al.*, 2019; Barac *et al.*, 2017).

Los péptidos que poseen actividad antioxidante presentan pesos moleculares de alrededor de 500 a 1800 Da (Ruiz *et al.*, 2013), además contienen restos hidrofóbicos en el amino terminal. La actividad antioxidante de las proteínas según Elias *et al.* (2008) se encuentra dada por las interacciones complejas entre su capacidad de inactivar especies reactivas de oxígeno, eliminación de radicales libres, entre otros. Al mismo tiempo dicha actividad puede incrementarse a diversos procesos tales como la desnaturalización de alguna de sus estructuras, procesos térmicos, hidrolisis o reacción de Maillard. Actualmente se sabe que cada uno de los aminoácidos presentes en las proteínas es capaz de reaccionar con los radicales libres siempre y cuando su energía sea mayor. Los aminoácidos azufrados (Cys y Met) presentan la mayor reactividad, seguidos de los aromáticos (Phe, Trp y Tyr), mientras que los que contienen anillo imidazol (His) presentan una reactividad menor (Ruiz *et al.*, 2013).

Los quesos son el producto de la coagulación de la leche, a su vez son una fuente rica de nutrientes entre los que destacan las proteínas, las cuales al ser hidrolizadas por enzimas endógenas de la leche o por bacterias ácido-lácticas durante el proceso de maduración pueden generar péptidos bioactivos con diferentes actividades biológicas (Santiago-López *et al.*, 2018; Théolier, Fliss, Jean, & Hammami, 2014). En México se fabrican alrededor de 40 quesos artesanales los cuales se producen con leche cruda (Sánchez-Valdés *et al.*, 2016; Vasek, Cardozo, & Fusco, 2008). El queso de prensa o queso costeño de acuerdo con Sandoval-Alarcón (2016) es un queso elaborado con leche cruda, sin pasteurizar, y semimadurado. Su corteza es de color amarillo; al corte, su color es blanco, consistencia dura y textura lisa.

En los últimos años se ha reportado la actividad antioxidante de péptidos en queso blancos en salmuera (Barac *et al.*, 2019; Barac *et al.*, 2016), Cottage (Abadía-García *et al.*, 2013), Coalho (Meira *et al.*, 2012), Kalari (Mushtaq *et al.*, 2015), entre otros. Particularmente en México sólo se han estudiado el queso crema de Chiapas (Santiago-López *et al.*, 2018), y el Cotija (Hernández-Galán *et al.*, 2016). Sin embargo, en el queso de prensa de la Costa Chica del estado de Guerrero no se han hecho investigaciones sobre la actividad biológica de los péptidos. Por lo cual el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antioxidante de extractos enriquecidos en péptidos (EEP), obtenidos a partir de quesos artesanales, mediante las técnicas de ABTS y ORAC, para establecer la etapa de maduración donde quesos presenten una mayor concentración de compuestos antioxidantes.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Muestras de queso

En este estudio se analizaron muestras de queso prensa producido de forma artesanal en el municipio de Cuajiniculipa, Guerrero, México (16° 28' 18' N, 99° 24' 55' O). De los fabricantes de queso se seleccionaron cuatro y de cada quesería fueron adquiridos cuatro quesos de 1 kg. Las muestras de queso fueron trasladadas al municipio de San Marcos, Gro. (16° 47' 46' N, 99° 23' 05' O), en donde se controlaron las condiciones de almacenamiento y maduración. Los quesos fueron divididos en cuatro lotes, cada lote fue sometido a diferentes tiempos de maduración (30, 60 y 90 días). Concluido el tiempo de maduración, cada lote fue trasladado a la Universidad Autónoma Chapingo. Las muestras se mantuvieron en refrigeración (4 °C) hasta su análisis correspondiente.

3.2.2 Desgrasado del queso

Una muestra de 120 g de queso, de cada unidad experimental, fue triturada con un Nutribullet y colocada en un matraz Erlenmeyer, al cual se le agregaron 240 mL de hexano. Cada matraz fue agitado a 150 rpm durante 3 horas manteniendo una temperatura de 37 °C (Incubadora orbital Prendo INO-650 M). Una vez completado el tiempo de extracción se eliminó el hexano de las muestras; y ya desgrasadas se almacenaron en una bolsa ziploc a una temperatura de – 17 °C para su uso posterior. Cada muestra fue analizada por cuadruplicado (Schlichtherle-cerny, Affolter, & Cerny, 2003; Tanabe *et al.*, 2003).

3.2.3 Obtención de extractos enriquecidos en péptidos (EPP)

Los EEP fueron obtenidos de acuerdo al procedimiento descrito por Baracé *et al.* (2016) con algunas modificaciones. Las muestras de queso a diferentes tiempos de maduración, previamente desgrasadas con hexano, se mezclaron con agua destilada en una proporción 1:3 (p/v) y se ajustó a un pH de 4.6. Posteriormente, los péptidos se extrajeron por homogenización en vortex (2,000 rpm, 15 min) sonicación (15 minutos), incubación (40 °C ,110 rpm,1 h). Al final, las mezclas se centrifugaron (8,000 rpm, 4 °C, 10 min) y se filtraron al vacío, a través de papel

Whatman No.42. Los filtrados se liofilizaron y almacenaron a una temperatura de -17 °C, hasta su análisis.

3.2.4 Determinación de proteína total soluble

El contenido de proteína total soluble fue determinado mediante el método de Bradford (Torres-Llanez, González-Córdova, Hernandez-Mendoza, Garcia, & Vallejo-Cordoba, 2011), adaptado a microplacas. Una muestra de 10 mg de extracto liofilizado fue mezclada con 1 mL de agua destilada, posteriormente se agitó en *vortex* a 2,000 rpm durante 1 min (Vortex Synergy, WVR International) y se centrifugó a 8,000 rpm por 10 minutos (Eppendorf 5810). Una muestra de 50 µL del sobrenadante fue mezclada con 950 µL de reactivo de Bradford y la absorbancia fue medida a 595 nm. Por otro lado, preparó una curva estándar de albumina de suero bovino (BSA) en un rango lineal (0.1 a 0.8 mg mL⁻¹) Los resultados fueron expresados en miligramos de BSA por gramo de extracto enriquecido en péptido $\text{mg BSA g}_{\text{EEP}}^{-1}$.

3.2.5 Determinación del grado de hidrólisis (DH)

El grado de hidrólisis durante el periodo de maduración de los extractos liofilizados de queso de prensa fue determinado mediante el método ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) de acuerdo con lo descrito por Corrêa *et al.* (2011), adaptado a microplacas. Una muestra de 10 mg de extracto liofilizado fue mezclada con 1 mL de agua destilada, posteriormente se agitó en *vortex* a 2,000 rpm durante 1 minuto min (Vortex Synergy, WVR International) y se centrifugó a 8,000 rpm por 10 minutos (Eppendorf 5810). Brevemente, en cada pozo de la microplaca se colocó una alícuota 10 µL del extracto más 40 µL de solución amortiguadora de fosfatos 0.2125 M, pH 8.2, de igual manera se agregó 50 µL del TNBS. En caso del blanco se colocó 50 µL de dodecilsulfato sódico (SDS) al 1 %. Posteriormente la microplaca fue incubada a 50 °C ± 1 °C por 1 hora. Terminado el tiempo de incubación se procedió a detener la reacción adicionando 100 µL de HCL al 0.1 N., y se dejó en reposo durante 10 minutos. Se leyó la absorbancia a 420 nm. Se utilizó una curva de calibración de L-Leucina (0.1 a 0.8 mM). Los resultados se expresaron como porcentaje de Grado de Hidrólisis

Igualmente se determinó el grado de hidrólisis del extracto liofilizado por lo cual se pesaron 0.5 g del liofilizado correspondiente al T0 y se adicionó 4.5 mL de HCL 6 N, se incubó a $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Posteriormente se neutralizó la reacción añadiendo 4.5 mL de NaOH 6 N. se filtró mediante papel filtro Whatman No. 1, el sobrenadante obtenido fue sometido a la metodología de los extractos enriquecidos en péptidos de queso prensa.

Los resultados fueron obtenidos de acuerdo con la ecuación 1:

$$\% GH = \frac{NH_{2tx} - NH_{2t0}}{NH_{2HT} - NH_{2t0}} * 100 \quad (1)$$

Donde:

%GH: porcentaje del grado de hidrólisis

NH_{2tx} : Grupos aminos libres de extractos liofilizados del tiempo evaluado

NH_{2t0} : Grupos aminos libres de extracto liofilizados del T0

NH_{2HT} : Grupos aminos libres de la hidrólisis total

3.2.6 Actividad antioxidante del queso

La actividad antioxidante de los extractos solubles en agua fue determinada por los ensayos: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y la capacidad de absorción de radicales de Oxígeno (ORAC).

El ensayo ABTS se evaluó de acuerdo con el método de Revilla *et al.* (2016) con algunas modificaciones. El radical libre ABTS^{•+} fue generado por la reacción entre las disoluciones de ABTS 7.4 mM y persulfato de sodio 2.6 mM, la cuales se mezclaron en una proporción 1:1 (v/v) y se dejaron incubar, protegidas de la luz, durante 16 h. Posteriormente, una alícuota de la mezcla de reacción (600 μ L) se llevó a un volumen final de 10 mL utilizando buffer de fosfatos 45 mM. En cada pozo de la microplaca se mezclaron una alícuota (20 μ L) del extracto en estudio, con 180 μ L de la solución ABTS^{•+}. La disminución de absorbancia de la mezcla

de reacción se midió a 734 nm. La curva de calibración de Trolox se construyó en un intervalo de concentraciones de 9.9- 299.8 mM. Los resultados se expresaron como micromoles de equivalente de Trolox por gramo de extracto enriquecidos en péptidos $\mu\text{m ET g}_{\text{EEP}}^{-1}$.

La capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC se determinó de acuerdo con lo descrito por Paul *et al.* (2012) con algunas modificaciones. En cada pozo de la microplaca se colocó una alícuota de 25 μL de extracto y 150 μL de fluoresceína (0.004 μM). Como blanco (25 μL de buffer de fosfato 75 mM) y un control (50 μL de agua destilada). La mezcla de reacción en la microplaca se dejó reposar a 37 °C durante 20 minutos. Posteriormente con un inyector automático se adicionaron 25 μL de AAPH 0.15 M a cada uno de los pozos de reacción. Inmediatamente después se leyó la fluorescencia cada minuto durante 90 min a una longitud de onda de excitación de 485 y una de emisión de 527 nm. Se utilizó una curva de calibración con Trolox (5 a 100 μM). Los datos de fluorescencia normalizados fueron graficados con respecto al tiempo a fin de obtener las áreas bajo la curva de decaimiento de fluoresceína. Los resultados fueron expresados en milimoles de equivalente de Trolox por gramo de extracto enriquecido en péptidos $\text{mM ET g}_{\text{EEP}}^{-1}$.

3.2.7 Análisis estadístico

Proteína soluble, Grado de hidrolisis, ABTS y ORAC: el diseño de los tratamientos se basó en una estructura unifactorial de los tratamientos y un esquema de aleatorización completamente al azar. Bajo un modelo mixto con 4 repeticiones en el tiempo (0, 30, 60 y 90 días), con 4 repeticiones para el caso de proteína soluble y ABTS; y con 3 repeticiones para el grado de hidrólisis y ORAC. Para la definición de estructura de varianzas se utilizó el método RELM (estimación por máxima verosimilitud restringida) y como criterio de información para elegir la estructura de la varianza más apropiada se usó el criterio de información bayesiano de Schwarz (BIC)(Correa Morales & Salazar Uribe, 2016; Sainz & Montero, 2004).

$$y=X\beta+Zb+e$$

Donde:

y = es un vector ($n \times 1$) de observaciones.

β = es un vector ($s \times 1$) de parámetros desconocidos de efectos fijos.

Z : es una matriz en el bloque diagonal cuyos bloques son las r matrices Z_i

b = es el vector $[b_1, b_2, \dots, b_r]$ que incluye los q parámetros aleatorios para cada una de las r parcelas, tal que $b \sim N(0, D)$

e : es un vector ($n \times 1$) que contiene los términos residuales del error, tal que $e \sim N(0, R)$

Las diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se identificaron mediante la prueba de Tukey-Kramer para las comparaciones de medias. Todo el análisis se llevó a cabo en el paquete SAS versión 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EE. UU).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Determinación de proteína total soluble durante la maduración del queso

En la Figura 6 se observa el comportamiento del contenido de proteína durante la maduración del queso de prensa. En general, hubo una disminución estadísticamente significativa hasta los 90 días de maduración. La Figura 7 presenta el contenido de proteína total soluble a los 30 días de maduración, con el efecto de la QB (quesería B) sobre el contenido de proteína resultó significativamente superior a las otras queserías ($p \leq 0.05$). En el T0 se presentó el mayor contenido proteico y a medida que avanzaba el tiempo de maduración, el contenido de proteína fue disminuyendo hasta llegar a la menor cantidad de proteína en el T3. Dicho resultado coincide con el reportado por Alonzo-Paz, Lugo-Cervantes, Tovar-Pérez, & Chombo-Morales (2016) quienes encontraron que en queso Cotija el contenido proteico disminuye a medida que el queso va madurando.

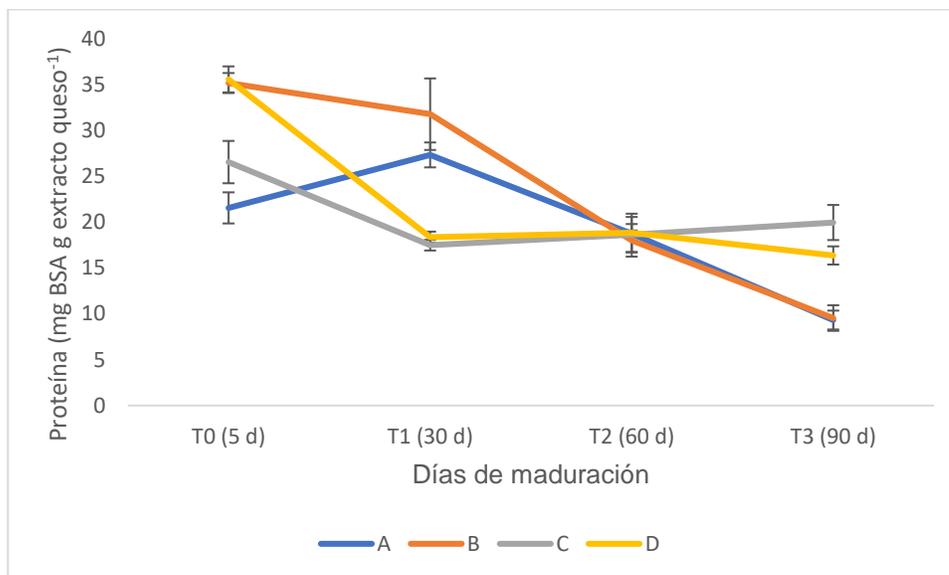


Figura 6. Contenido de proteína total de extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería.

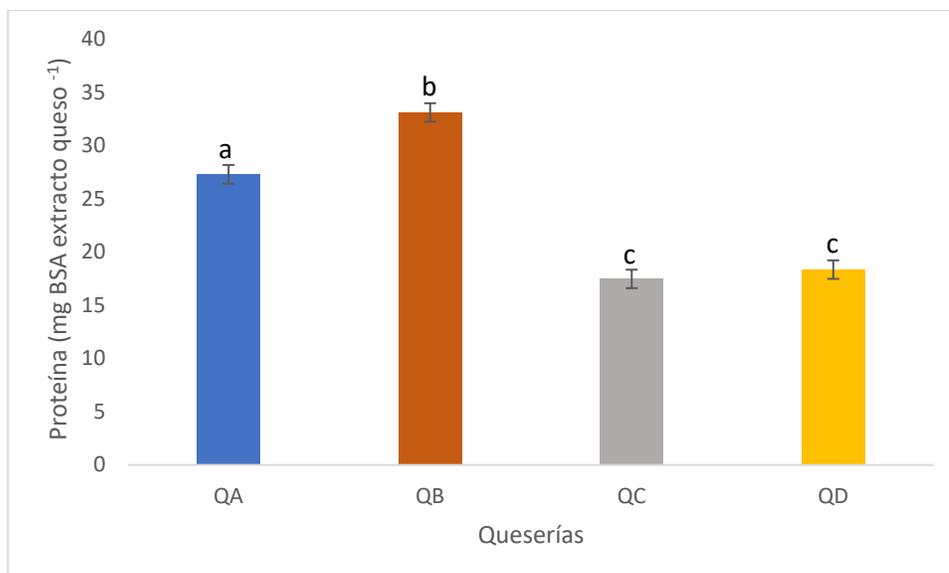


Figura 7. Contenido de proteína total en extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero, a los 30 días de maduración (T1). Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

3.3.2 Contenido de proteína total por quesería

En la Figura 8 se reporta el contenido de proteína total de los quesos colectados por quesería. La cantidad promedio de proteína fue de $21.52 \text{ mg BSA g}_{\text{EEP}}^{-1}$. Los resultados del análisis muestran que los quesos de los tres productores seleccionados presentan un contenido de proteína estadísticamente igual. Con un promedio de $22.28 \text{ mg BSA g}_{\text{EEP}}^{-1}$, en tanto la QA (quesería A) arrojó el contenido de proteína total significativamente inferior a las queserías, QB y QD (quesería D).

De acuerdo con Alonzo-Paz *et al.* (2016) el tiempo de maduración está relacionado con la concentración de péptidos, es decir cuando hay una disminución del contenido de proteína e incrementa también la concentración de los péptidos liberados. Por otro lado, las diferentes comunidades microbianas presentes en los quesos son de gran importancia en la etapa de la proteólisis ya que, como parte de su metabolismo celular, hidrolizan las proteínas a aminoácidos (Choi, Sabikhi, Hassan, & Anand, 2012).

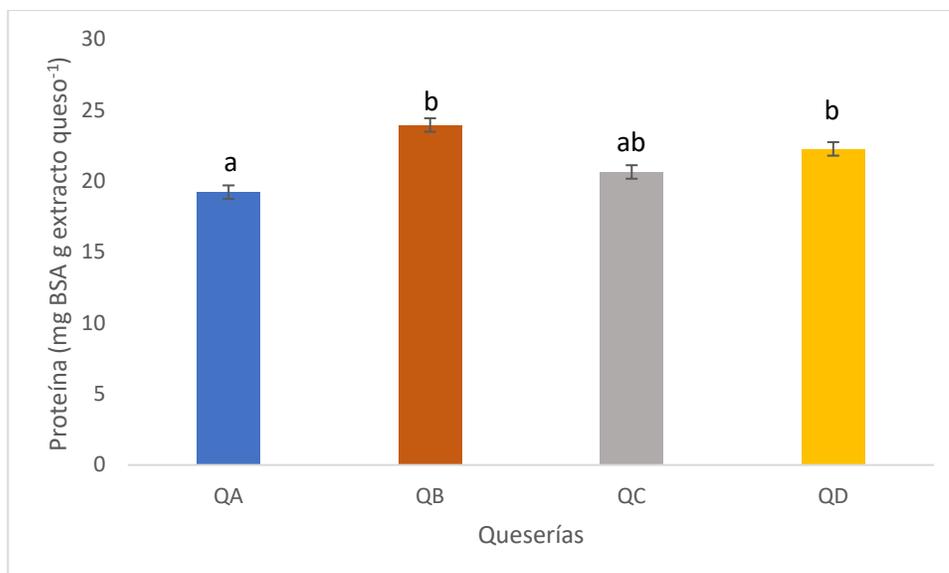


Figura 8. Contenido de proteína total de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa por quesería. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

Particularmente las bacterias ácido lácticas poseen un resistente y activo sistema proteolítico el cual les permite degradar las proteínas de la leche, en especial las caseínas y de esta manera obtener aminoácidos los cuales utilizan en su crecimiento y desarrollo (Choi *et al.*, 2012; Donkor, Henriksson, Singh, Vasiljevic, & Shah, 2007).

3.3.3 Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis presentes en los extractos liofilizados de queso de prensa se muestra en la Figura 9. Particularmente, se observó una tendencia de aumento a través del tiempo de maduración, lo cual coincide con resultados obtenidos en diferentes investigaciones (Alonzo-Paz *et al.*, 2016; Corrêa *et al.*, 2011). Los valores del grado de hidrólisis obtenidos oscilaron 0.35 a 1.12 %. Los extractos de QD presentan los valores mayores respecto a dicha determinación (0.69 a 1.12 %). La QD presentó el grado de hidrólisis significativamente superior a las demás queserías a los 30 días de maduración ($p \leq 0.05$) Figura 10.

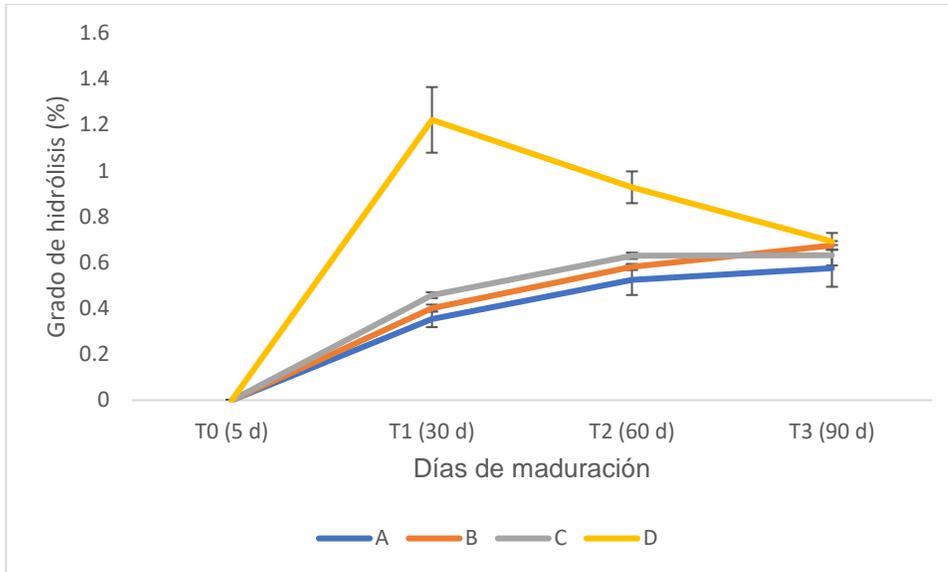


Figura 9. Grado de hidrólisis (% GH) de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero en el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería.

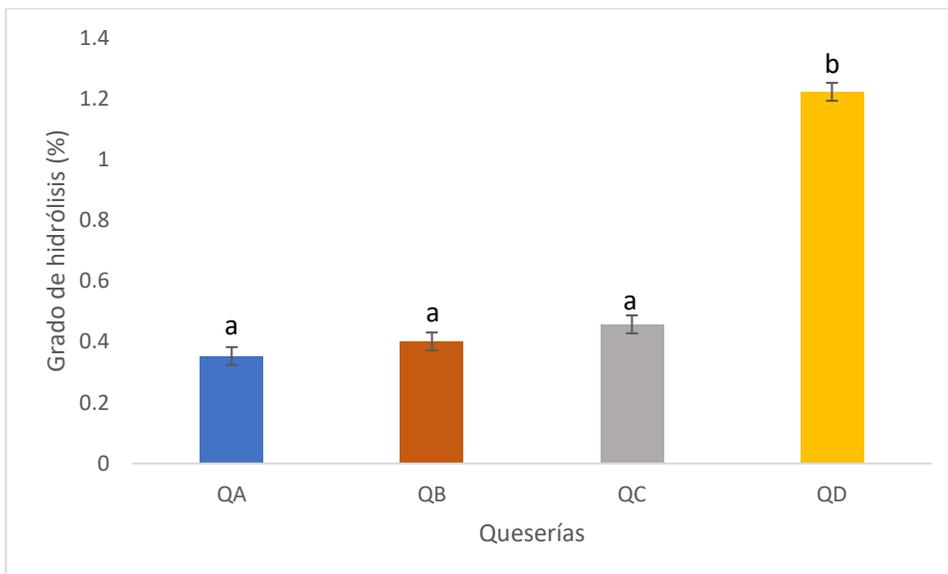


Figura 10. Grado de hidrólisis (%GH) de los extractos enriquecidos en péptidos de queso prensa de Guerrero, a los 30 días de maduración (T1). Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

En quesos elaborados con leche sin pasteurizar el grado de proteólisis puede variar según los microorganismos mayoritarios presentes en dichas matrices (Öner & Sarıdağ, 2018). De igual forma, el tiempo de maduración desempeña un papel importante en la concentración de péptidos generados en los quesos, debido a que conforme avanza dicho tiempo existe un incremento en la liberación de grupos aminos como consecuencia del proceso de degradación de las proteínas por los sistemas proteolíticos de las BAL (Alonzo-Paz *et al.*, 2016).

Por otra parte, la actividad proteolítica puede depender en gran medida de las tecnologías empleadas en el procesamiento, así como de las condiciones de maduración. Sin embargo, los principales factores de este proceso bioquímico son llevado a cabo por diferentes tipos de enzimas (coagulantes, proteasas y peptidasas bacterianas) (Ayyash & Shah, 2011; Estrada, Ariño, & Juan, 2017; Karaca & Güven, 2018; Perna, Intaglietta, Simonetti, & Gambacorta, 2015).

3.3.4 Actividad antioxidante durante la maduración del queso

La actividad antioxidante por en el ensayo ABTS se presenta en la Figura 11. El análisis estadístico mostró que hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la actividad antioxidante de los extractos causada por el efecto de los días de maduración del queso (0, 30, 60 y 90 días). En el caso del ensayo ABTS a los sesenta días de maduración se observó un aumento significativo en la capacidad. La Figura 12 muestra que el efecto de la quesería QD fue estadísticamente superior en la capacidad antioxidante (ABTS) En los tiempos (T0, T1, T2) evaluados los EPP de la QD presentaron los valores mayores (34.44 ± 0.393 , 70.07 ± 1.75 , $84.91 \pm 0.270 \mu\text{m ET g}_{\text{EPP}}^{-1}$)

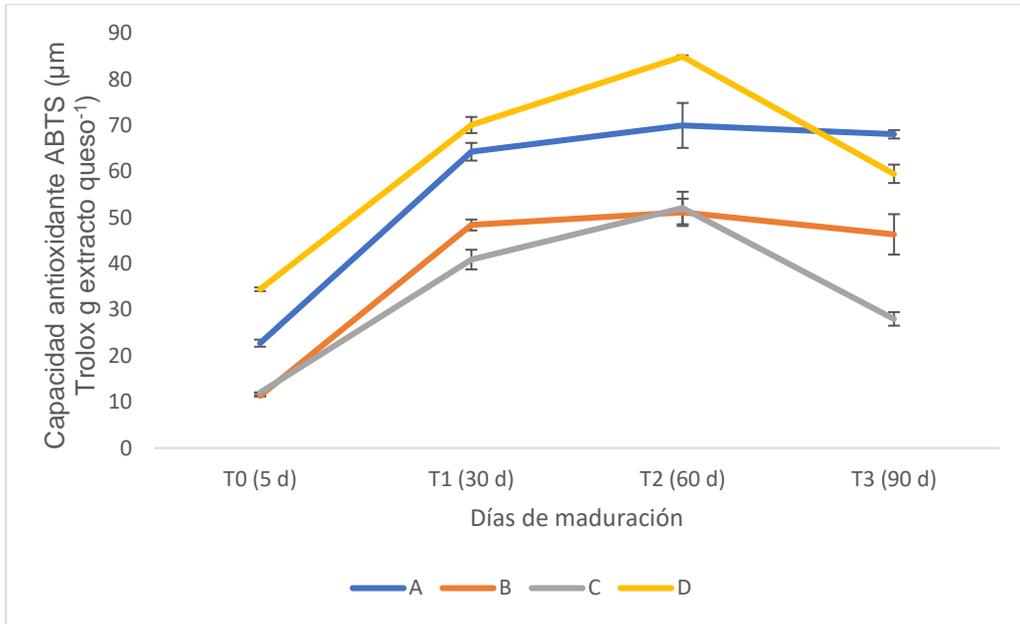


Figura 11. Capacidad antioxidante (ABTS) de extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero en el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería.

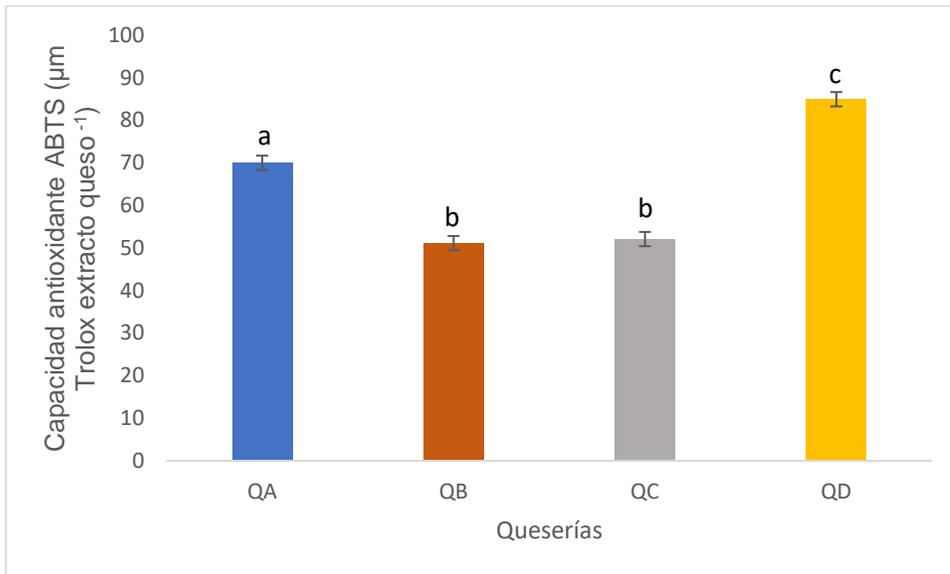


Figura 12. Capacidad antioxidante (ABTS) de extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero, a los 60 días de maduración (T2). Las barras de indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

La capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC se observa en la Figura 13. En este caso la mayor capacidad antioxidante se obtuvo a los treinta días de maduración del queso. El efecto de la QD resultó significativamente superior a las otras tres queserías, los valores se encontraron en un intervalo de 171.31 ± 5.3 y 291.45 ± 5.1 mM ET g_{EEP}^{-1} . (Figura 14).

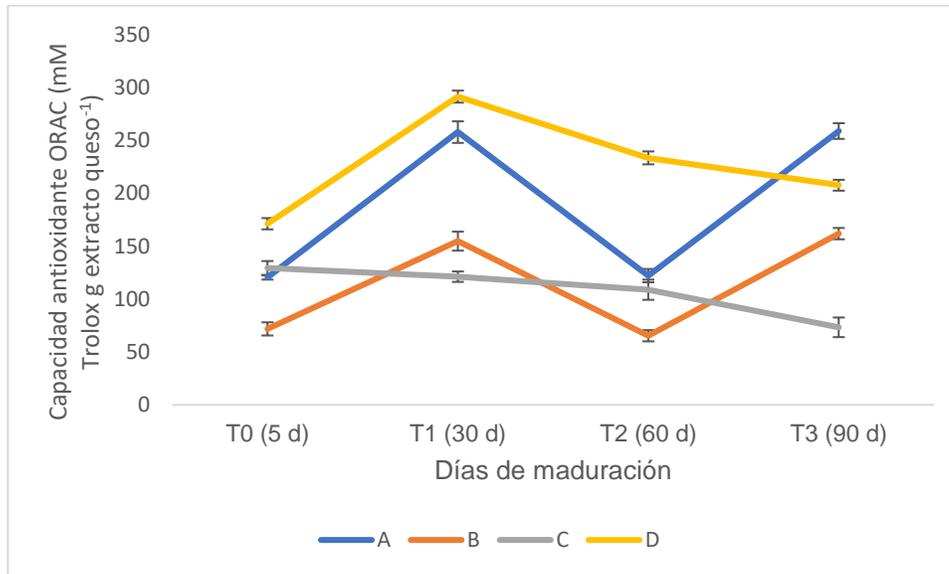


Figura 13. Capacidad antioxidante (ORAC) de los extractos enriquecidos en péptidos de queso prensa de Guerrero durante el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería.

3.3.5 Capacidad antioxidante por quesería

La capacidad antioxidante (ABTS) de los quesos de cada quesería seleccionada se observa en la Figura 15. La gráfica muestra que los extractos de las queserías A y D (56.2 y $62.2 \mu\text{M ET } g_{EEP}^{-1}$) presentaron la mayor capacidad antioxidante mediante este ensayo, mientras que los de las queserías QB y QC (quesería) (39.2 y $33.2 \mu\text{M ET } g_{EEP}^{-1}$) contienen la menor actividad. El análisis estadístico mostró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para la capacidad antioxidante por el ensayo ABTS en los EPP de las diferentes queserías.

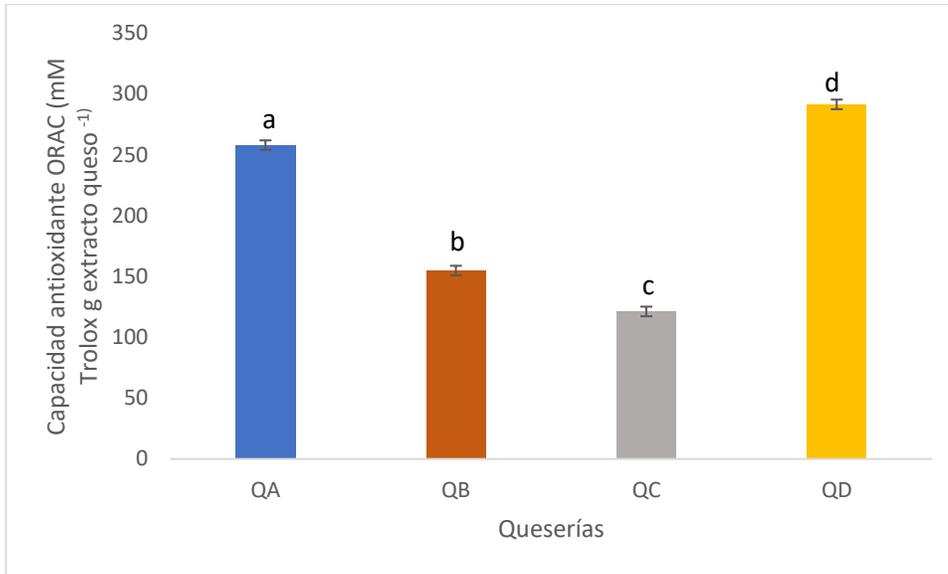


Figura 14. Capacidad antioxidante (ORAC) de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero a los 30 días de maduración (T1). Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

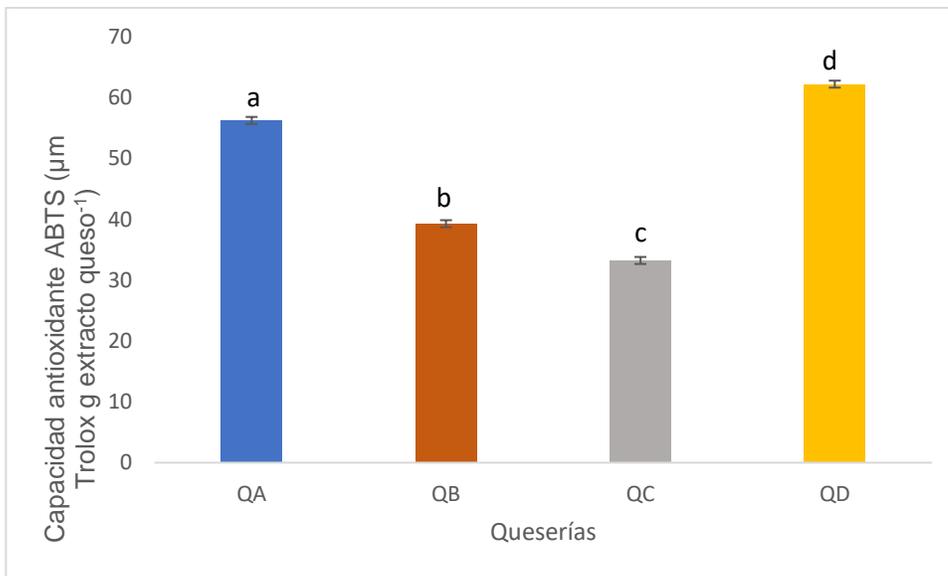


Figura 15. Capacidad antioxidante (ABTS) de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero por quesería. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

La Figura 16 muestra la capacidad antioxidante cuantificada mediante el ensayo ORAC. El efecto de la QD resultó significativamente superior a aquellos de QA, QB y QC, sobre la capacidad antioxidante.

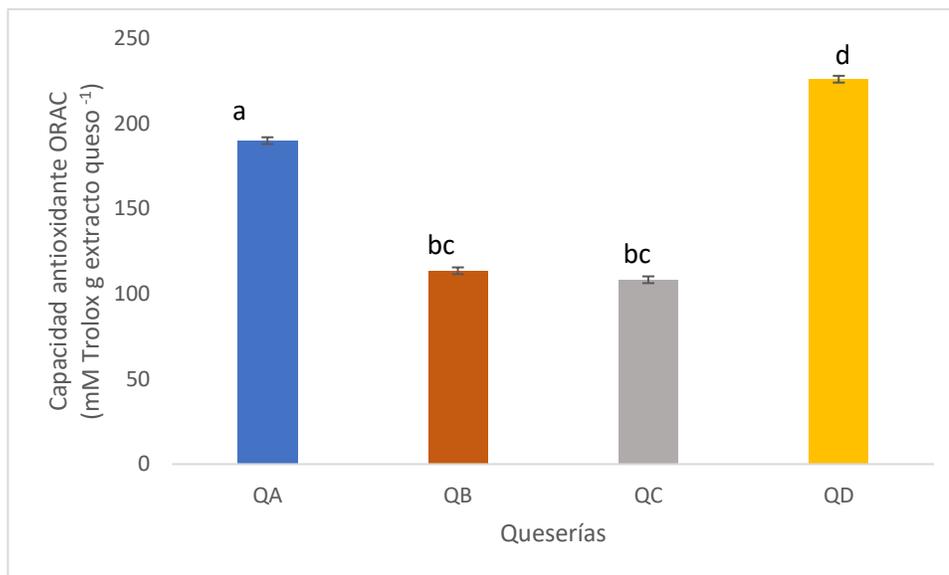


Figura 16. Capacidad antioxidante (ORAC) de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero por quesería. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

El comportamiento de los compuestos antioxidantes, así como el de los radicales libres según Corrêa *et al.* (2011) y Dávalos *et al.* (2004) puede responder a la estructura de la proteína, su composición, el grupo al que pertenecen, el tamaño de los péptidos y la estereoselectividad de los radicales. Por esta razón, el comportamiento de los compuestos antioxidantes dependerá del método que se esté usando para su determinación. Dávalos *et al.* (2004) mencionan que el ensayo ORAC tiene ventajas y una mayor relevancia biológica, debido a que utiliza un radical de origen fisiológico, mientras que el radical ABTS no se encuentra en los sistemas biológicos. De igual manera el ensayo ORAC se basa en el concepto de área bajo la curva determinado por la fluorescencia, lo cual permite integrar el tiempo y nivel de protección de los antioxidantes sobre el

sistema biológico de oxidación, mientras que el ensayo ABTS determina en un tiempo fijo la inhibición del radical espectrofotométricamente, dando lugar a posibles interferencias (Huang, Boxin, & Prior, 2005; MacDonald-Wicks, Wood, & Garg, 2006).

Abadía-García *et al.* (2013) reportaron en queso cottage un comportamiento similar al observado en esta investigación; la actividad antioxidante fue progresiva a través del tiempo con valores de 250 (7 días) a 380 (28 días) $\mu\text{M ET mL}^{-1}$ extracto total en queso. En cambio, Meira *et al.* (2012) estudiaron la actividad antioxidante de quesos italianos en diferentes estados de maduración. En el queso Cerrillano observaron un incremento en dicha actividad, con valores de 1,730 a 1,890 $\mu\text{M ET mL}^{-1}$ extracto total, en 90 y 120 días de maduración respectivamente. Asimismo, evaluaron la actividad antioxidante del queso Pecorino en la cual encontraron una disminución en la actividad antioxidante a medida que aumentaba el tiempo de maduración del queso (1,560 μM a 1,250 $\mu\text{M ET mL}^{-1}$ extracto total en un periodo de entre 80 a 160 días, respectivamente). Esta información sugiere que la capacidad antioxidante de los algunos quesos puede disminuir a medida que incrementa el tiempo de maduración, como se observó en el presente estudio después de los 30 días.

De acuerdo con Gupta *et al.* (2009) los péptidos antioxidantes que se encuentran en los quesos están en un sistema dinámico de formación-degradación a través del tiempo, por lo cual consecutivamente se forman péptidos con esta actividad, mientras que se degradan otros formados anteriormente, provocando disminución en la capacidad antioxidante. No obstante, otros péptidos antioxidantes se acumulan conservado o incrementado la actividad antioxidante. Elias *et al.* (2008) determinaron que los aminoácidos con mayor potencial antioxidante son aquellos de cadenas laterales que contienen azufre (Cys y Met), cadenas laterales aromáticas (Trp, Tyr y Phe), cadena lateral pirrolidina (Pro) y con cadena lateral imidazol (His). Sin embargo, hasta el día de hoy no se tiene la certeza del mecanismo que llevan a cabo tanto las proteínas como los péptidos respecto a la actividad antioxidante (Barac *et al.*, 2017).

Los resultados del presente trabajo indican que en las primeras etapas de maduración del queso se promueve la formación de péptidos que podrían derivar de la actividad de las bacterias ácido-lácticas sobre las proteínas del queso. La formación de péptidos a su vez podría estar directamente relacionada con la capacidad antioxidante, pues en los primeros treinta días de maduración del queso hay una disminución significativa de proteína y un aumento de capacidad antioxidante.

3.4 Conclusión

El contenido de proteína total en el queso disminuyó a medida que se incrementó el tiempo de maduración. En ensayos aplicados para cuantificar la capacidad antioxidante (ABTS) se observó que a los sesenta días de maduración los extractos enriquecidos en péptidos mostraron un aumento significativo en la capacidad antioxidante; mientras que para el caso del ensayo (ORAC) este incremento se dio, en la mayoría de los casos, a los treinta días de maduración. A su vez la mayor capacidad antioxidante se presentó en los extractos provenientes de las queserías A y D.

3.5 Bibliografía

- Abadía-García, L., Cardador, A., Martín del Campo, S. T., Arvízu, S. M., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C., ... Amaya-Llano, S. L. (2013). Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*, 33(2), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.04.005>
- Alonzo-Paz, A. L., Lugo-Cervantes, E. C., Tovar-Pérez, E. G., & Chombo-Morales, M. P. (2016). Evaluación de la proteólisis del queso Cotija región de origen asociado al tiempo de maduración.
- Ayyash, M. M., & Shah, N. P. (2011). Effect of Partial Substitution of NaCl with KCl on Proteolysis of Halloumi Cheese. *Journal of Food Science*, 76(1), 31–37. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01901.x>
- Badui Dergal, S. (2006). *Salvador Badui Dergal. Química de los alimentos*.
- Barac, M., Pešić, M., Vučić, T., Vasić, M., & Smiljanić, M. (2017). White cheeses as a potential source of bioactive peptides. *Mljekarstvo*, 67(1), 3–16. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2017.0101>
- Barac, M., Smiljanić, M., Žilić, S., Pešić, M., Stanojević, S., Vasić, M., & Vučić, T. (2016). Proteinski profili i ukupni antioksidativni kapacitet u vodi topljivih i netopljivih proteinskih frakcija bijelog sira u salamuri u razlicitim fazama zrenja. *Mljekarstvo*, 66(3), 187–197. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2016.0303>
- Barac, M., Vucic, T., Zilic, S., Pesic, M., Sokovic, M., Petrovic, J., Milincic, D. (2019). The effect of in vitro digestion on antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial potentials of traditional Serbian white-brined cheeses. *Foods*, 8(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/foods8030094>
- Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A., & Anand, S. (2012). Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 65(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00725.x>
- Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Coelho, J., Meira, S. M., Lopes, F. C., Segalin, J., Brandelli, A. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2247–2254. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4446>
- Correa Morales, J. C., & Salazar Uribe, J. C. (2016). *Introducción a los modelos mixtos*.

- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B.-. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC--Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48–54.
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17(11), 1321–1331. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.02.009>
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430–441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Estrada, O., Ariño, A., & Juan, T. (2017). Proteólisis del queso de Teruel: Influencia del contenido de sal. *Jornadas Sobre Producción Animal*, 714–716.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Guinee, T. P., ... McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of Cheese Science*. *Fundamentals of Cheese Science*. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_19
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., & Sangwan, R. B. (2009). Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), 339–347. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00509.x>
- Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., Picque, D., Spinnler, H. E., López-del-Castillo Lozano, M., & Martín del Campo, S. T. (2016). ACEI and antioxidant peptides release during ripening of Mexican Cotija hard cheese. *Journal of Food Research*, 5(3), 85–91. <https://doi.org/10.5539/jfr.v5n3p85>
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Karaca, O. B., & Güven, M. (2018). Effects of proteolytic and lipolytic enzyme supplementations on lipolysis and proteolysis characteristics of white cheeses. *Foods*, 7(8). <https://doi.org/10.3390/foods7080125>
- López-Expósito, I., Miralles, B., Amigo, L., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Health Effects of Cheese Components with a Focus on Bioactive Peptides. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 239–273). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00011-X>
- MacDonald-Wicks, L., Wood, L. G., & Garg, M. G. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046–2056. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S.,

- & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.009>
- Mushtaq, M., Gani, A., Shetty, P. H., Masoodi, F. A., & Ahmad, M. (2015). Himalayan cheese (Kalari/kradi): Effect of different storage temperatures on its physicochemical, microbiological and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 837–845. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.054>
- Öner, Z., & Sarıdağ, A. M. (2018). Proteolysis in the beyaz (White) cheese produced from various milk. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 24(2), 269–277. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.446454>
- Paul, M., Brewster, J. D., Hekken, D. L. Van, & Tomasula, P. M. (2012). Measuring the antioxidative activities of Queso Fresco after post-packaging high-pressure processing. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3(4), 297–303. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.34042>
- Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., & Gambacorta, E. (2015). Donkey Milk for Manufacture of Novel Functional Fermented Beverages. *Journal of Food Science*, 80(6), S1352–S1359. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12862>
- Power, O., Jakeman, P., & Fitzgerald, R. J. (2013). Antioxidative peptides: Enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44(3), 797–820. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1393-9>
- Revilla, I., González-Martín, M. I., Vivar-Quintana, A. M., Blanco-López, M. A., Lobos-Ortega, I. A., & Hernández-Hierro, J. M. (2016). Antioxidant capacity of different cheeses: Affecting factors and prediction by near infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5074–5082. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10564>
- Ruiz, J., Segura, M., Betancur, D., & Chel, L. (2013). Proteínas y peptidos biologicamente activos con potencial nutracéutico. In *Bioactividad De Peptidos Derivados De Proteinas Alimentarias* (pp. 11–27).
- Sainz, R. C., & Montero, G. (2004). Caso Práctico De Modelización Del Crecimiento Y Producción De Las Masas Forestales, 321, 317–321.
- Sánchez-Valdés, J. J., Colín-Navarro, V., López-González, F., Avilés-Nova, F., Castelán-Ortega, O. A., & Estrada-Flores, J. G. (2016). Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan, Estado de México. *Salud Publica de Mexico*, 58(4), 461–467. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i4.8027>
- Sandoval-Alarcón, F. (2016). *Caracterización y análisis de la productiva del*

queso de prensa de la Costa Chica de Guerrero y Oaxaca. Universidad Autónoma Chapingo. Tesis de Maestría

- Santiago-López, L., Aguilar-Toalá, J. E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Liceaga, A. M., & González-Córdova, A. F. (2018). Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *Journal of Dairy Science*, *101*(5), 3742–3757. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13465>
- Schlichtherle-cerny, H., Affolter, M., & Cerny, C. (2003). Coupled to Electrospray Mass Spectrometry of Small Polar Compounds in Food Analysis, *75*(10), 3038–3043.
- Tanabe, S., Tesaki, S., Watanabe, J., Fukushi, E., Sonoyama, K., & Kawabata, J. (2003). Isolation and Structural Elucidation of a Peptide Derived from Edam Cheese that Inhibits β -Lactoglobulin Transport. *Journal of Dairy Science*, *86*(2), 464–468. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73625-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73625-X)
- Théolier, J., Fliss, I., Jean, J., & Hammami, R. (2014). Antimicrobial Peptides of Dairy Proteins: From Fundamental to Applications. *Food Reviews International*, *30*(2), 134–154. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.896017>
- Torres-Llenez, M. J., González-Córdova, A. F., Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H. S., & Vallejo-Cordoba, B. (2011). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, *94*(8), 3794–3800. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4237>
- Vasek, O., Cardozo, M., & Fusco, A. J. (2008). Producción artesanal de quesos. Sistema de transformación agroalimentario en la región Correntina (Argentina), 1–32.

4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ENRIQUECIDOS EN PÉPTIDOS DE QUESO DE PRENSA DE CUAJINICUILAPA, GUERRERO

Resumen

En el proceso de elaboración de quesos existe la liberación de péptidos originarios de las caseínas, los cuales pueden ejercer diferentes propiedades biológicas, tales como antioxidante, antimicrobiana, antitrombótica, entre otras. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antimicrobiana en extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa (EEP) en diferentes tiempos de maduración, contra cepas de *Listeria monocytogenes* Scott, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella* San Diego. Para la obtención de los EEP, una muestra de queso previamente desengrasada fue mezclada con agua ajustando a pH 4.6. La mezcla se centrifugó, se filtró y el sobrenadante fue liofilizado. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el ensayo difusión en disco. No se observó actividad antimicrobiana de los diferentes extractos contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella* San Diego. Sin embargo, se observó actividad antimicrobiana de tipo bacteriostático contra *Listeria monocytogenes* Scott, en los diferentes tiempos de maduración.

Palabras claves: actividad antimicrobiana, queso de prensa, péptidos, *Listeria*.

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: LCA. José Alberto Mendoza Cuevas

Director de Tesis: Dra. Diana Guerra Ramírez

ANTIMICROBIAL ACTIVITY PEPTIDE-ENRICHED EXTRACTS OF PRENSA CHEESE FROM CUAJINICUILAPA, GUERRERO

Abstract

Cheese-making process releases peptides from caseins. These peptides can carry out different biological properties, such as antioxidant, antimicrobial and, antithrombotic. The purpose of this project was to determine the antimicrobial activity on peptide-enriched extracts (PEE) of prensa cheese at different ripening time, against strains of *Listeria monocytogenes* Scott, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella* San Diego. For PEE extraction, a sample of previously defatted cheese was mixed with water and the pH was adjusted to 4.6. This mixture was centrifuged, filtered and the supernatant was lyophilized. The antimicrobial activity was tested through disk diffusion test. No antimicrobial activity was observed in the different extracts against *Staphylococcus.aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella* San Diego. However, bacteriostatic antimicrobial activity, was observed against *Listeria monocytogenes* Scott, in different times of ripening.

Key words: antimicrobial activity, prensa cheese, peptides, *Listeria*

Thesis : Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo

Author: LCA. José Alberto Mendoza Cuevas

Adviror: Dra. Diana Guerra Ramírez

4.1 Introducción

La actividad antimicrobiana es definida como el proceso por el cual ciertos compuestos destruyen o inhiben el desarrollo de microorganismos (Vogelman & Craig, 1986). La actividad antimicrobiana se clasifica en función del efecto inhibitor o destructor que ocurre y el tipo de agentes patógenos que son afectados por este efecto (Lorian, 1986). Cuando el efecto es inhibitor se conoce como bacteriostático, fungistático o viroestático; la actividad antimicrobiana recibe el nombre de bactericida, fungicida, protozoaricida o viricida cuando destruye bacterias, hongos, protozoarios o virus, respectivamente (Lorian, 1986).

En las últimas décadas las proteínas derivadas de los lácteos han tomado gran importancia debido a que son considerados una fuente natural de péptidos bioactivos, los cuales se encuentran encriptados dentro de una proteína madre, pudiendo ser liberados por hidrólisis enzimática, el procesamiento de alimentos o durante la digestión gastrointestinal (Mushtaq, Gani, Shetty, Masoodi, & Ahmad, 2015; Théolier, Fliss, Jean, & Hammami, 2014).

Los péptidos antimicrobianos (PAM) se caracterizan por tener entre 6 a 100 residuos de aminoácidos en su secuencia, son considerados como oligopéptidos debido a su composición variable (Bahar & Ren, 2013). Los PAM pueden provenir de diferentes fuentes tales como animales, insectos, plantas, leche y bacterias (Bahar & Ren, 2013; Rai, Pandit, Gaikwad, & Kövics, 2016).

Los PAM de naturaleza catiónica de interactuar fuertemente con moléculas cargadas negativamente. Dicha particularidad es la que ayuda a la selectividad para elegir las membranas de las bacterias las cuales tienen componentes con cargas negativas (López-Pérez, Grimsey, Bourne, Mikut, & Hilpert, 2017). Entre los principales PMA de este tipo se encuentran: las defensinas, catelicidinas, cecropinas, péptidos derivados de histonas y enriquecidos con aminoácidos (Rai *et al.*, 2016).

Los PAM aniónicos interactúan de dos formas, mediante la amidación del C-terminal o por la formación de puentes salinos derivados de iones metálicos. Una vez realizada esta agrupación son capaces de fijarse en la membrana a través de las regiones hidrófobas de su estructura. Asimismo, pueden ejercer un efecto

inhibitorio interviniendo al exterior de la membrana celular, o al interior de la célula al interactuar con proteínas intracelulares o interrumpiendo procesos clave, como la síntesis de ARN y ADN (López-Pérez *et al.*, 2017).

El mecanismo de acción de los PAM depende de la interacción de los péptidos con la membrana celular, así como su composición. Usualmente, los PAM interactúan con la membrana mediante la interacción electrostática (Guilhelmelli *et al.*, 2013; Rai *et al.*, 2016).

Se han propuestos varios modelos del mecanismo de acción de los PAM, entre los que se encuentran: de alfombra, de poro toroidal, agregado y barril de madera (Bahar & Ren, 2013; Rai *et al.*, 2016).

En las últimas décadas se ha reportado la actividad antimicrobiana en diversos quesos en el mundo tales como: Tulum (Öztürk & Akin, 2017) contra *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, Caprino del Piemonte (Rizzello *et al.*, 2005) contra *Lactobacillus sakei* A15, *Listeria innocua* DSM 20649, *Bacillus megaterium* F6, y *Escherichia coli* K12, queso Canastra contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (Fialho *et al.*, 2018), Coalho contra *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Meira *et al.*, 2012), Mozzarella, Gouda contra *L. ivanovii* y *E. coli* MC4100, (Théolier *et al.*, 2014b), entre otros. En México en particular esta actividad ha sido poco estudiada en lo que respecta a quesos, siendo el queso cocido, uno de ellos, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, y *Salmonella cholerae*. (Heredia-Castro *et al.*, 2015). En los estudios antes mencionados el efecto encontrado contra estas bacterias ha sido de tipo bacteriostático. Sin embargo, en el queso de prensa de la Costa Chica del estado de Guerrero no se han realizado estudios sobre las actividades biológicas generadas por péptidos bioactivos. Por lo cual el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antimicrobiana de extractos enriquecidos en péptidos (EEP) obtenidos a partir de quesos artesanales, contra cuatro bacterias patógenas, mediante el ensayo difusión en disco, para establecer la etapa de maduración donde quesos presenten una mayor actividad antimicrobiana.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Extractos enriquecidos péptidos de queso de prensa

Los EEP fueron obtenidos de acuerdo al procedimiento descrito por Baracé *et al.* (2016) con algunas modificaciones. Las muestras de queso a diferentes tiempos de maduración, previamente desgrasadas con hexano (240 mL), se mezclaron con agua destilada en una proporción 1:3 (p/v) y se ajustó a pH de 4.6. Posteriormente, los péptidos se extrajeron por homogeneización en vortex (2,000 rpm, 15 min) sonicación (15 minutos), incubación (40 °C ,110 rpm,1 h). El final, las mezclas se centrifugaron (8,000 rpm, 4 °C, 10 min) y se filtraron al vacío, a través de papel Whatman No.42®. Los filtrados se liofilizaron y almacenaron a una temperatura de -17°C, hasta su análisis (Schlichtherle-cerny, Affolter, & Cerny, 2003; Tanabe *et al.*, 2003).

4.2.2 Prueba de esterilidad de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa

Para verificar la ausencia de contaminantes microbianos, se colocaron alícuotas de 5 µL de cada uno de los extractos en Agar de Mueller Hinton (AMH) y Agar de Soya Tripticaseína adicionado de 0.6 % de extracto de levadura (ASTEL), estos medios fueron incubados a 35 °C por 72 h. Al término de la incubación, la ausencia de colonias bacterianas y/o fúngicas, fue considerado evidencia de esterilidad. Todos los EPP probados cumplieron con este criterio.

4.2.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos enriquecidos en péptidos de queso prensa

La selección de los microorganismos a probar se basó en la recomendación de Lorian (1986) de incluir *Escherichia coli* (bacteria Gram negativa) y *Staphylococcus aureus* (bacteria Gram positiva) en la evaluación *in vitro* de nuevos antibióticos cuya estructura exacta aún se desconoce. Las cepas *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 empleadas en este estudio son las indicadas por el CLSI como controles cuando se realizan pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos por la técnica de difusión en disco. Además, se incluyeron 2 aislamientos de bacterias patógenas asociadas al consumo de

quesos, una Gram positiva, *Listeria monocytogenes* cepa Scott y una Gram negativa, *Salmonella enterica* serotipo San Diego. La cepa *L. m* Scott procede de una infección ocurrida en personas y se seleccionó para comparar con lo reportado por otros autores que han utilizado esta cepa. *S.* San Diego fue aislada en un estudio previo a partir de ganglio linfático mesentérico de vaca, lo cual la hace cercana a cepas que puedan estar presentes en leche destinada a la elaboración de quesos.

Para el estudio de la actividad antimicrobiana se utilizaron 100 mg de extractos solubles en agua de queso prensa fueron disueltos con 1 mL de agua destilada estéril cada una, posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos.

Los cultivos de las diferentes cepas se reactivaron utilizando caldo infusión cerebro corazón y se incubaron a 35 °C por 24 horas. Una vez terminado el tiempo de incubación; las 4 cepas fueron subcultivadas en agar soya tripticaseína con 0.6 % de extracto de levadura (ASTEL) e incubadas a 35 °C por 22 ± 2 horas. En el caso de *L. monocytogenes* Scott A se incubó durante un período de 48 horas. Con la ayuda de un asa bacteriológica se seleccionaron entre 3 y 5 colonias características de las distintas cepas y se colocaron en un tubo de ensaye con 5 mL de solución salina fisiológica (NaCl 0.85 %), la turbidez fue ajustada con base al estándar 0.5 del nefelómetro de McFarland. De acuerdo con Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005) esta turbidez corresponde a 10⁸ Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC mL⁻¹).

Se tomó 0.1 mL de la suspensión la cual fue colocada en Agar Mueller Hinton (AMH) y extendida empleando un hisopo de algodón, realizando 3 giros de 60 grados y un reborde circular al final para cubrir toda la superficie del medio. En el caso de *Listeria monocytogenes* Scott A, la suspensión fue colocada en ASTEL. Transcurrido el máximo de 15 minutos recomendados para permitir que cualquier exceso de humedad se absorbiera (CLSI, 2006), en cada caja inoculada con los diferentes microorganismos fueron colocadas 4 gotas de 5 µL de los extractos solubles en agua de queso de prensa. Como control positivo se colocaron discos de papel filtro impregnados de ampicilina con 10 µg (BD®, Becton Dickinson),

mientras que para el control negativo se utilizó agua destilada (5 µL) ajustada a pH 4.6. Después de 15 minutos, para el secado de las gotas de los EPP, las cajas fueron incubadas a 35 °C por un periodo de 16-18 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición, observados en los controles y en los EPP, utilizando un Calibrador Vernier (Scala ®).

Adicional a la medición de los diámetros, los halos correspondientes a inhibición de *Listeria monocytogenes* Scott A fueron examinados mediante la técnica de Iluminación de Henry, que consiste en una trans-iluminación oblicua mediante una luz transmitida en un ángulo de 45°; de esta forma, las colonias de *Listeria* presentan una tonalidad azul o azul-gris (Lachica, 1990)

4.2.4 Recuento del inóculo utilizado

Este análisis se realizó con el fin de verificar la cantidad UFC mL⁻¹ presente en la suspensión ajustada con el nefelómetro de McFarland 0.5. Se tomó 1 mL de la suspensión y se realizaron 6 diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁶, se sembraron a partir de la dilución 10⁻⁴ en AMH para el caso de *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella* GB-7 y *S. aureus* ATCC 25923, mientras que para *L. m* Scott A se utilizó ASTEL por duplicado y se incubaron a 35 °C por 24 horas. Una vez cumplido el tiempo de incubación se realizó el recuento y se reportó en logaritmo base 10 del número de unidades formadoras de colonias por gramo (10ⁿ UFC.g⁻¹).

4.2.5 Verificación de viabilidad e identidad de los aislamientos

Para corroborar la viabilidad e identidad microbiológica de los aislamientos utilizados en este estudio, se seleccionaron las siguientes pruebas.

Identificación de *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella* San Diego: fermentación de glucosa, fermentación de lactosa y/o sacarosa, producción de ácido sulfhídrico, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, ureasa, movilidad, producción de indol, utilización de citrato y/o malonato, rojo de metilo y Vogues Proskauer. Identificación de *S. aureus* ATCC 25923: morfología colonial, Gram, producción de pigmentos y β-hemólisis.

Identificación de *Listeria monocytogenes*: Gram, catalasa, movilidad, hemolisis, CAMP, rojo de metilo, Vogues Proskauer, hidrolisis de esculina, fermentación de glucosa, maltosa, manitol, ramnosa y xilosa

4.2.6 Análisis estadístico

El análisis se realizó bajo un modelo mixto con medidas repetidas usando una estructura unifactorial de los tratamientos (quesos) y un esquema de aleatorización completamente al azar con cuatro repeticiones en el tiempo de maduración (0, 30, 60 y 90 días). Para la definición de estructura de varianzas se utilizó el método RELM (estimación por máxima verosimilitud restringida) y como criterio de información para elegir la estructura de la varianza más apropiada se usó el criterio de información bayesiano de Schwarz (BIC)(Correa Morales & Salazar Uribe, 2016; Sainz & Montero, 2004).

Para identificar las diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se utilizó la prueba de Tukey-Kramer para las comparaciones de medias. Todo el análisis se llevó a cabo en el paquete SAS versión 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EE.UU).

$$y = X\beta + Zb + e$$

Donde:

y = es un vector ($n \times 1$) de observaciones.

β = es un vector ($s \times 1$) de parámetros desconocidos de efectos fijos.

Z : es una matriz en el bloque diagonal cuyos bloques son las r matrices Z_i

b = es el vector $[b_1, b_2, \dots, b_r]$ que incluye los q parámetros aleatorios para cada una de las r parcelas, tal que $b \sim N(0, D)$

e : es un vector ($n \times 1$) que contiene los términos residuales del error, tal que $e \sim N(0, R)$

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa

En la Figura 17 se muestra la actividad antimicrobiana de los extractos enriquecidos de queso de prensa. En este estudio se observó que los extractos no presentaron efecto de inhibición sobre las cepas de las siguientes bacterias: *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella* San Diego y *S. aureus* ATCC 25922 en las cuatro queserías evaluadas. Este efecto podría deberse a diferencias en la composición de la membrana de las bacterias Gram positivas y Gram negativas pueden influir en la capacidad para inhibir el crecimiento. Generalmente las Gram negativas presentan una mayor resistencia debido a la mayor complejidad estructural y funcional de su envoltura celular (Coyle, Cavalieri, Rankin, Harbeck, & Sautter, 2006; Tafur & Villegas, 2008). Además de tener una membrana citoplasmática, poseen una membrana compuesta de lipopolisacáridos, fosfolípidos, lipoproteínas y proteínas que rodean a la célula, lo cual confiere una mayor resistencia (Corrêa *et al.*, 2011; Öztürk & Akin, 2017).

Los EPP no presentaron actividad antimicrobiana contra Gram negativas, pero si contra Gram positivas.

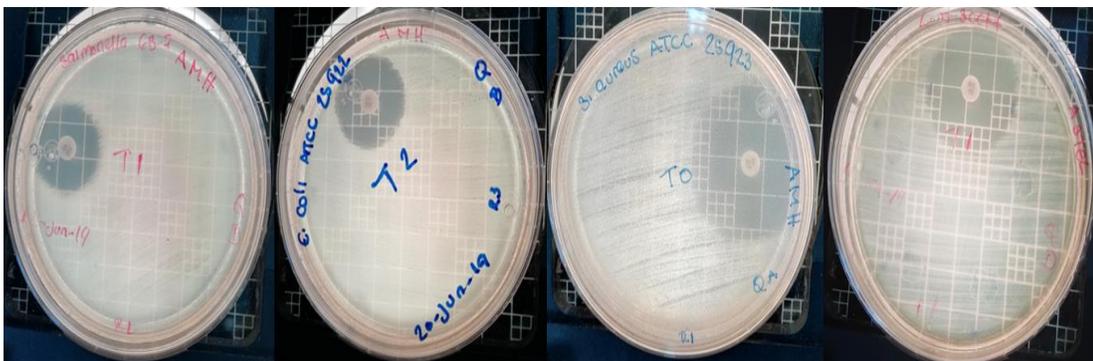


Figura 17. Resultados de la determinación antimicrobiana de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero. Se presentan de izquierda a derecha las pruebas para *Salmonella* San Diego, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 y *Listeria monocytogenes* Scott. Halo de inhibición presentado en las 4 cajas, corresponde al control positivo ampicilina 10 µg.

Sin embargo, para el caso de *S. aureus* ATCC 25922 (Gram positiva) se presentó un fenómeno de mayor crecimiento en los puntos donde se colocó la gota del extracto de péptidos, Esto no fue observado en todo el experimento, solamente se presenció en algunas cajas de las cuatro queserías: QA se presentó en el T0 y T2; mientras que en la QB fue T2, en la QC y QD en el T1. Este fenómeno podría deberse a que la caseína contiene prolina, la mayoría de los péptidos con actividad antioxidante contienen residuos de prolina (Mohanty, Mohapatra, Misra, & Sahu, 2016). Algunos autores indican que la prolina es indispensable en el metabolismo y desarrollo de *S. aureus* (Emmett & Kloos, 1975; Qi & Miller, 2000; Townsend, Kaenjak, Jayaswal, & Wilkinson, 1996). Lo anterior sugiere que los extractos utilizados en el desarrollo de esta investigación contienen residuos de prolina fomenta un efecto promotor del crecimiento de este microorganismo. De igual manera resistencia de las bacterias a los PAM de acuerdo con Téllez & Castaño (2010) y Castañeda-casimiro *et al.* (2009) se debe fundamentalmente a las propiedades de la bacteria relacionadas con la carga neta, a la estructura de los componentes, así como a la presencia de un potencial electroquímico en la membrana citoplasmática, y a la respuesta de la bacteria a cambios ambientales y bajo estrés, así como mecanismos de transporte, flujo y degradación del péptido. Por ejemplo, en el caso de *S. aureus* se conoce que su resistencia puede estar dada debido a que reduce las cargas negativas presentes en la superficie bacteriana, dicha reducción se encuentra dada a la esterificación ácido teicoico por D-alanina, cuando se introduce este aminoácido, desde el citoplasma hasta donde se encuentran el ácido teicoico, desencadenando así una reducción de las cargas negativas netas por la adición de grupos amino cargados positivamente. Otro mecanismo de defensa que presenta este microorganismo es la neutralización de los PAM por medio de la producción de ciertas moléculas que se encuentran unidas o secretadas las cuales tienen la capacidad de unirse a estos; *S. aureus* produce una proteína que es capaz de unirse con las α -defensinas humanas, logrando una inhibición del efecto bactericida. De igual forma al modificar su membrana citoplasmática aniónica con L-lisina a través de la proteína MprF, para resistir el ataque de los PAM.

Mientras en el caso de *Listeria monocytogenes* Scott se presentó evidencia para retardar su crecimiento (Figura 18). Asimismo, dentro de los halos de inhibición se observó la presencia de colonias. De acuerdo con Lorian (1986) la mayoría de los agentes antimicrobianos tienden a generar una inhibición parcial y un gradiente de respuesta decreciente en el cual el punto donde se colocó el antimicrobiano presenta una inhibición total del desarrollo microbiano, un área de retardo en el desarrollo, seguida de un anillo de desarrollo parcial, el cual es seguido por un anillo de desarrollo “estimulado”. El área de desarrollo “estimulado” se debe a que en esa zona las bacterias tienen acceso a una mayor cantidad de nutrientes que difunden del área adyacente donde se ha detenido el crecimiento bacteriano (Figura 19) se observan colonias dentro del halo, que corresponden a un retardo del crecimiento, y el anillo de desarrollo estimulado; este tipo de imagen es compatible con las observadas para medicamentos que son primariamente bacteriostáticos

En ensayos preliminares se observó que *L. monocytogenes* presentaba un crecimiento lento y pequeño en Agar Mueller Hinton por lo que se decidió utilizar el ASTEL el cual proporciona condiciones óptimas para el desarrollo de *Listeria* y permite identificar sus colonias mediante la Iluminación de Henry. Asimismo, se identifican con mayor facilidad los halos de inhibición.

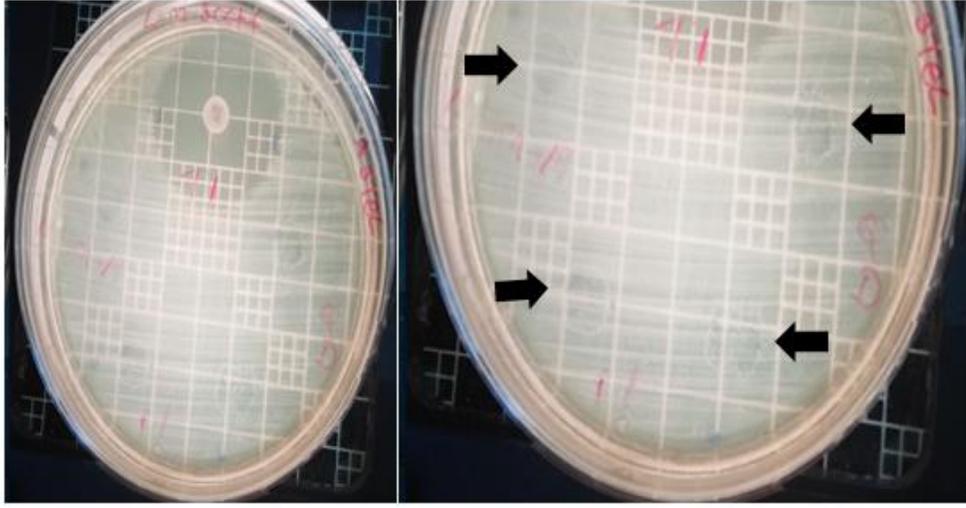


Figura 18. Halos de inhibición del desarrollo de *Listeria monocytogenes* Scott por contacto de extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero. Simple vista.

Los diámetros de la zona de inhibición de presentaron una tendencia decreciente conforme avanzó el tiempo de maduración como se puede observar en el Cuadro 1 y Figura 20 . La actividad antimicrobiana estuvo presente en las 4 queserías, si bien a concentraciones variables en los diferentes tiempos de maduración, persistió desde los 5 hasta los 90 días (T0 y T3, respectivamente). El análisis estadístico no mostro diferencia significativa ($p \leq 0.05$) de los diámetros de la zona de inhibición respecto a los tiempos de maduración.

Coelho *et al.* (2014) determinaron actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* en extractos de queso fresco durante 72 horas, en los cuales obtuvieron diámetros entre 14-8 mm respectivamente. En otro estudio realizado en por Corrêa *et al.* (2011) en el cual se determinó la actividad antimicrobiana hacia *Bacillus cereus* y *Corynebacterium fimi* en hidrolizados de caseinato de oveja durante 3 horas, encontrando que los diámetros obtenidos fueron de 9.3 a 11.5 mm. Asimismo, Rizzello *et al.* (2005) en un estudio realizado de la actividad antimicrobiana en diversas variedades de quesos italianos frente a *Lactobacillus sakei* A15, *Listeria innocua* DSM 20649, *Bacillus megaterium* F6, y *Escherichia coli* K12 en extractos solubles en agua de queso Caprino del Piemonte, y queso Crescenza, encontraron diámetros de inhibición de 3 a 6 mm. Öztürk & Akin (2017) identificaron un efecto inhibitorio contra *Salmonella typhimurium* ATCC

14028 en extractos acuosos de queso Tulum (leche de cabra) derivados de una maduración (90 días), la inhibición presentada fue de 44 mm. Los resultados de este estudio en los diámetros de inhibición se encuentran con valores similares a los reportados en los estudios antes mencionados. Las diferencias entre los diámetros de los halos de inhibición según Dal Bello *et al.* (2012) pueden deberse a múltiples factores relacionados con la composición del queso, así como el contenido de grasa, la degradación proteolítica, concentración de cloruro de sodio, entre otras. Respecto al nivel de proteólisis, si esta es muy elevada puede conducir a la degradación de los PAM en fragmentos inactivo provocando que la actividad antimicrobiana no pueda ser detectada (Lignitto *et al.*, 2012).

Asimismo, el tamaño de los halos de inhibición obtenidos no solo depende de la sensibilidad del microorganismo o la concentración del agente antimicrobiano, sino también a factores tales como: condiciones del medio utilizado (espesor, pH, nutrientes), la capacidad de difusión del agente antimicrobiano en el medio, el tiempo de aplicación y secado del microorganismo, tiempo de incubación, y la densidad del inóculo (Lorian, 1986).

Cuadro 1. Actividad antimicrobiana de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero contra *Listeria monocytogenes* Scott a en los diferentes tiempos de maduración.

Quesería	Zona de inhibición (mm)*			
	T0	T1	T2	T3
A	6.57±1.19	6.33±0.59	6.38±0.66	5.86±0.69
B	6.38±0.33	6.33±0.71	6.3±0.91	6.52±0.66
C	6.54±1.36	6.96±1.26	7.14±1.37	6.46±0.62
D	6.33±0.41	6.58±0.44	6.51±0.19	6.009±0.42

*Media ± Desviación estándar de determinaciones por cuadruplicado.

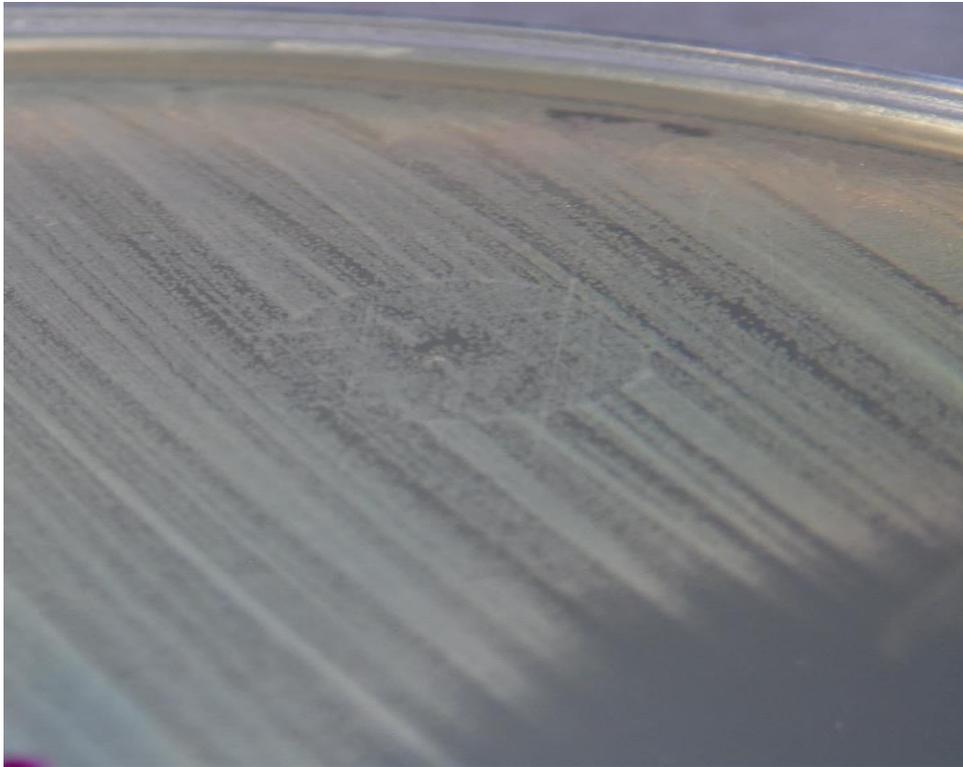


Figura 19. Halo de inhibición del desarrollo de *Listeria monocytogenes* Scott por contacto con extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero. Quesería C (T1).

De igual forma la densidad del inóculo es de suma importancia, cuando se aplica menor cantidad del inóculo los halos de inhibición presentes tienen hacer de mayor tamaño. Asimismo, al aplicar una mayor cantidad del inóculo se obtienen halos de inhibición de menor tamaño. Por tal motivo la densidad del inóculo fue verificada semanalmente en tres ocasiones obteniendo recuentos entre 1.84 a 8.2×10^7 para todos los microorganismos probados, excepto en una ocasión en que el recuento de *S. aureus* fue de 8.4×10^6 y ello condujo a la decisión de repetir el análisis. (Lorian, 1986) indica que aceptable una diferencia de una potencia (10^7) y Bennett *et al.* (1968) mencionan que con inóculos de 10^7 se observan halos más nítidos lo cual favorece a la detección de actividad antimicrobiana.

Por otro lado, halos de inhibición pequeños pueden deberse a la interacción con agentes antimicrobianos catiónicos. Lo cual ayuda a inferir que los extractos

utilizados en esta investigación podrían contener en su mayoría péptidos catiónicos.

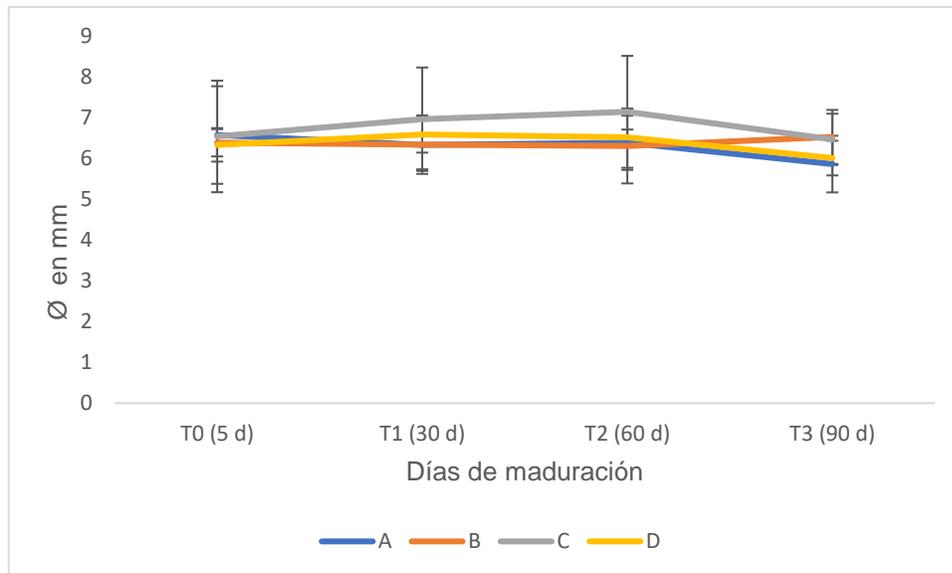


Figura 20 Actividad antimicrobiana de los extractos enriquecidos en péptidos de queso de prensa de Guerrero en el tiempo de maduración contra *L. monocytogenes* Scott. Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en cada quesería.

Emmental de Savoie y Asiago. Meira *et al.* (2012) no encontró actividad antimicrobiana contra *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 8739, y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 en extractos acuosos de quesos ovinos del sur de Brasil y Uruguay. Pritchard *et al.* (2010) identificaron actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Bacillus cereus* ATCC 11778 en extractos de queso Cheddar. Lignitto *et al.* (2012) mostraron actividad antimicrobiana contra *L. innocua* LRGIA01 en extractos de queso Asiago d'Allevo. Théolier *et al.* (2014b) evidenciaron actividad antimicrobiana contra *L. ivanovii* y *E. coli* MC4100 en extractos de queso Mozzarella y Gouda.

Es de suma importancia realizar una identificación y aislamientos de estos compuestos, así como dichos metabolitos presentes en los extractos solubles en agua del queso para saber si se trata de un compuesto antimicrobiano del tipo "péptidos antimicrobianos", asimismo el realizar pruebas (estabilidad a diferentes

pH, comportamiento a enzimas proteolíticas, entre otras) en diferentes condiciones a los extractos con el fin de obtener una mayor información sobre estas sustancias antimicrobianas presentes en el queso.

4.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que los extractos enriquecidos en péptidos obtenidos de queso de prensa de la Costa Chica del estado de Guerrero presentaron una actividad antimicrobiana de tipo bacteriostático contra *Listeria monocytogenes* Scott, la zona de inhibición fue de alrededor de 6 mm.

Los extractos enriquecidos en péptidos no mostraron actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* San Diego y *Staphylococcus aureus*.

4.5 Agradecimientos

Dr. Ricardo Alaniz de la O por su orientación para emplear el procedimiento de gota en lugar del procedimiento de impregnación de discos.

Dra. Angélica Luis Juan Morales por proporcionar la cepa de *Listeria monocytogenes* Scott.

Teresa Lías Macias estudiante de Licenciatura en Ciencia de los Alimentos por su apoyo en la preparación de medios de cultivos y realización de recuentos.

4.6 Bibliografía

- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- Barać, M., Smiljanić, M., Žilić, S., Pešić, M., Stanojević, S., Vasić, M., & Vučić, T. (2016). Proteinski profili i ukupni antioksidativni kapacitet u vodi topljivih i netopljivih proteinskih frakcija bijelog sira u salamuri u razlicitim fazama zrenja. *Mljekarstvo*, 66(3), 187–197. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2016.0303>
- Bennett, J. V., Camp, H. M., & Eickhoff, T. C. (1968). Rapid sulfonamide disc sensitivity test for meningococci. *Applied Microbiology*, 16(7), 1056–1060.
- Castañeda-casimiro, J., Ortega-roque, J. A., Marcela, A., Aquino-andrade, A., Serafín-lópez, J., Estrada-parra, S., & Estrada, I. (2009). Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alergia, Asma E Inmunología*, 18(1), 16–29. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2009/al091d.pdf>
- CLSI. (2005). *Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals ; Proposed Guideline PLEASE* (Vol. 25).
- Coelho, M. C., Silva, C. C. G., Ribeiro, S. C., Dapkevicius, M. L. N. E., & Rosa, H. J. D. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.029>
- Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Coelho, J., Meira, S. M., Lopes, F. C., Segalin, J., ... Brandelli, A. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2247–2254. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4446>
- Correa Morales, J. C., & Salazar Uribe, J. C. (2016). *Introducción a los modelos mixtos*.
- Coyle, M., Cavalieri, S. J., Rankin, I. D., Harbeck, R. J., & Sautter, R. L. (2006). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*.
- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P. D., & Hill, C. (2012). Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1–2), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.016>
- Emmett, M., & Kloos, W. E. (1975). Amino acid requirements of staphylococci

- isolated from human skin. *Canadian Journal of Microbiology*, 21(5), 729–733. <https://doi.org/10.1139/m75-107>
- Fialho, T. L., Carrijo, L. C., Magalhães Júnior, M. J., Baracat-Pereira, M. C., Piccoli, R. H., & de Abreu, L. R. (2018). Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese. *Food Research International*, 107(August 2017), 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.009>
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L. da S., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. M. (2013). Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>
- Heredia-Castro, P. Y., Méndez-Romero, J. I., Hernández-Mendoza, A., Acedo-Félix, E., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2015). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8285–8293. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10104>
- Lachica, R. V. (1990). Simplified Henry technique for initial recognition of *Listeria* colonies. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4), 1164–1165.
- Lignitto, L., Segato, S., Balzan, S., Cavatorta, V., Oulahal, N., Sforza, S., Novelli, E. (2012). Preliminary investigation on the presence of peptides inhibiting the growth of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in Asiago d'Allevo cheese. *Dairy Science and Technology*, 92(3), 297–308. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0057-6>
- López-Pérez, P. M., Grimsey, E., Bourne, L., Mikut, R., & Hilpert, K. (2017). Screening and optimizing antimicrobial peptides by using SPOT-synthesis. *Frontiers in Chemistry*, 5(APR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00025>
- Lorian, V.(ed.) (1986). *Antibiotics in laboratory Medicine*. 2ed. Baltimore USA. Williams & Wilkins.
- Meira, S. M. M., Daroit, D. J., Helfer, V. E., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, 48(1), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.009>
- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., & Sahu, P. S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.005>

- Mushtaq, M., Gani, A., Shetty, P. H., Masoodi, F. A., & Ahmad, M. (2015). Himalayan cheese (Kalari/kradi): Effect of different storage temperatures on its physicochemical, microbiological and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 837–845. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.054>
- Öztürk, H. İ., & Akin, N. (2017). Comparison of some functionalities of water soluble peptides derived from Turkish cow and goat milk tulum cheeses during ripening. *Food Science and Technology*, 38(4), 674–682. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.11917>
- Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5), 1545–1548. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.007>
- Qi, Y., & Miller, K. J. (2000). Effect of low water activity on staphylococcal enterotoxin A and B biosynthesis. *Journal of Food Protection*, 63(4), 473–478. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.4.473>
- Rai, M., Pandit, R., Gaikwad, S., & Kövics, G. (2016). Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3381–3394. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2318-5>
- Rizzello, C. G., Losito, I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D., & Zambonin, P. G. (2005). Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2348–2360. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72913-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72913-1)
- Sainz, R. C., & Montero, G. (2004). Caso Práctico De Modelización Del Crecimiento Y Producción De Las Masas Forestales, 321, 317–321.
- Schlichtherle-cerny, H., Affolter, M., & Cerny, C. (2003). Coupled to Electrospray Mass Spectrometry of Small Polar Compounds in Food Analysis, 75(10), 3038–3043.
- Tafur, D., & Villegas, V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Infectio*, 12(3), 227–232.
- Tanabe, S., Tesaki, S., Watanabe, J., Fukushi, E., Sonoyama, K., & Kawabata, J. (2003). Isolation and Structural Elucidation of a Peptide Derived from Edam Cheese that Inhibits β -Lactoglobulin Transport. *Journal of Dairy Science*, 86(2), 464–468. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73625-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73625-X)
- Téllez, G. , & Castaño, J. . (2010). Péptidos antimicrobianos Antimicrobial peptides, 14(1), 55–67. Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Théolier, J., Fliss, I., Jean, J., & Hammami, R. (2014). Antimicrobial Peptides of Dairy Proteins: From Fundamental to Applications. *Food Reviews International*, 30(2), 134–154. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.896017>

Théolier, J., Hammami, R., Fliss, I., & Jean, J. (2014). Antibacterial and antifungal activity of water-soluble extracts from Mozzarella, Gouda, Swiss, and Cheddar commercial cheeses produced in Canada. *Dairy Science and Technology*, 94(5), 427–438. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0170-9>

Townsend, D. E., Kaenjak, A., Jayaswal, R. K., & Wilkinson, B. J. (1996). Proline is biosynthesized from arginine in. *Microbiology*, 142, 1491–1497.

Vogelman, B., & Craig, W. A. (1986). Kinetics of antimicrobial activity. *The Journal of Pediatrics*, 108, 835–840. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(86\)80754-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(86)80754-5)

5 Anexo

Análisis microbiológico de quesos artesanales, en diferentes etapas de maduración, de Cuajinicuilapa Guerrero

Resumen

El queso de prensa o también llamado costeño es un queso elaborado artesanalmente y semimadurado en la región de la Costa Chica del estado de Guerrero, a partir de leche cruda de vaca. El objetivo de este trabajo fue determinar la calidad microbiológica de quesos de prensa adquiridos en cuatro queserías de Cuajinicuilapa, Guerrero, México. Para cada una de las muestras de queso (A, B, C, D) sin madurar y madurados a 30, 60 y 90 días, se determinó la presencia de coliformes totales (CT), bacterias mesófilas aerobias (BMA), bacterias ácido lácticas y *Staphylococcus aureus* en Placas 3M™ Petrifilm™. Una muestra 25 g de queso fue mezclada con agua peptonada 0.1 %, se homogenizó, y se hicieron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . En general los resultados muestran que conforme avanza el tiempo de maduración en el queso de prensa, el contenido de microorganismos disminuye. Para CT, BMA, BAL y *S. aureus* los valores oscilaron entre 4 a 2, 6 a 3, 6 a 2 y 5 a 2 \log_{10} UFC g^{-1} , respectivamente. La maduración influyó en la disminución de la microbiota presente en los quesos

Palabras claves: maduración, queso prensa, calidad microbiológica

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: LCA. José Alberto Mendoza Cuevas

Director de Tesis: Dra. Diana Guerra Ramírez

Microbiological analysis of artisan cheeses, during several phases of ripening, from Cuajinicuilapa, Guerrero

Abstract

Pressed cheese or also called “costeño” is a semi-cured artisan cheese from the region of Costa Chica, Guerrero, made from raw cow milk. The purpose of this of this project was to determine the microbiological quality of prensa cheeses obtained from 4 cheese factories of Cuajinicuilapa, Guerrero, Mexico. Samples (A, B, C, D) were taken from unripened and ripening cheeses at 30, 60 and 90 days. Total coliforms (TC), aerobic mesophilic bacteria (AMB), lactic acid bacteria (LAB) and *Staphylococcus aureus* were quantified for each one of the samples by using 3M™ Petrifilm™. A 25 g cheese was mixed with peptone water (0.1 %) and homogenised. Dilutions were made from 10^{-1} to 10^{-6} . The results in general showed that as ripening time progresses in the prensa cheese, the count of microorganisms decreases. For TC, AMB, ALB and *S. aureus* the count oscillated between 4 to 2, 6 to 3, 6 to 2 y 5 to 2 \log_{10} CFU/g, respectively. The ripening influenced in the decrease of the microbiota present in the cheeses.

Key words: ripening, prensa cheese, microbiological quality.

Thesis : Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo

Author: LCA. José Alberto Mendoza Cuevas

Advirsor: Dra. Diana Guerra Ramírez

5.1 Introducción

El queso es un alimento esencial utilizado por las personas alrededor del mundo en diversas preparaciones gastronómicas que forman parte de sus tradiciones y costumbres. En el mundo se elaboran más de 2000 variedades de quesos (maduros, semi-maduros y frescos) teniendo características sensoriales, nutricionales, funcionales y texturales entre cada una de las variedades (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2012). Existen diversos parámetros para clasificar los quesos entre los que se destacan: el tipo de leche (vaca, oveja, cabra) o mezclas de estas, el tipo de coagulación (enzimática, ácida o mixta), textura, el contenido de humedad, la cantidad de extracto seco, la materia grasa, el tipo de microorganismo empleado, la zona geográfica de elaboración o lugar de procedencia, así como el tipo de tecnología usada durante su fabricación (González-Montiel & Franco-Fernández, 2015; Walstra, Wouters, & Geurts, 2006). De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera en el 2018 la industria quesera produjo 65 mil 942 toneladas. Siendo el queso fresco (17.5%), el doble crema (15.7%), el panela (12.8%), los de mayor producción y consumo.

En México se conocen alrededor de 40 quesos artesanales, destacando los quesos frescos, quesos maduros (Cotija, adobera, queso maduro de Veracruz, Zacazonapan, entre otros) (Sánchez-Valdés *et al.*, 2016). Estos son elaborados a partir de leche cruda, por lo general de vacas criollas, con fermentación espontánea y tiempos de maduración diversos, así como procesos de fabricación no tecnificados (González-Montiel & Franco-Fernández, 2015; Torres-Llanez, Vallejo-Cordoba, Díaz-Cinco, Mazorra-Manzano, & González-Córdova, 2006; Vasek, Cardozo, & Fusco, 2008).

El queso de prensa es semi-madurado elaborado en la región de la Costa Chica de Guerrero y Oaxaca, siendo los municipios de Cuajinicuilapa, Ometepec (Guerrero) y Pinotepa Nacional (Oaxaca) los principales productores. Se comercializa dentro de la misma región, en Acapulco y otras regiones colindantes (Sandoval-Alarcón, 2016).

La mayoría de los quesos artesanales en México se elaboran en pequeñas o medias empresas en las cuales el proceso de manufactura no se encuentra estandarizado. Esto debido a aspectos primordiales del proceso tales como: la poca o nula implementación de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM's), así como a la deficiencia de prácticas higiénicas en el lugar de fabricación, a la inexistente revisión de parámetros de control de calidad de las materias utilizadas, procesos de fabricación no estandarizados, entre otro más (Castro-Castillo *et al.*, 2013; González-Montiel & Franco-Fernández, 2015). Lo cual nos puede predisponer a pensar que los quesos artesanales pueden representar un riesgo a la salud del consumidor, desencadenando enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS). No obstante, en varias investigaciones se ha demostrado que la microflora nativa de la leche además de influir en las características bioquímicas y sensoriales puede repercutir en las características microbiológicas del queso (Castro-Castillo *et al.*, 2013; Sánchez-Valdés *et al.*, 2016). El objetivo de esta investigación fue determinar la calidad microbiológica del queso de prensa, sin madurar y madurados a 30, 60 y 90 días, elaborado en 4 queserías del Estado de Guerrero, México; mediante la técnica de recuento microbiológico, para determinar cómo influye la etapa de madurada sobre la carga microbiana.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Muestras de queso

En este estudio se analizaron muestras de queso prensa producido de forma artesanal en el municipio de Cuajiniculipa, Guerrero, México (16°28'18"N 99°24'55'O). De los fabricantes de queso, se seleccionaron cuatro y de cada quesería fueron adquiridos cuatro quesos de 1 kg. Las muestras de queso fueron trasladadas al municipio de San Marcos, Gro. (16°47'46"N 99°23'05'O), en donde se controlaron las condiciones de almacenamiento y maduración. Los quesos fueron divididos en cuatro lotes, cada lote fue sometido a diferentes tiempos de maduración (30, 60 y 90 días); una vez completado el tiempo cada lote fue trasladado a la Universidad Autónoma Chapingo. Las muestras se mantuvieron en refrigeración (a 4 °C) hasta su análisis.

5.2.2 Preparación de la muestra

Se pesaron 25 g de cada muestra de queso, y posteriormente se adicionaron en frasco de dilución que contenían 225 mL de agua Peptonada al 0.1 %, la mezcla se homogeneizó durante 2 minutos (Vortex GENEIX®, Scientific Industries) y se hicieron diluciones mediante la transferencia de 1 mL de la muestra a un frasco vial que contenía 9 mL de agua peptonada al 0.1 % (10^{-1} hasta 10^{-6}).

5.2.3 Determinación de microorganismos aerobios (BMA)

Para el análisis de mesófilos aerobios se sembraron las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} en Placas 3M™ Petrifilm™ para el recuento de aerobios (AC) por duplicado y se incubaron a 35 ± 2 °C durante 48 ± 3 horas. Una vez cumplido el tiempo de incubación se tomó lectura del crecimiento en las placas, se hizo el recuento y se reportó en logaritmo base 10 del número de unidades formadoras de colonias por gramo (\log_{10} UFC.g⁻¹) (Haddad & Yamani, 2017).

5.2.4 Determinación de coliformes totales (CT)

Para el análisis de Coliformes totales se sembraron, las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , en Placas 3M™ Petrifilm™ para el recuento de coliformes (CT) por duplicado y se incubaron a 35 ± 1 °C durante 24 ± 2 horas. Una vez cumplido el tiempo de incubación se tomó lectura del crecimiento en las placas, se hizo el recuento y se reportó en logaritmo base 10 del número de unidades formadoras de colonias por gramo (\log_{10} UFC.g⁻¹) (Haddad & Yamani, 2017).

5.2.5 Determinación de *Staphylococcus aureus*

Para el análisis de *Staphylococcus aureus* se sembraron las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} en Placas 3M™ Petrifilm™ Staph Express para el recuento de *Staphylococcus aureus* por duplicado y se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 horas. Una vez cumplido el tiempo de incubación se tomó lectura del crecimiento en las placas, se hizo el recuento y se reportó en logaritmo base 10 del número de unidades formadoras de colonias por gramo (\log_{10} UFC.g⁻¹) (González-Montiel & Franco-Fernández, 2015).

5.2.6 Determinación de bacterias ácido lácticas (BAL)

Para el análisis de BAL se sembraron a partir de las diluciones 10^{-3} hasta la dilución 10^{-6} en Placas 3M™ Petrifilm™ para Recuento Bacterias Ácidolácticas por duplicado y se incubaron a 35 ± 2 °C durante 48 ± 3 horas. Una vez cumplido el tiempo de incubación se tomó lectura del crecimiento en las placas, se hizo el recuento y se reportó en logaritmo base 10 del número de unidades formadoras de colonias por gramo (\log_{10} UFC.g⁻¹) (Haddad & Yamani, 2017).

5.2.7 Análisis estadístico

El diseño de los tratamientos se basó en el factor queserías (4 niveles) y como variables respuestas fueron: Cuenta Total de BMA, CT, BAL y *S. aureus*. Para el análisis de los datos se utilizó un modelo Mixto con estructura unifactorial de los tratamientos (queserías) y un esquema de aleatorización completamente al azar con cuatro repeticiones en el tiempo de maduración (0, 30, 60 y 90 días). De esta

manera se ensayaron 16 tratamientos con cuatro repeticiones, teniendo un total de 64 unidades experimentales (Correa Morales & Salazar Uribe, 2016; Sainz & Montero, 2004)

Mientras que para la definición de estructura de varianzas se utilizó el método RELM (estimación por máxima verosimilitud restringida) y como criterio de información para elegir la estructura de la varianza más apropiada se usó el criterio de información bayesiano de Schwarz (BIC) (Correa Morales & Salazar Uribe, 2016).

Para identificar las diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se utilizó la prueba de Tukey-Kramer para las comparaciones de medias. Todo el análisis se llevó a cabo en el paquete SAS versión 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EE. UU).

$$y = X\beta + Zb + e$$

Donde:

y = es un vector ($n \times 1$) de observaciones.

β = es un vector ($s \times 1$) de parámetros desconocidos de efectos fijos.

Z : es una matriz en el bloque diagonal cuyos bloques son las r matrices Z_i

b = es el vector $[b_1, b_2, \dots, b_r]$ que incluye los q parámetros aleatorios para cada una de las r parcelas, tal que $b \sim N(0, D)$

e : es un vector ($n \times 1$) que contiene los términos residuales del error, tal que $e \sim N(0, R)$

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Determinación de bacterias mesófilas aerobias (BMA) durante el tiempo de maduración del queso

En la Figura 21 se muestra el recuento de BMA durante el tiempo de maduración del queso de prensa. En general se observó una disminución en el recuento de BMA durante el tiempo de maduración del queso de prensa. A tiempo cero (T0) se presentó la mayor carga microbiana de BMA y a medida que avanzaron los días de maduración, la carga microbiana fue disminuyendo hasta llegar al mínimo valor en el T3. Los valores de este recuento oscilaron entre 6.31 y 3.15 log₁₀ UFC g⁻¹. El análisis estadístico mostró que hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido de BMA, en tres de las 4 queserías (QA, QB y QC), causado por el proceso de maduración ya que durante este proceso ocurren cambios bióticos y abióticos que repercuten de forma directa sobre la calidad microbiológica del queso de prensa (Fox *et al.*, 2017). El efecto de la maduración a los 90 días (T3) (Figura 22), disminuyó en 31.61 %, 45.22 % y 59.27 %, respectivamente, sobre las UFC g⁻¹ que a los 0 días (T0). Mientras que para la QD no hubo diferencias ($p \leq 0.05$), mostrando una media general de 5.13 UFC g⁻¹.

En quesos artesanales mexicanos, Sánchez-Valdés *et al.* (2016) reportaron conteos de 9.26 log₁₀ UFC g⁻¹ de BMA en queso Zacazonapan. En cambio, Ramírez-Rivera *et al.* (2017) encontró en quesos madurados de leche de cabra valores menores, los cuales oscilan entre 4.61 y 3.52 log₁₀ UFC g⁻¹. Entretanto, Flores-Magallón *et al.* (2011) caracterizaron microbiológicamente el queso Cotija en el cual obtuvieron conteos de 5.3 log₁₀ UFC g⁻¹ a los 30 días de maduración, mientras que a los 90 días de maduración presentaron 1.8 log₁₀ UFC g⁻¹

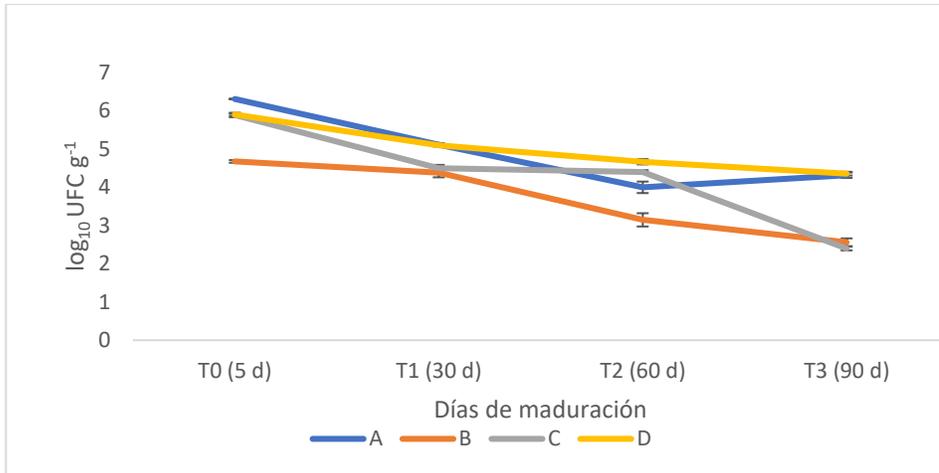


Figura 21. Recuento microbiológico de bacterias mesófilas aerobias en queso de prensa de Guerrero durante el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos recolectados en las cuatro queserías.

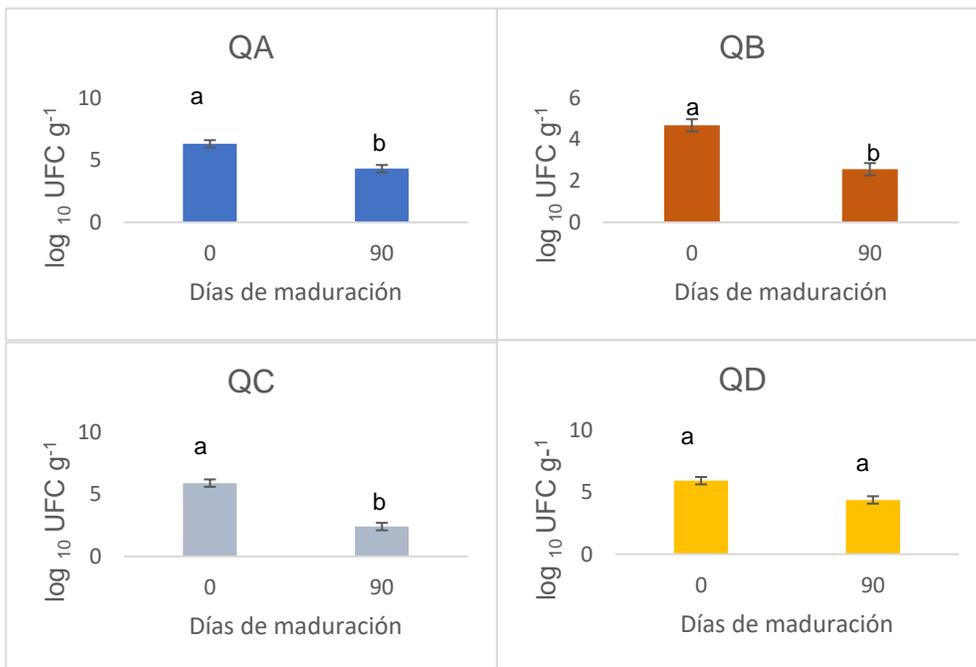


Figura 22. Bacterias mesófilas aerobias en queso de prensa, a los 0 y 90 días de maduración (T1 y T3). Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en las cuatro queserías. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

De acuerdo con Haddad & Yamani (2017) en queso blanco blando (Jordania) reportando $8.3 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$. Por otro lado, Panda *et al.* (2016) obtuvieron valores 9.24 a $5.83 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ en queso Chhurpi (India). Mientras que Amran & Abbas (2011) estudiaron un queso local de Yemeni en los que presentaron valores de 9.4 a $8.86 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ a los 0 días de almacenamiento, para los 2 días el conteo incremento 11.97 a $9.8 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$, sin embargo, para los 7 días este disminuyó de 9.7 a $9.04 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$. Mientras tanto Mirzaei (2011) obtuvo conteos de BMA que disminuían conforme transcurría el día de almacenamiento del queso Lighvan (Iran) 6.65, 5.94 y 5,84 $\log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ a los 30, 60 y 90 días respectivamente.

Los resultados obtenidos para microorganismos mesófilos aerobios son similares a los reportados en diversos quesos artesanales tanto de México, como de otros países, sin embargo, cabe mencionar que el proceso de fabricación de estos es diferente, por lo cual pueden diferir debido a que cada queso es una matriz diferente, estos resultados proporcionan una panorámica general.

Diversos autores coinciden que un elevado conteo de BMA indican una deficiencia en las condiciones generales de higiene en etapas de la recepción de la leche durante la recolección, distribución y transporte entre otras más. Este factor tiene vital importancia, debido a que puede impactar en la calidad final del queso. Asimismo, de indican prácticas higiénicas durante la manipulación del queso en las diferentes etapas del proceso (Haddad & Yamani, 2017; Torres-Llanez *et al.*, 2006). González-Montiel & Franco-Fernández (2015) mencionan que recuentos altos sugieren un almacenamiento inadecuado o la presencia de microorganismos patógenos.

Otros autores mencionan que dentro del grupo de las BMA pueden encontrarse bacterias que influyen en las características bioquímicas, sensoriales y organolépticas del queso (González-Montiel & Franco-Fernández, 2015; Sánchez-Valdés *et al.*, 2016).

5.3.2 Determinación de coliformes totales (CT) durante el tiempo de maduración del queso

El recuento de CT decreció durante el periodo de maduración del queso de prensa como se puede observar en la Figura 23, el rango de los valores obtenidos fue de 4.7 y 2.07 \log_{10} UFC g^{-1} . Los cambios microbiológicos durante la etapa de maduración pueden promover la presencia de diversos microorganismos en la matriz del queso, cuya actividad metabólica es la generación de ciertos compuestos, los cuales además de tener efecto sobre las características sensoriales también lo tienen en las características microbiológicas del queso (Sánchez-Gamboa *et al.*, 2018). El menor contenido de CT se presentó a los 90 días de maduración, siendo significativamente menor ($p \leq 0.05$) (Figura) en la QA y QD; mientras que para QB y QC no hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$), mostrando una media general de 2.2478 \log_{10} UFC g^{-1} .

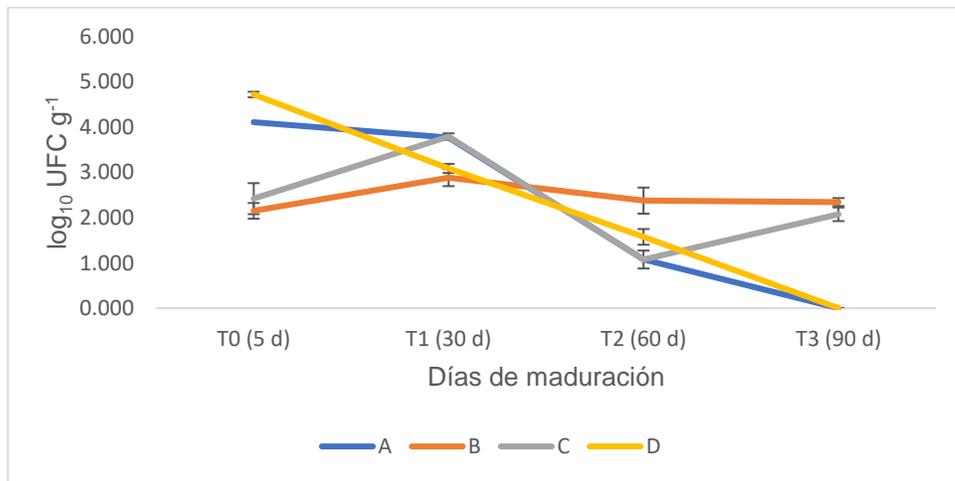


Figura 23. Recuento microbiológico de coliformes totales en queso prensa de Guerrero. Durante el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos recolectados en las cuatro queserías.

Los resultados obtenidos para CT en este estudio se encuentran por debajo de lo reportado por Sánchez-Valdés *et al.* (2016) en el queso de Zacazonapan 9.27 \log_{10} UFC g^{-1} ., en queso de aro de la cañada Oaxaqueña se obtuvieron conteos 6.93 \log_{10} UFC g^{-1} . Mientras que Sánchez-Gamboa *et al.* (2018) presentó valores 5.1 a 3.3 \log_{10} UFC g^{-1} y 3.04 a 6.04 \log_{10} UFC/g en el queso Chihuahua. En

tanto Ramírez-Rivera *et al.* (2018) obtuvo valores 0 log₁₀ UFC/g en quesos madurados de leche de oveja.

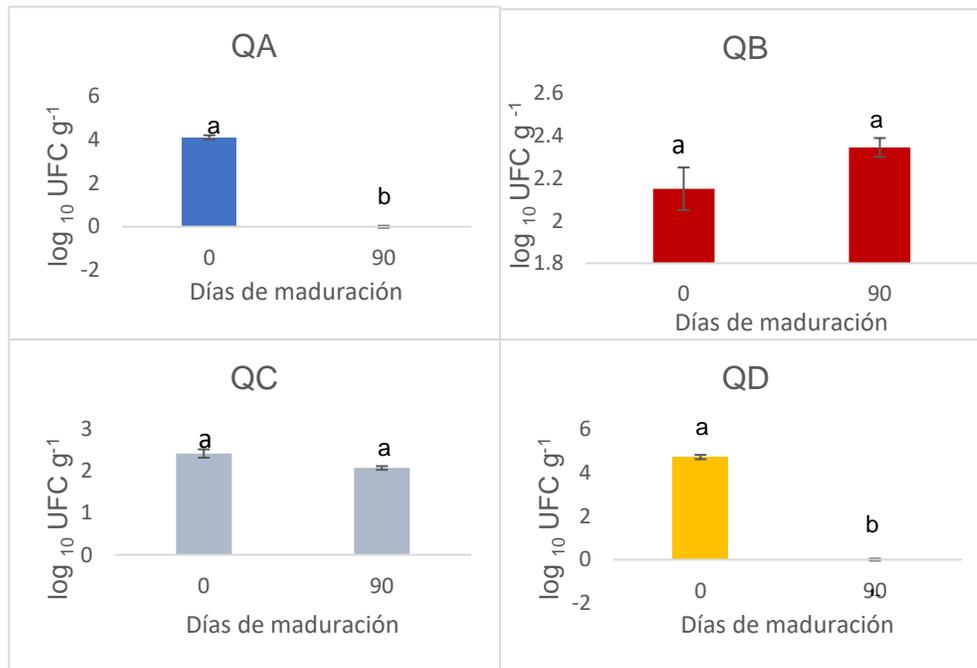


Figura 24. Coliformes totales en queso de prensa, a los 0 y 90 días de maduración (T1 y T3). Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en las cuatro queserías. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

En comparación con trabajos de quesos artesanales de otros países los resultados obtenidos son similares, por ejemplo, en el queso blanco blando de Jordania el conteo de CT osciló 4.3 a 6.4 log₁₀ UFC g⁻¹ (Haddad & Yamani, 2017). Mientras que para el queso Lighvan fueron en descenso de 4.09, 2.43 y 1.66 log₁₀ UFC g⁻¹ a los 30, 60 y 90 días respectivamente (Mirzaei, 2011), tendencia que se observó en este trabajo.

La presencia de CT es un indicador de contaminación fecal directa o indirecta; asimismo refleja la falta de higiene durante la manipulación de los quesos en el proceso de fabricación. Además de sugerir la posible presencia de microorganismos patógenos (Alejo-Martínez, Ortiz-Hernández, Recino-Metelin, González-Cortés, & Jiménez-Vera, 2015; Castro-Castillo *et al.*, 2013; González-Montiel & Franco-Fernández, 2015). De igual manera se encuentran relacionados a la materia prima principalmente con el lugar de donde se extrajo, así como las

condiciones de higiene que se llevaron a cabo durante ese proceso, además del periodo de almacenamiento de la leche previo a la elaboración del queso (Vásquez, Gerardo, Jiménez, & Abanto, 2018).

Una elevada concentración de CT puede producir defectos en los quesos debido a que son capaces de metabolizar lactosa y producir elevadas concentraciones de gas.

5.3.3 Determinación de *Staphylococcus aureus* durante el tiempo de maduración del queso

Conforme transcurrió el tiempo de maduración del queso de prensa el conteo de *S. aureus* indicó una tendencia decreciente en un rango de 5.87 a 2.42 log₁₀ UFC g⁻¹. Como se muestra en la *Figura 25* el T0 presenta el recuento más alto de esta bacteria y acorde aumentaron los días de días de maduración, el conteo de *S. aureus* descendió hasta alcanzar su mínimo valor en el T3. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido de *S. aureus*, en las cuatro queserías (QA, QB, QC y QD) a los 90 días de maduración del queso (*Figura 26*), teniendo una disminución de 54.11 %, 35.38 %, 52.65 % y 55.82 % respectivamente.

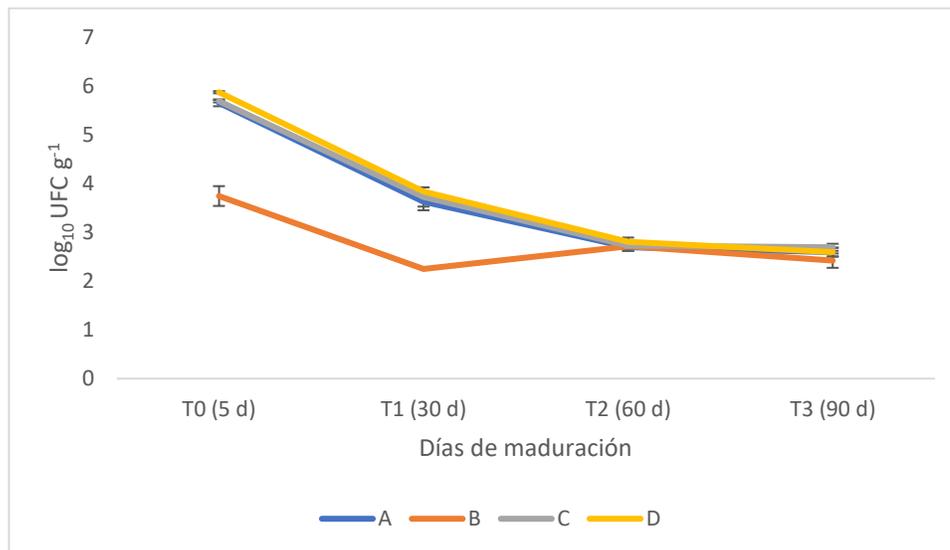


Figura 25. Recuento microbiológico de *S. aureus* en queso de prensa de Guerrero durante el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos recolectados en las cuatro queserías.

De acuerdo con Ramírez-Rivera *et al.* (2018) mencionan que la ausencia o disminución de algunos microorganismos entre los que se encuentra el *S. aureus* puede deberse a la interacción entre pH ácido, actividad de agua y competencia con el cultivo láctico.

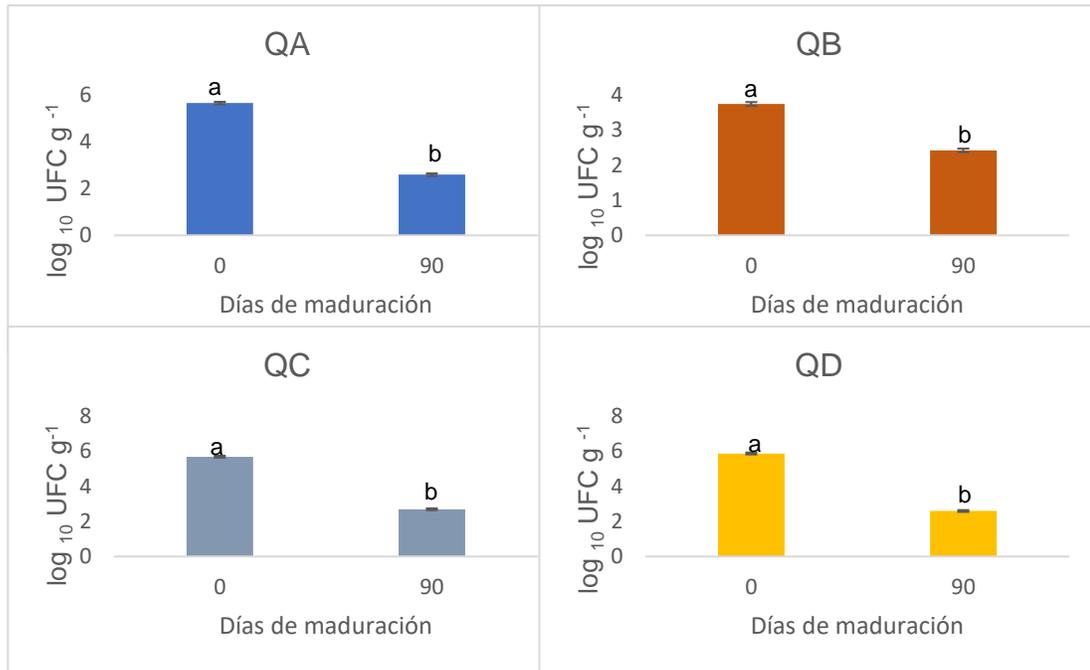


Figura 26. *S. aureus* en queso de prensa, a los 0 y 90 días de maduración (T1 y T3). Las barras indican el error estándar de los quesos colectados en las cuatro queserías. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

Los valores encontrados de *S. aureus* en los quesos analizados en este trabajo son similares a los reportados por otros autores en diversos quesos artesanales mexicanos. Alejo-Martínez *et al.* (2015) en queso Poro presentó un incremento conforme avanzaron los días de almacenamiento 6.43 a 6.97 log₁₀ UFC g⁻¹ a los 3 y 12 días respectivamente. Por otro lado, en quesos artesanales elaborados en otros países se han reportado lo siguiente: Mirzaei (2011) encontró valores de 3.75 log₁₀ UFC g⁻¹ en el primer mes de almacenamiento, mientras que para el segundo fueron de 3.73 log₁₀ UFC g⁻¹ y para el tercer mes de 2.66 log₁₀ UFC g⁻¹.

⁻¹ en el queso de Lighvan. En cambio, Amran y Abbas (2011) manifestaron un incremento en sus resultados de 3.88 (0 días) y 13.4 (7 días) log₁₀ UFC g⁻¹.

La presencia de *S. aureus* evidencia la deficiencia en las condiciones higiénico-sanitaria del lugar donde se elaboran los quesos, asimismo a las malas prácticas de manipulación durante etapas esenciales como: el ordeño, recolección y transporte de la leche (Castro-Castillo *et al.*, 2013; González-Montiel & Franco-Fernández, 2015; Vásquez *et al.*, 2018).

S. aureus es considerado un microorganismo omnipresente. En el ser humano, la cavidad nasal, piel, garganta y tracto intestinal son los principales reservorios de este microorganismo. Mientras que en las vacas puede estar presente en la piel, y pueden provenir de una infección (mastitis) (González-Montiel & Franco-Fernández, 2015; Ortiz-Hernández *et al.*, 2016).

Un alimento es considerado como potencialmente peligroso cuando se confirma la presencia de su enterotoxina o bien si presenta una carga mayor 5 log₁₀ (Kirdar, Köse, Yurdakul, & Ocak, 2017; Ortiz-Hernández *et al.*, 2016).

De acuerdo con Ortiz-Hernández *et al.* (2016) existencia de *S. aureus* podría indicar una contaminación a partir de la piel, la boca o fosas nasales de los individuos encargados de la manipulación en las diferentes etapas del proceso, aunque existen otras fuentes de contaminación tales como: el material, equipo de trabajo o la leche, etc.

La resistencia de *S. aureus* en quesos se debe a que ciertas cepas de *Staphylococcus* son capaces de adaptarse, crecer y resistir ambientes hostiles bajo condiciones adversas, incluso producir agentes antimicrobianos en respuesta condiciones adversas (Cebrián, Sagarzazu, Pagán, Condón, & Mañas, 2010; Charlier, Cretenet, Even, & Le Loir, 2009). De mismo modo Ortiz-Hernández *et al.* (2016) indican que la resistencia de este microorganismo a través de los tiempos de maduración se encuentra asociado a una alta concentración de sal.

5.3.4 Determinación de bacterias ácido lácticas (BAL)

En *Figura 27* se puede observar que las BAL disminuyen con respecto a los días de maduración (6.73 a 3.19 log₁₀ UFC g⁻¹). Se observó diferencia estadística

($p \leq 0.05$), en las cuatro queserías referente al contenido de BAL a través de los días de maduración, siendo a los 90 días de maduración significativamente menor que a los 0 días de maduración (Figura 28).

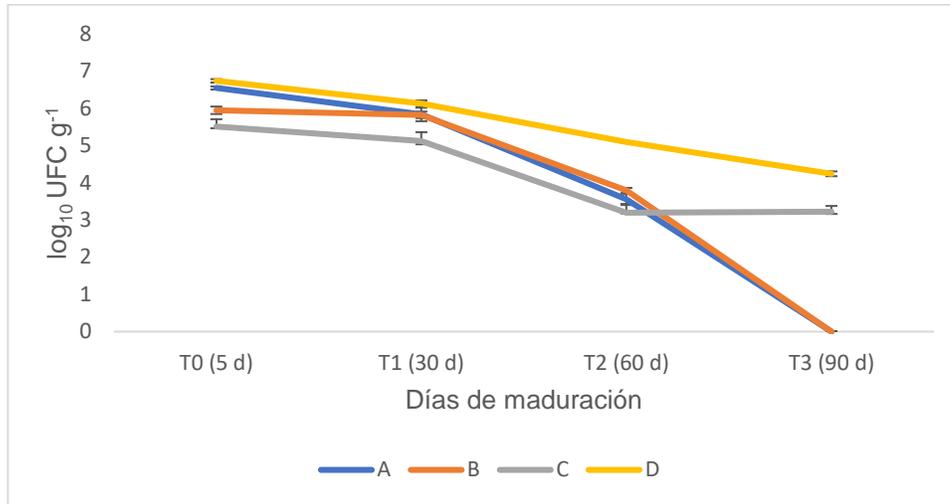


Figura 27. Recuento de bacterias ácido lácticas en queso de prensa de Guerrero durante el tiempo de maduración. Las barras indican el error estándar de los quesos recolectados en las cuatro queserías.

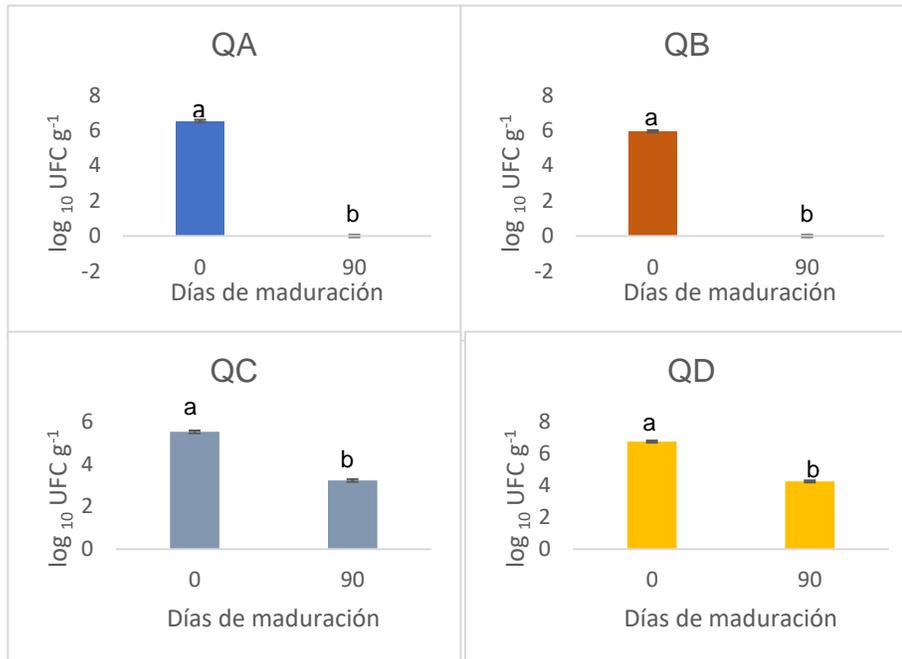


Figura 28. Bacterias ácido lácticas en queso de prensa, a los 0 y 90 días de maduración (T1 y T3) Las barra indican el error estándar de los quesos colectados en las cuatro queserías. Tratamientos seguidos con la misma letra indican que son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los encontrados en el queso poro estudiado por Alejo-Martínez *et al.* (2015) reportaron conteos 6.46 y 6.97 log₁₀ UFC g⁻¹ a los 3 y 12 días de almacenamiento. Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo son mayores a los presentados en el queso Cotija por Flores-Magallón *et al.* (2011) 2.6 log₁₀ UFC g⁻¹ en el primer mes de maduración, mientras que para el tercer mes incremento a 2.91 log₁₀ UFC g⁻¹. Por otra parte, en quesos artesanales estudiados en otros países se han obtenido los siguientes valores, en el queso blanco blando el conteo de BAL fue de 7.9 log₁₀ UFC g⁻¹, mientras que Panda *et al.* (2016) obtuvo valores 8.38 a 6.67 log₁₀ UFC g⁻¹ en queso Chhurpi (India).

Las BAL acidifican los productos lácteos y contribuyen en las características de textura, sabor y olor. De igual manera estos microorganismos producen ciertas sustancias antimicrobianas, las cuales pueden tener efectos contra microorganismos patógenos (Amran & Abbas, 2011; Flores-Magallón *et al.*, 2011; González-Montiel & Franco-Fernández, 2015; Mirzaei, 2011).

5.4 Conclusión

El queso de prensa del municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero mostró que los recuentos microbianos de los diferentes microorganismos analizados disminuyeron conforme avanzaron los días de maduración. A los 90 días de maduración, los quesos estudiados mostraron el menor recuento microbiano de coliformes, *Staphylococcus aureus*, bacteria mesófilas aerobias y ácido lácticas.

5.5 Bibliografía

- Alejo-Martínez, K., Ortiz-Hernández, M., Recino-Metelin, B. R., González-Cortés, N., & Jiménez-Vera, R. (2015). Tiempo de maduración y perfil microbiológico del queso de poro artesanal. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(5), 15–24. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1097/01.chi.0000205707.78818.a6>
- Amran, A. M., & Abbas, A. A. (2011). Microbiological Changes and Determination of Some Chemical Characteristics for Local Yemeni Cheese. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 4(2), 93–100.
- Castro-Castillo, G., Martínez-Castañeda, F. E., Martínez-Campos, Á. R., & Espinoza-Ortega, A. (2013). Characterization of the native microflora of traditional Oaxaca cheese in three phases of production. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, (33:105-109), 105–109.
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S., & Mañas, P. (2010). Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 140(1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.017>
- Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., & Le Loir, Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 131(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.032>
- Correa Morales, J. C., & Salazar Uribe, J. C. (2016). *Introducción a los modelos mixtos*.
- Flores-Magallón, R., Oliva-Hernández, A. A., & Narváez-Zapata, A. A. (2011). Characterization of microbial traits involved with the elaboration of the Cotija cheese. *Food Science and Biotechnology*, 20(4), 997–1003. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0137-z>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Guinee, T. P., McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of Cheese Science*. *Fundamentals of Cheese Science*. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_19
- González-Montiel, L., & Franco-Fernández, M. J. (2015). Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. *Brazilian Journal of Food Technology*, 18(3), 250–257. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.7514>
- Haddad, M., & Yamani, M. (2017). Microbiological Quality of Soft White Cheese Produced Traditionally in Jordan. *Journal of Food Processing & Technology*, 8(12), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000706>

- Kirdar, S. S., Köse, S., Yurdakul, O., & Ocak, E. (2017). A Survey on the Microbiological and Chemical Characteristics of Akçakatik Cheese in the West. *European International Journal of Science and Technology*, 6(7), 25–35. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/320448293_A_SURVEY_ON_THE_MICROBIOLOGICAL_AND_CHEMICAL_CHARACTERISTICS_OF_AKÇAKATIK_CHEESE_IN_THE_WEST_MEDITERRANEAN_REGION
- Mirzaei, H. (2011). Microbiological changes in Lighvan cheese throughout its manufacture and ripening. *African Journal of Microbiology Research*, 5(13), 1609–1614. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.111>
- Ortiz-Hernández, M., Jiménez-Vera, R., Ara-Chan, S. del C., González-Cortés, N., Alejo-Martínez, K., Perera-García, M. A., & Lozano-López, E. (2016). Calidad Sanitaria del Queso Crema Elaborado Artesanalmente en Tenosique, Tabasco. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(2), 1–11. <https://doi.org/2334-2501>
- Panda, A., Ghosh, K., Ray, M., Nandi, S. K., Parua (Mondal), S., Bera, D., ... Mondal, K. C. (2016). Ethnic preparation and quality assessment of Chhurpi, a home-made cheese of Ladakh, India. *Journal of Ethnic Foods*, 3(4), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.jef.2016.12.004>
- Ramírez-López, C., & Vélez-Ruiz, J. F. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 131–148.
- Ramírez-Rivera, E. de J., Ramón-Canul, L. G., Torres-Hernández, G., Herrera-Corredor, J. A., Juárez-Barrientos, J. M., Rodríguez-Miranda, J., ... Díaz-Rivera, P. (2018). Tipificación de quesos madurados de cabra producidos en la zona montañosa central del estado de Veracruz, México. *Agrociencia*, 52(1), 15–34.
- Sainz, R. C., & Montero, G. (2004). Caso Práctico De Modelización Del Crecimiento Y Producción De Las Masas Forestales, 321, 317–321.
- Sánchez-Gamboa, C., Hicks-Pérez, L., Gutiérrez-Méndez, N., Heredia, N., García, S., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2018). Microbiological changes during ripening of Chihuahua cheese manufactured with raw milk and its seasonal variations. *Foods*, 7(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods7090153>
- Sánchez-Valdés, J. J., Colín-Navarro, V., López-González, F., Avilés-Nova, F., Castelán-Ortega, O. A., & Estrada-Flores, J. G. (2016). Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan, Estado de México. *Salud Publica de Mexico*, 58(4), 461–467. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i4.8027>

- Sandoval-Alarcón, F. (2016). *Caracterización y análisis de la productiva del queso de prensa de la Costa Chica de Guerrero y Oaxaca*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Torres-Llanaez, M. J., Vallejo-Cordoba, B., Díaz-Cinco, M. E., Mazorra-Manzano, M. A., & González-Córdova, A. F. (2006). Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control*, 17(9), 683–690. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.04.004>
- Vasek, O., Cardozo, M., & Fusco, A. J. (2008). Producción artesanal de quesos. Sistema de transformación agroalimentario en la región Correntina (Argentina), (September), 1–32.
- Vásquez, V. A., Gerardo, J. G., Jiménez, L. A., & Abanto, L. M. (2018). Evaluación De La Calidad Bacteriológica De Quesos Frescos En Cajamarca Evaluation of the Bacteriological Quality of Fresh Cheeses From Cajamarca. *Ecología Aplicada*, 17(1), 45–51. <https://doi.org/10.21704/rea.v17i1.1172>
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology. A Companion to the Gilded Age and Progressive Era*. <https://doi.org/10.1002/9781118913994.ch19>