

Métodos ómicos y caracterización de metabolitos microbianos en quesos

*Manzaneda Suarez Marco Antonio, Martínez Rey Liban,
Gutiérrez Castañeda Clara Gilma¹*

RESUMEN:

El queso es un alimento de amplio consumo, existen muchos tipos de queso según tipo de elaboración y tiempo de maduración. Las comunidades microbianas en los quesos juegan un papel importante en su calidad, aceptabilidad y propiedades nutricionales, en especial por los metabolitos que estas producen. Estudios del proteoma del queso han permitido identificar nuevos metabolitos relacionados con el sabor y la calidad nutricional del queso, enzimas provenientes de procesos de división celular y procesos de reparación de material genético. Los hallazgos sugieren la importancia de implementar técnicas para analizar diferentes tipos de queso con el objetivo de comprender el proteoma y microbioma que los caracterizan, una herramienta para la identificación y rediseño de productos con nuevo valor agregado.

Palabras clave: Quesos, Ciencias ómicas, Bacterias ácido lácticas, Metabolitos.

¹ Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Libre Barranquilla, Grupo Gestión Ecológica y Agroindustrial (GEA), marcoa-manzanedas@unilibre.edu.co

Omic methods and characterization of microbial metabolites in a product of dairy origin: cheese

ABSTRACT:

Cheese is a widely consumed food worldwide, there are many types of cheese in the world, adapted to the type of milk, and ingredients to which they have access in each part where it is consumed. This can be classified as ripe, semi-ripe or fresh; The flavor of cheese is conditioned by many factors, such as microbial communities and how they metabolize biomolecules and the metabolites they produce. Currently, thanks to the evolution of new techniques and forms of omic studies, new metabolites have been identified, which help us understand the complexity of cheese flavor, enzymes from cell division processes and genetic material repair processes, were found in the cheese proteome. All these discoveries of new metabolites continue to influence the flavor and nutritional quality of cheese, this indicates why it is necessary to implement techniques to analyze the different types of cheese in order to better understand the proteome and microbiome that comprise them.

Keywords: Cheeses, Omics Sciences, Lactic acid bacteria, Metabolites

INTRODUCCIÓN

El queso es un alimento muy consumido en todo el mundo, y sus propiedades nutricionales, funcionales, estructurales y sensoriales varían de un tipo a otro y se ven afectadas por la calidad de la materia prima, los métodos de añejamiento y cultivos iniciadores utilizados en su elaboración¹; por grado de madurez, los quesos se clasifican en frescos, semi-maduros y maduros².

Se estima que existen 2.000 variedades entre quesos maduros, semicurados y frescos. Sin embargo, los quesos frescos son de mayor consumo en Colombia y forman parte de platos distintivos con gran legado culinario. La producción de queso fresco artesanal es una de las principales formas de ingresos y tradición para ganaderos en muchos países de América Latina². Entre las variedades de quesos que se producen en Colombia se encuentran los quesos: costeño salado, caqueteño, biche, campesino, amasado, quesillo, queso en hoja de bijao y el queso paipa. Un gran número de proteínas y metabolitos de origen microbiano se han involucrado con propiedades organolépticas y nutricionales en quesos, González y Colaboradores, 2015, identificaron polisacáridos producidos por una cepa de *Streptococcus thermophilus* que permite un aumento en la retención de humedad y lípidos en el queso³. Por otro lado, bacterias lácticas se han relacionado con la producción de péptidos activos y moléculas de interés para la salud humana¹.

El estudio de los metabolitos, su expresión y la caracterización de cepas

microbianas ha sido abordado por las ciencias ómicas, que se utilizan cada vez más en la evaluación de alimentos frescos y procesados, la mejora y desarrollo de nuevos productos en biotecnología alimentaria^{3,4}. Esta revisión tiene como objetivo desarrollar una base de datos de metabolitos microbianos presentes en el queso que influyen en las propiedades sensoriales y funcionales del queso con el fin de identificar posibles estrategias de valor agregado para estos productos.

METODOLOGÍA

La presente investigación es de tipo documental sobre métodos ómicos aplicados en el estudio de metabolitos en quesos relacionados con bacterias lácticas. La búsqueda de los artículos comprendió la construcción de una ecuación que relacionara el objeto de estudio, la ecuación se presentó de la siguiente manera: (ALL (bacteria AND lactic AND acid) AND ALL (omic AND science) OR ALL (fresh AND cheese) AND ALL (ripened AND cheese)) AND PUBYEAR > 2012 en la base de datos SCOPUS.

Construcción de base de datos y Clasificación de artículos

Los artículos recuperados de la base de datos SCOPUS que cumplieron con los criterios de inclusión (ciencias ómicas, bacterias lácticas, metabolitos) publicados a partir del año 2012 fueron trasladados a una matriz de Excel permitiendo la importación de indicadores bibliométricos e identificación de cada fuente (título, autor, idioma, año, Doi); por otro lado, los artículos recuperados en texto

completo de las bases de datos, Open Journals Acces y Science Direct fueron digitados manualmente en la matriz de Excel conservando los indicadores bibliométricos. La clasificación de la información fue realizada a través de la generación de columnas como respuesta a las variables de la investigación: tipo de queso (según su grado de maduración), tipo de bacteria láctica, ciencia ómica aplicada en la investigación y metabolito relacionado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al poner en práctica la ecuación de búsqueda en las diferentes plataformas de investigación científica (Scopus, SciELO, MENDELEY, Open Journal Access) se hallaron un total de 125

artículos que guardaban relación con el objeto de estudio, luego de realizada la lectura detallada de los artículos fueron tomados para el análisis 30 artículos basados en los criterios de inclusión como metabolitos microbianos, ciencia ómica especificada y microorganismos involucrados.

En la búsqueda realizada se encontraron artículos de las siguientes ciencias ómicas: metagenómica, proteómica, metabolómica y transcriptómica se observaron trabajos con uso de un enfoque de sistemas para el tema de estudio, con trabajos que aplican entre dos y tres ciencias ómicas en el abordaje de la investigación. La disciplina ómica más hallada fue la proteómica con un 33% de los artículos (n= 30) (Figura 1).

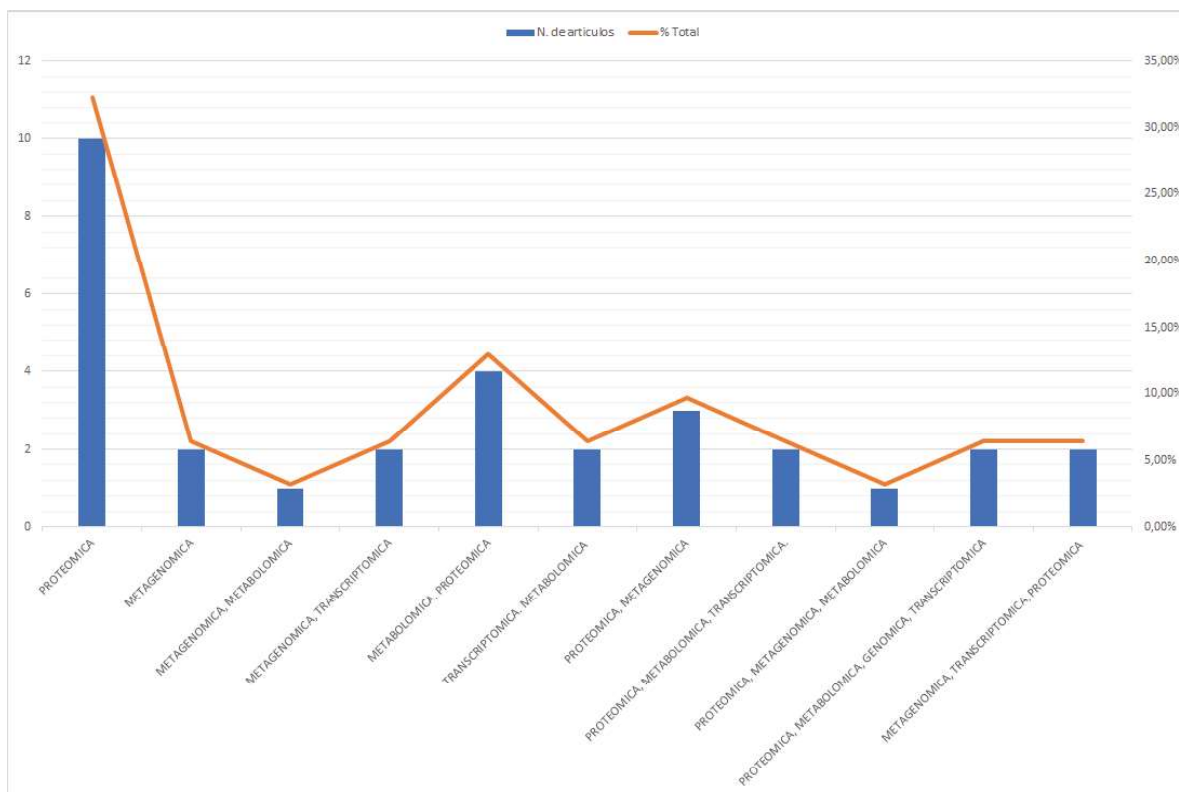


Figura 1. Clasificación de artículos hallados según ciencia ómicas

El estudio de una muestra o producto de interés exige de técnicas que permitan alta capacidad de separación, alta sensibilidad e identificación y cuantificar los cambios en la magnitud de la expresión, la proteómica a través de dos grandes herramientas permite abordar estos desafíos técnicos. Estas técnicas se agrupan en dos grandes campos: las que se basan en la resolución de proteínas intactas y que utilizan principalmente técnicas de electroforesis o de cromatografía de proteínas y las que se basan en la conversión, en una primera etapa, de las mezclas de proteínas en mezclas complejas de sus péptidos de degradación proteolítica. En el primer grupo están las técnicas que utilizan la electroforesis bidimensional atendiendo a una primera separación por carga eléctrica y una segunda separación por talla. También comprende la combinación de dos o tres métodos ortogonales de cromatografía o isoelectroenfoque en solución seguido de cromatografía⁵.

Entre las técnicas más relacionadas en los estudios de metabolómica se relaciona la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases o líquidos, que permite detectar e identificar metabolitos polares y no polares (una molécula es polar cuando uno de sus extremos está cargado positivamente, y el otro de manera negativa. Cuando una molécula es polar, estas cargas no existen), azúcares, líquidos volátiles, metabolitos de gran tamaño y aminoácidos⁶. La ventaja de esta técnica es que es

posible recuperar la muestra después de su análisis para estudiarla por otros métodos. La gran desventaja es que se requiere de una cantidad mayor de muestra y la sensibilidad del método es relativamente baja, lo que significa que se detectarán los metabolitos de mayor concentración⁵.

Los artículos sobre proteómica fueron los de mayor frecuencia hallados en el estudio (Figura 1), posiblemente debido al contenido proteico del queso, también sobresalieron artículos con estudios mixtos entre metabolómica y proteómica, una buena combinación para encontrar proteínas y enzimas con potenciales nuevas funciones.

Kandasamy y colaboradores 2020, proponen un posible control al sabor del queso, mediante la medición de los metabolitos presentes en el proceso de preparación y maduración de diferentes tipos de queso fabricados en Korea del Sur como el Gouda, Appenzeller, Cammenbert, Reblochon, Brown y Frill de los cuales interpretaron que dependiendo del metabolito, el sabor del queso podía ser como lo describieron las personas que lo degustaron, “más delicioso y más bonito visualmente”⁷, estos metabolitos derivados de proteínas por acción de proteasas, generan péptidos de diferentes longitudes que modificaban el sabor del queso; entre los compuestos identificados se hallaron la colina, creatina, glicina, serina, tirosina, todos identificados en quesos Gouda y Cammenber, los cuales también fueron

lo que mostraron más aceptación en los análisis de evaluación sensorial.

También se encontraron metabolitos provenientes de metabolismo de carbohidratos⁷, como piruvato, glucosa, galactosa y lactato, los análisis sensoriales muestran que la aceptación del producto es directamente proporcional al tipo de metabolito, por ejemplo, en queso Gouda y Brown, la preferencia estuvo dada por la concentración de lactato y piruvato, producto de metabolismo microbiano¹².

Otras investigaciones tienden al control del sabor a través de la incorporación de péptidos sintéticos para obtener el sabor deseado⁸, cadenas con diferentes pesos moleculares como AIPPKKNQ-DKTEIPTIN, ERYLGYLEQ, TQTP-VVVPPFL, entre otros, se demostró en el queso Appenzeller que entre más larga era la cadena de aminoácidos, más podían acidificar el queso y afectar su sabor⁸, estos análisis han sido posible gracias a la aplicación espectrometría de masas, que permite realizar el mapeo integral del peptidoma del queso mediante la adquisición independiente de datos (DIA), utilizando la adquisición de ventana secuencial de toda la espectrometría de masa iónica de fragmentos teóricos (SWATH-MS) y un enfoque “in silico” dirigido basado en el triple cuadrupolo asistido (QQQ).

Otros péptidos de interés son los péptidos inhibidores de Angiotensina⁹. Su capacidad para capturar radicales

libres¹⁰, además, el efecto de las proteasas que crean péptidos de cadenas cortas que muestran una alta capacidad antioxidante y sino también una alta capacidad para quelar Cu¹⁰.

La actividad antibacteriana de los péptidos de suero ha sido estudiada por varios autores, por ejemplo,¹¹ demostró que los péptidos de suero de cabra tenían actividad bactericida contra bacterias Gram positivas como Gram negativas, el péptido SEC-F3 mostró una mayor eficacia contra *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* con concentraciones de 0,09 y 0,03 mg/mL, mientras que los metabolitos SEC-F3 y SEC-F2 tuvieron valores comparables contra *Staphylococcus aureus* a una concentración de 0,11 mg/mL.

A través de las ómicas, se ha estudiado la influencia de los metabolitos del queso en el comportamiento y estado de ánimo de las personas, ya que se han reportado metabolitos en el queso como GABA, glutamato y una variedad de péptidos con gran capacidad para convertirse en neurotransmisores como la serotonina y la dopamina¹².

Otros autores no brindan una lista de metabolitos microbianos¹³, y que microorganismos producen estos metabolitos, como cadenas de diferentes tamaños derivadas de proteínas como la caseína, lactoglobulina y lactoferrina, también derivados de metabolismo de carbohidratos y algunos alcoholes como etanol, hexanol y algunos alcoholes

secundarios no definidos. Gagnaire et al, fue más halla con el objetivo de reportar otros metabolitos¹⁴, y la liberación de numerosas proteínas, incluidos varios tipos de enzimas en el queso cuando las células se lisan. Se identificaron cinco grupos funcionales de proteínas involucradas en: (i) proteólisis, (ii) glucólisis, (iii) respuesta al estrés, (iv) reparación de ADN y ARN y (v) oxido reducción. existía diversidad de una misma proteína, proveniente de diferentes especies microbianas, lo que revela una gran complejidad en la casuística del sabor del queso, es decir múltiples enzimas y péptidos influyen en esta propiedad sensorial.

Por medio de ómicas, se evaluó en otro estudio, la producción de queso fresco con un agregado de suero de leche, aumentando su contenido proteico, el este propuso un reuso del lactosuero y solución a un correcto manejo de este residuo¹⁵, al final se obtuvo un queso fresco con mayor valor biológico gracias a su elevado contenido proteico de gran calidad.

Se evaluó también como influye el material donde es realizado el queso, ya sea fresco o madurado, y su microbiota, los resultados demostraron que la microbiota se controlaba cuando el recipiente es de plástico o de aluminio, encontrando como microorganismos dominantes bacterias del género, *Lactococcus*, seguido de miembros

de la familia *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas*¹⁶.

Se encontraron diversos metabolitos microbianos, (Tabla 1), provenientes principalmente de productos del metabolismo y degradación de proteínas (residuos proteicos de caseína, DNA polimerasa, ARN polimerasa, GABA, aminoácidos), grasas (triacilglicerol y exopolisacárido) y carbohidratos (azúcares simples como glucosa, lactosa y galactosa (Se encontraron metabolitos muy interesantes, como residuos de enzimas involucradas en procesos de división celular, como ADN polimerasas, Topoisomerasas, entre otros y también de reparación de ARN¹⁴, demostrando que el sabor del queso va mucho más allá de solo metabolitos comunes como lo son los residuos de la caseína¹⁴

Estos productos se elaboran a partir de leche pasteurizada y se complementan con renina que favorece la coagulación de la leche debido a la inestabilidad de las micelas de caseína. Así forma una fase acuosa que se elimina de la fase sólida o cuajo rica en metabolitos ¹⁷. La textura del queso está determinada por la disposición espacial de sus componentes, especialmente la caseína, que sufre cambios de proceso con una textura dura, elástica, porosa y exhibe propiedades elásticas¹⁸. El consumidor espera recibir quesos frescos con propiedades uniformes donde quiera que se produzcan; además de garantizar

los estándares de calidad, composición y fiabilidad del queso^{19,20}.

Algunos microorganismos utilizados como bacterias del ácido láctico pueden, además de metabolizar la lactosa, producir y liberar otros compuestos en el queso^{21,22}. Si bien la composición inicial de la leche determina las características de su textura, otros aspectos como la técnica aplicada, la adición de fermentación láctica y las condiciones de maduración tendrán una mayor influencia, por lo que determinarán la identidad y aceptabilidad del queso ^{23,24,25}.

CONCLUSIÓN

Las ciencias ómicas, en especial la proteómica y metabolómica permiten la evaluación de la calidad del queso, rastrear su origen y evitar posibles errores a la hora de hacer una investigación para el estudio y el mejoramiento del producto. La mayoría de las técnicas mencionadas para analizar las propiedades del queso fresco han sido estandarizadas y ampliamente aceptadas por la comunidad científica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. C. Ramírez-López*, J. F. V.-R. (2014). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos De Ingenieria De Alimentos*, 2(June 2020), 18. <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Ramirez-Lopez-et-al-2012.pdf>
2. FAO & OMS. (2013). Norma General Del Codex para el queso. CODEX Alimentarius.
3. González Montiel Lucio; Franco Fernández Melitón. (2015). Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña Microbiological profile of aro cheese consumed in Oaxaca, Mexico *Autor de correspondencia | Corresponding Autores | Authors. *Revista Brazilian Food Technology*. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.7514>
4. Silva, Roberto A. et al. 2016. "Proteomic and Peptidomic Profiling of Brazilian Artisanal 'Coalho' Cheese." *Journal of the science of food and agriculture* 96(13): 4337–44.
5. Quiroga, C. (2016). M I C R O B I O L O G Í A Las tecnologías «ómicas»: situación actual y desafíos futuros Omic technologies: Current situation and future challenges. *Revista Argentina de Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.12.001>
6. Rocha, A., Salgado, M., & López, Y. (2018). Metabolómica En El Diagnóstico Clínico. 22–27.
7. Kandasamy, S., Yoo, J., Yun, J., Kang, H. B., Seol, K., & Ham, J. (2020). Saudi Journal of Biological Sciences Original article H HRMAS-NMR based metabolic fingerprints for discrimination of cheeses based on sensory qualities. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(6), 1446–1461. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.043>
8. Sebald, K., Dunkel, A., & Hofmann, T. (2019). Mapping Taste-Relevant Food Peptidomes by Means of Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment Ion – Mass Spectrometry. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04581>
9. Tarango-Hernández, S., Alarcón-Rojo, A. D., Robles-Sánchez, M., Gutiérrez-Méndez, N., & Rodríguez-Figueroa, J. C. (2015). Short communication: Potential of

Fresco-style cheese whey as a source of protein fractions with antioxidant and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7635–7639. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9388>

10. Martín-del-Campo, S. T., Martínez-Basilio, P. C., Sepúlveda-Álvarez, J. C., Gutiérrez-Melchor, S. E., Galindo-Peña, K. D., Lara-Domínguez, A. K., & Cardador-Martínez, A. (2019). Production of antioxidant and ACEI peptides from cheese whey discarded from Mexican white cheese production. *Antioxidants*, 8(6), 1–10. <https://doi.org/10.3390/antiox8060158>
11. Osman, A.; Goda, H.A.; Abdel-Hamid, M.; Badran, S.M.; Otte, J. Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. *LWT-Food Sci. Technol.* 2016, 65, 480–486.
12. Saidi, V., Sheikh, M., Kobarfard, F., & Soleimanian, S. (2020). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Profiling of bioactive metabolites during the ripening of a semi - hard non - starter culture cheese to detect function Saidi, V., Sheikh, M., Kobarfard, F., & Soleimanian, S. (2020). Biocatalysis and Agricultural B. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 28(July), 101734. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101734>
13. Afshari, R., Pillidge, C. J., Read, E., Rochfort, S., Dias, D. A., Osborn, A. M., & Gill, H. (2020). New insights into cheddar cheese microbiota-metabolome relationships revealed by integrative analysis of multi-omics data. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59617-9>
14. Gagnaire, V., Piot, M., Camier, B., Vissers, J. P. C., Jan, G., & Léonil, J. (2004). Survey of bacterial proteins released in cheese: A proteomic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 94(2), 185–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.010>
15. Rosero B., R., Arango Bedoya, O., Mejía España, D., & Osorio Mora, O. (2016). Aumento del rendimiento en queso fresco campesino mediante incorporación de proteínas séricas húmedas. *Vitae*.
16. Spyrelli, E. D., Stamatiou, A., Tassou, C. C., Nychas, G. J. E., & Doulgeraki, A. I. (2020). Microbiological and metagenomic analysis to assess the effect of container material on the microbiota of Feta cheese during ripening. *Fermentation*, 6(1), 2–8. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010012>

17. Chromik, C., Partschefeld, C., Jaros, D., Henle, T. and Rohm, H. Adjustment of vat milk treatment to optimize whey protein transfer into semi-hard cheese: a case study. *Journal of Food Engineering*, 100(3), 2010, p. 496-503
18. Bunka, F., Pachlová, V., Lpernická, L., Iva Buresová, I., Krácmar, S. and Losák, T. The dependence of Peleg's coefficients on selected conditions of a relaxation test in model samples of edam cheese. *Journal of Texture Studies*, 44, 2013, p. 187-195
19. Hickey, C.D., Auty, M.A.E., Wilkinson, M.G. and Sheehan, J.J. The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localization and their interactions during ripening: a review. *Trends Food Science Technology*, 41(2), 2015, p. 135-148.
20. Magenis, R.B., Prudêncio, E.S., Fritzenfreire, C.B., Stephan, M.P., Silvio Do Egito, A. and Daguer, H. Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. *Food Control*, 45, 2014, p. 22-28
21. Jiménez-Guzmán, J., Flores-Nájera, A., Cruz-Guerrero, A.E. y García-Garibay, M. 2009. Use of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Mexican Panela cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie-Food Science and Technology*. 42:1508-1512.
22. Guo, L., Van Hekken, D.L., Tomasula, P.M., Tunick, M.H. y Huo, G. 2012. Effect of salt on microbiology and proteolysis of Queso Fresco cheese during storage. *Milchwissenschaft*. 67:74–77.
23. Evert-Arriagada, K., Hernández-Herrero, M.M., Juan, B., Guamis, B. y Trujillo, A.J. 2012. Effect of high pressure on fresh cheese shelf-life. *Journal of Food Engineering*. 110 (2): 248–253.
24. Morales-Celaya, M.F., Lobato-Calleros, C., AlvarezRamirez, J., Vernon-Cardé, E.J. 2012. Effect of milk pasteurization and acidification method on the chemical composition and microstructure of a Mexican pasta filata cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie-Food Science and Technology*. 45(2): 132-141.
25. Johnson, M. y Law, B.A. 2011. The fundamentals of cheese technology. En: Law B.A. y Tamime A.Y. (Eds). *Technology of cheesemaking*. Segunda edición. Wiley Blackwell, Reino Unido.