

INTRODUCCIÓN



1- Alimentos funcionales

En los últimos años se ha verificado un incremento en el interés de los consumidores por la calidad de los alimentos que ingieren, debido probablemente al avance del conocimiento junto con un mayor acceso a la información de la que se dispone. La calidad de un alimento puede ser descripta como los requerimientos necesarios para satisfacer las necesidades y las expectativas del consumidor (Peri, 2006). La calidad final de un producto es una suma de atributos, clasificados como intrínsecos y extrínsecos. Los determinantes intrínsecos de calidad son factores que pueden ser medidos y de este modo son verificables, e incluyen diferentes aspectos del alimento, como sabor y aroma, vida útil, textura, aporte nutricional, seguridad, autenticidad y genuinidad, entre otros. Por el contrario, los determinantes extrínsecos se refieren al proceso de obtención y producción del producto, como el uso de pesticidas y organismos genéticamente modificados, y el tipo de material de empaque, el uso de tecnologías específicas, entre otros (Linnemann y col., 2006).

Los aportes nutricionales de los alimentos constituyen un atributo de calidad intrínseco muy importante, ya que el primer objetivo del comer es satisfacer las necesidades de nutrición de cada persona (Peri, 2006). Recientemente, el interés de los consumidores se ha extendido, además, a la búsqueda de beneficios extra sobre la salud, más allá del básico aporte nutricional de cada alimento. Precisamente estas características son las que definen a los denominados alimentos funcionales, que son aquellos productos que además de su aporte nutricional generan un beneficio en el consumidor, ya sea promoviendo el bienestar y la salud o disminuyendo el riesgo de una enfermedad (Roberfroid, 1999, Spence, 2006).

Una explicación de estos últimos cambios en las exigencias de los consumidores se puede encontrar en la evolución que ha experimentado el concepto de nutrición. En los últimos años, este concepto ha cambiado desde la prevención de deficiencias alimentarias y el establecimiento de una dieta balanceada a un significado más amplio de promoción del bienestar y la salud del individuo. También se ha incorporado como objetivo nutricional la disminución del riesgo de enfermedad, y se ha desarrollado el concepto de nutrición óptima. De este modo, el concepto de dieta, nutrición y salud se encuentran profundamente relacionados (Sanders, 1998, Roberfroid, 2000, Stanton y col., 2001).

Más allá de las exigencias de los consumidores, otra fuerza importante en la expansión de estos productos son, sin duda, las industrias, que se encuentran interesadas en el desarrollo de productos con mayor valor agregado y que además, tienen una gran

aceptación y demanda por parte de los consumidores (Daly y col., 1998, Stanton y col., 2001).

El mercado de los alimentos funcionales se encuentra desde hace algunos años en rápido crecimiento, sobre todo en Europa, Japón, y en menor medida en Estados Unidos (Stanton y col., 2001, Playne y col., 2003). Durante la expansión de este mercado se han generado una gran cantidad y variedad de estos productos, teniendo una gran aceptación entre los consumidores europeos y japoneses, mientras que la diversidad y la penetración en el mercado es menor en Estados Unidos (Sanders y Huis in't Veld, 1999). La mayoría de los alimentos funcionales pueden ser clasificados en cuatro categorías: productos fortificados, enriquecidos, modificados y mejorados (Tabla 1).

Tabla 1. Diferentes tipos de alimentos funcionales (Spence, 2006).

Alimento funcional	Descripción	Ejemplo
Productos fortificados	Incremento de un nutriente naturalmente presente.	Jugo de fruta fortificado con vitamina C, granos fortificados con ácido fólico.
Productos enriquecidos	Agregado de nuevos nutrientes o componentes habitualmente no presentes.	Jugo de naranja con calcio, margarina con fitoesteroles, alimentos probióticos y prebióticos.
Productos modificados	Reemplazo de componentes existentes por otros benéficos.	Productos bajos en grasa con el agregado de sustitutos de la misma.
Productos mejorados	Cambios en los productos naturales que modifican la composición de nutrientes.	Desarrollo de frutas y vegetales con mayor contenido de vitaminas, tomates con mayor producción de licopeno.

Como puede observarse en la tabla, los alimentos probióticos son un tipo de alimento funcional. Los mismos constituyen una de las áreas más importantes y de mayor desarrollo dentro del ámbito de los alimentos funcionales. Por ejemplo, en Europa, los productos probióticos y prebióticos abarcan el 60% del mercado de los alimentos funcionales (Stanton y col., 2001, Playne y col., 2003).

2- Probióticos

2.1- Evolución de la definición

El término “probiótico” deriva del griego y significa “a favor de la vida”. Si bien desde los años `60 han surgido varias nuevas definiciones de esta palabra, su origen se remonta a principios del siglo XX (Salminen y Ouwehand, 2003, Stanton y col., 2003). Eli Metchnikoff, científico ruso que fue galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur, fue uno de los primeros en hablar del rol positivo que podían ejercer algunas bacterias lácticas en la salud del ser humano. En su libro *The Prolongation of Life*, en 1907, sugirió que, debido a la dependencia que existe entre la flora intestinal y los alimentos, existía la posibilidad de modificar la flora de nuestro organismo reemplazando microorganismos patógenos por beneficiosos (Leahy y col., 2005). Paralelamente, Henry Tissier, pediatra francés, sugirió la posibilidad de administrar bifidobacterias a niños con diarreas para el restablecimiento de una microbiota intestinal saludable, ya que las mismas constituían la microbiota predominante en niños sanos alimentados con leche materna y se veían disminuidas en niños con diarrea (Stanton y col., 2003).

Desde su nacimiento, el término probiótico ha tenido diferentes acepciones. En primer lugar, fue usado por Lilly y Stillwell en 1965, para describir a las sustancias producidas por microorganismos que estimulan el crecimiento de otros microorganismos (Leahy y col., 2005). En 1974, Parker denominó probióticos a aquellos organismos o sustancias que tienen efecto benéfico sobre la microbiota intestinal de animales (Havenaar y Huis in't Veld, 1992, Leahy y col., 2005). Luego, Fuller (1989), destacó el carácter microbiano de los probióticos, definiéndolos como un suplemento dietético a base de microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al huésped mejorando su equilibrio intestinal. Havenaar y Huis in't Veld (1992) ampliaron la definición, estableciendo nuevos criterios, por ejemplo: que los probióticos pueden ser destinados al consumo humano o animal, que sus efectos en la microbiota autóctona no se limitan al tracto gastrointestinal, sino que también impactan en el tracto respiratorio, el tracto urogenital, etc., y que pueden consistir de un monocultivo o de un cultivo mixto. En 1995, los científicos participantes de una reunión sobre probióticos, desarrollada en Frankfurt, Alemania, adoptaron la siguiente definición de probióticos: “microorganismos vivos que ejercen beneficios en la salud más allá de la nutrición básica, luego de una ingesta adecuada” (Guarner y Schaafsma, 1998). Posteriormente, en 1999, Naidu y sus colaboradores definieron a los probióticos como adyuvantes dietarios microbianos que afectan beneficiosamente al huésped, modulando la inmunidad sistémica y de la mucosa, así como también mejorando el balance microbiano y

nutricional en el tracto gastrointestinal (Sanders, 2006). En el mismo año, surgió otra definición en la que se incluyen como probióticos tanto células microbianas viables, como microorganismos inactivos o componentes celulares microbianos, disminuyendo la importancia dada en las otras definiciones a la viabilidad microbiana (Lee y col, 1999, Salminen y col., 1999). En 2001, Schrezenmeir y Vrese definieron el término probiótico como un producto o una preparación conteniendo suficiente número de microorganismos viables bien definidos, que altera la microflora (por implantación o colonización) en un compartimiento del huésped, ejerciendo de este modo un efecto benéfico (Schrezenmeir y Vrese, 2001). Finalmente, también en el mismo año, una consulta de expertos de FAO/OMS sobre la evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, adoptaron la siguiente definición de probióticos: “microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables” (FAO/OMS, 2001). En esta definición, la cual constituye actualmente una de las más aceptadas, se reconocen las siguientes características de los probióticos (Sanders, 2006):

- Los probióticos deben estar vivos.
- Los probióticos deben ejercer un beneficio fisiológico que pueda ser medido por estudios adecuados realizados en el huésped.
- Los probióticos no son exclusivamente incorporados en alimentos o ingeridos por vía bucal. Otras formas de incorporación en el organismo son posibles, como preparaciones farmacéuticas o agentes tópicos.
- El mecanismo de acción de los probióticos no está limitado al mejoramiento del equilibrio microbiano intestinal, sino que existe un amplio espectro de efectos benéficos en el huésped.

Como puede observarse, el concepto de probiótico ha cambiado con los años y aún no existe consenso entre los especialistas sobre una única definición. Seguramente, seguirán apareciendo nuevas definiciones de acuerdo a los hallazgos científicos y a las opiniones de los expertos en el tema. En la actualidad, uno de los puntos más discutidos es la consideración o no de microorganismos muertos o fragmentos de células microbianas como probióticos (Ziemer y Gibson, 1998, Ouwehand y col., 2002). A pesar de que actualmente se reconocen ciertos efectos positivos de distintos componentes celulares en el huésped, la mayoría de las definiciones mencionan la viabilidad de los microorganismos como requisito primordial para definir un probiótico. Con respecto a esto, se ha sugerido

que estos componentes celulares benéficos sean denominados con un término distinto a probiótico (Sanders, 2006).

Dentro del ámbito de los alimentos funcionales podemos nombrar otras dos entidades, que se encuentran bastante relacionadas con los probióticos: los prebióticos y simbióticos. Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles, en general oligosacáridos, que afectan beneficiosamente al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un limitado número de especies bacterianas normalmente presentes en el colon, tales como aquellas pertenecientes a los géneros de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, que son consideradas como beneficiosas para la salud del huésped (FAO/OMS, 2001, Holzapfel y Schillinger, 2002, Playne y col., 2003). Los alimentos en los cuales se combinan ingredientes prebióticos y bacterias probióticas son denominados simbióticos. De esta manera, el consumo de un alimento simbiótico produce un beneficio en la salud porque mejora el crecimiento de las bacterias probióticas en el intestino por la presencia del prebiótico, aumentando las posibilidades de la implantación de las mismas (Ziemer y Gibson, 1998, Holzapfel y Schillinger, 2002).

2.2- El tracto gastrointestinal y la microbiota autóctona

El desarrollo de probióticos para uso humano fue impulsado principalmente por tres descubrimientos que sugirieron la presencia de microorganismos protectores en el tracto gastrointestinal (TGI). Aquellos hallazgos fueron los siguientes: i) los animales libres de gérmenes eran más susceptibles a las infecciones que los animales convencionales, ii) los antibióticos orales incrementaban la susceptibilidad a infecciones en animales, sugiriendo que la microbiota autóctona ejercía una resistencia a la colonización, y iii) la administración de enemas fecales podría controlar la diarrea asociada a antibióticos, causada normalmente por *Clostridium difficile* (Gibson y col., 2003). De esta manera, los científicos expertos en probióticos reconocieron la importancia fundamental de un profundo conocimiento de la composición y funcionamiento de la microbiota intestinal, para lograr un mejor entendimiento de los potenciales efectos beneficiosos de los probióticos en la salud humana y un avance satisfactorio del estado del arte (Sanders, 2000).

En el TGI existe una muy compleja y variada población microbiana, que varía a lo largo del mismo en número y especies presentes. La colonización del TGI comienza con el nacimiento y continúa durante toda la vida (Salminen y Ouwehand, 2003). La composición de la biota es específica de cada persona y determinada por factores genéticos y

ambientales (Gueimonde y Salminen, 2004, Isolauri y col., 2004). La cantidad de microorganismos en la parte superior del TGI es relativamente escasa, debido a una velocidad de tránsito elevada, que disminuye el tiempo de permanencia de las bacterias, y a una alta concentración de secreciones del estómago, hígado y páncreas, con actividad antimicrobiana. De este modo, el estómago y la primera parte del intestino delgado (duodeno y yeyuno) tienen una concentración microbiana entre $10^3 - 10^4$ UFC g^{-1} de contenido, siendo los géneros predominantes *Lactobacillus* y *Bacteroides*. Por otro lado, en la parte inferior del TGI existe una muy alta población microbiana, debida a un tránsito más lento y a una menor concentración de sustancias inhibitoras. En la última porción del intestino delgado (íleon) la población microbiana alcanza una concentración aproximada de $10^7 - 10^8$ UFC g^{-1} de contenido, mientras que en el colon se encuentra la máxima concentración microbiana de alrededor de $10^{10} - 10^{11}$ UFC g^{-1} . Los géneros microbianos predominantes en el colon son *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium* y *Ruminococcus*, entre otros (Holzapfel y Schillinger, 2002, Saarela y col., 2002, Gueimonde y Salminen, 2004, Isolauri y col., 2004). Es de destacar que existen alrededor de 400 especies de bacterias presentes en el TGI humano, las cuales alcanzan un número de 10^{14} bacterias, siendo esta cantidad 10 veces mayor que el total de células eucariotas presentes en el cuerpo humano. Esta cuantiosa población microbiana constituye un gran potencial metabólico, lo que sugiere un enorme efecto regulatorio sobre las funciones del organismo y por lo tanto sobre la salud, el bienestar nutricional y fisiológico (Holzapfel y Schillinger, 2002, Salminen y Ouwehand, 2003). La microbiota intestinal representa una barrera vital a la entrada de patógenos, fenómeno denominado resistencia a la colonización o exclusión competitiva. Este hecho está dado por distintos factores: la competencia por nutrientes, la prevención de la adhesión de patógenos por un bloqueo específico del sitio de unión o por impedimento estérico, y la producción de sustancias antimicrobianas, como peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que pueden eliminar a los patógenos o disminuir su crecimiento (Havenaar y Huis in't Veld, 1992, Ziemer y Gibson, 1998, Holzapfel y Schillinger, 2002, Salminen y Ouwehand, 2003, Isolauri y col., 2004, Leahy y col., 2005). Otras barreras muy importantes a la entrada de patógenos en el TGI son las enzimas salivales, el ácido gástrico, el mucus intestinal, la bilis, las enzimas pancreáticas, el movimiento peristáltico intestinal, el epitelio intestinal y el sistema inmune de la mucosa (Ouwehand y col., 2002, Snel y van der Meer, 2003). Las tres últimas son muy influenciadas por la microbiota intestinal. La misma actúa como un modulador vital del sistema inmune y es un estímulo muy importante para la maduración de los tejidos

linfoides asociados al intestino, considerado el órgano inmune más grande del cuerpo (Salminen y Ouwehand, 2003, Isolauri y col., 2004). Asimismo, las bacterias intestinales mantienen la nutrición y la circulación de la mucosa, siendo importantes en el mantenimiento de su integridad, en la cual juegan un rol muy importante la fermentación de oligosacáridos con la consiguiente producción de ácidos grasos de cadena corta (butirato, propionato, acetato), los cuales son fuentes importantes de energía para los enterocitos (Holzapfel y Schillinger, 2002, Gibson y col., 2003). Otras funciones conocidas de la microbiota intestinal son la digestión de nutrientes o componentes alimentarios que no fueron digeridos en el intestino delgado, producción de vitaminas y nutrientes, y mejoramiento de su biodisponibilidad, eliminación o detoxificación de compuestos dañinos, etc. (Havenaar y Huis in't Veld, 1992, Ziemer y Gibson, 1998, Salminen y Ouwehand, 2003). Aparte de estas actividades benéficas, la microbiota intestinal también puede dar lugar a la producción de sustancias tóxicas, tales como carcinógenos, a partir de la fermentación de proteínas y aminoácidos (Gibson y col., 2003, Isolauri y col., 2004). De esta manera, se observa que las bacterias intestinales pueden dar lugar a acciones benéficas o dañinas (Salminen y Ouwehand, 2003, Sanders, 2004). Para un funcionamiento óptimo de la microbiota intestinal y el mantenimiento de un estado saludable es fundamental establecer un balance correcto entre las bacterias benéficas y aquellas potencialmente dañinas. Bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, son consideradas benéficas, mientras que aquellas de los géneros *Clostridium*, *Bacteroides*, *Proteus* y *Escherichia* tienen el potencial de ejercer, en ciertas circunstancias, efectos dañinos o perjudiciales en la salud (Salminen y Ouwehand, 2003, Stanton y col., 2003, Isolauri y col., 2004). El equilibrio correcto de la microbiota intestinal puede ser afectado por distintos factores, como terapia con antibióticos, estrés, infecciones, estado de salud, edad, composición de la dieta, intoxicaciones alimentarias (Havenaar y Huis in't Veld, 1992, Isolauri y col., 2004). Con respecto a la influencia de la dieta, una alta composición de la misma con alimentos vegetales favorecería la presencia de bacterias benéficas, mientras que si los alimentos de origen animal son los predominantes disminuiría la proporción de estas bacterias (Ray, 2001b).

Se ha demostrado que la incorporación de bacterias probióticas en la dieta puede influir positivamente en la actividad y composición de la microbiota intestinal (Salminen y Ouwehand, 2003).

2.3- Bacterias utilizadas como probióticos

Los microorganismos más comúnmente utilizados como probióticos pertenecen a distintas especies bacterianas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque también se han ensayado otros microorganismos (Chandan, 1999, Salminen y Ouwehand, 2003). En la tabla 2 se citan los más frecuentemente empleados.

Tabla 2. Microorganismos usados en productos probióticos (Salminen y Ouwehand, 2003).

Lactobacilos	Bifidobacterias	Otros microorganismos	
		Bact. lácticas	Microorganismos no lácticos
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Bif. animalis</i>	<i>Ec. faecium</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Bif. breve</i>	<i>Ec. faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	<i>Bif. infantis</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. reuterii</i>	<i>Bif. longum</i>		<i>Clostridium butyricum</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Bif. adolescentis</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Lb. salivarius</i>	<i>Bif. lactis</i>		<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Bif. bifidum</i>		
<i>Lb. plantarum</i>			
<i>Lb. crispatus</i>			
<i>Lb. gasseri</i>			

Para un satisfactorio desarrollo de alimentos probióticos, es indispensable conocer las condiciones óptimas de crecimiento y los requerimientos nutricionales de las bacterias probióticas incorporadas en los mismos, conocimientos microbiológicos básicos e indispensables para garantizar productos con una alta población probiótica (Boylston y col., 2004).

2.3.1- Lactobacilos

El género *Lactobacillus* es el más grande y heterogéneo dentro de las bacterias lácticas, siendo el rango de composición de guanina y citosina (G+C) en el ADN muy amplio, entre 32 a 55 mol %. Son bacilos Gram-positivos, no forman esporos, son catalasa-negativos y producen ácido láctico como principal producto de fermentación (Curry y Crow, 2003a). Se encuentran naturalmente presentes en diversos hábitats: en el tracto gastrointestinal y urogenital de humanos y animales, en el suelo, en plantas, y también en

alimentos fermentados, como un organismo deseable (leche, carne, vegetales, cereales) o como contaminante (cerveza, algunos productos fermentados de carne y leche, pescado en escabeche, mezclas de verduras y frutas) (Limsowtin y col., 2003). En la industria láctea se utilizan principalmente como starter para la producción de ácido, como cultivos adjuntos al starter en el caso particular de algunos quesos, o como probióticos. Por otro lado, varias especies de este género bacteriano son parte mayoritaria de la flora láctica adventicia de los quesos o NSLAB (Curry y Crow, 2003a). Las especies más utilizadas como probióticos son *L. acidophilus* y especies pertenecientes al grupo *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*) (Curry y Crow, 2003b, Gopal, 2003).

En general, los lactobacilos son microaerófilos, siendo mejor su crecimiento en anaerobiosis o con baja presión de oxígeno y con un pequeño porcentaje de dióxido de carbono (De Vuyst, 2000). Según el metabolismo de los carbohidratos se distinguen tres grupos (Curry y Crow, 2003a):

- Homofermentativos obligados: fermentan las hexosas casi por completo a ácido láctico, mientras que las pentosas y gluconato no son fermentados.
- Heterofermentantes facultativos: fermentan las hexosas casi por completo a ácido láctico, o bajo condiciones limitantes de glucosa, fermentan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico; mientras que las pentosas son fermentadas a ácido láctico y acético.
- Heterofermentantes obligados: fermentan las hexosas a ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético y/o etanol; y las pentosas son fermentadas a ácido láctico y acético.

Las especies del grupo *L. casei* son heterofermentantes facultativas (Curry y Crow, 2003b), mientras que *L. acidophilus* es homofermentante (Gomes y Malcata, 1999). Es importante destacar que la actividad de la enzima β -galactosidasa, que hidroliza la lactosa, puede ser inducida en *L. acidophilus* (De Vuyst, 2000).

La temperatura óptima de crecimiento de *L. acidophilus* es 35-40°C, siendo capaz de crecer hasta una temperatura de 45°C, y el pH de crecimiento óptimo es 5,5-6,0 (De Vuyst, 2000).

Los lactobacilos son extremadamente fastidiosos desde el punto de vista de sus requerimientos nutricionales, y están adaptados a sustratos orgánicos complejos (Stanton y col., 2003). Para su crecimiento necesitan baja tensión de oxígeno, carbohidratos fermentables, proteínas, péptidos y aminoácidos, vitaminas del grupo B, derivados de ácidos nucleicos, ácidos grasos libres no saturados, y minerales tales como hierro, magnesio y manganeso. Su crecimiento se ve incrementado por la adición de proteínas de

suero, que contienen grupos tiales, mientras que la peptona y tripsina estimulan su producción de ácido (De Vuyst, 2000, Gomes y Malcata, 1999).

2.3.2- *Bifidobacterias*

Todas las bifidobacterias tienen forma bacilar y muchas de ellas forman ramificaciones en forma de Y, V y X dependiendo principalmente del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento. Son Gram-positivas, no son móviles, ni forman esporos, y son catalasa-negativas. El género *Bifidobacterium* se encuentra filogenéticamente agrupado en la familia *Actinomycetaceae*, que son caracterizadas por un contenido elevado de guanina y citosina (G+C) en el ADN, que varía de 54 a 67 mol % (Gomes y Malcata, 1999, Shah y Lankaputra, 2003). Estas bacterias se encuentran naturalmente en el intestino de muchos animales, incluyendo al hombre y también de insectos, como abejas (Shah y Lankaputra, 2003). Las bifidobacterias son clasificadas como anaerobios estrictos, ya que son incapaces de utilizar el oxígeno o de crecer en presencia del mismo. Sin embargo, la tolerancia al oxígeno depende de las especies y también del medio de cultivo (Boylston y col, 2004, Talwalkar y Kailasapathy, 2004). En efecto, se han observado algunas cepas que pueden tolerar el oxígeno, y otras que también pueden soportarlo, pero sólo en presencia de dióxido de carbono (Shah y Lankaputra, 2003). Estas cepas son denominadas aerotolerantes, debido a que presentan cierta actividad metabólica en condiciones aeróbicas, sugiriendo la presencia de un mecanismo que les permite evitar la toxicidad del oxígeno (Boylston y col, 2004).

El pH óptimo de crecimiento de estas bacterias es entre 6,0 y 7,0, y no se observa crecimiento a valores inferiores a 4,5-5,0, ni a valores superiores a 8,0-8,5. La sensibilidad al medio ácido es especie y cepa dependiente. La temperatura de crecimiento óptima de las bifidobacterias es 37-41°C, con una máxima y mínima temperatura de crecimiento de 43-45°C y 25-28°C, respectivamente. Debajo de 20°C y por encima de 46°C las bifidobacterias no crecen (Shah y Lankaputra, 2003, Boylston y col., 2004).

Las bifidobacterias son organismos sacarolásticos, que producen ácido acético y ácido láctico sin generación de dióxido de carbono, excepto durante la degradación de gluconato (Gomes y Malcata, 1999). La heterofermentación en las bifidobacterias se produce por un mecanismo conocido como “camino bifido”, y la enzima clave del mismo es la fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa (F6PPK). Como resultado de este camino metabólico se generan dos moles de lactato y tres de acetato a partir de dos moles de glucosa. Además de la glucosa, todas las cepas de bifidobacterias de origen humano son capaces de utilizar

galactosa, lactosa y usualmente fructosa como fuente de carbono. También, en ciertas circunstancias pueden fermentar carbohidratos complejos. La capacidad de fermentación de carbohidratos varía según la especie (Shah y Lankaputra, 2003).

Los requerimientos nutricionales de las bifidobacterias son complejos y dependen de la especie. Sin embargo, el hecho de que puedan crecer en un medio sintético simple compuesto de lactosa, tres aminoácidos (cisteína, glicina y triptofano), varias vitaminas y nucleótidos y algunos minerales, contrasta con las características fastidiosas de los lactobacilos en cuanto a sus requerimientos nutricionales. Además, a diferencia de los lactobacilos, algunas cepas de bifidobacterias pueden utilizar el amoníaco como fuente nitrogenada (Gomes y Malcata, 1999, De Vuyst, 2000). El crecimiento de las bifidobacterias es promovido por factores bifidogénicos y factores de crecimiento. Los factores bifidogénicos caen dentro del concepto de prebióticos, ya que son compuestos, generalmente carbohidratos, que no pueden ser degradados por las enzimas del TGI del hombre, alcanzando el intestino grueso en forma inalterada, donde son metabolizados preferencialmente por las bifidobacterias. Por otro lado, los factores de crecimiento son compuestos que promueven el crecimiento de las bacterias únicamente *in vitro* (Gomes y Malcata, 1999). Entre los factores bifidogénicos se encuentra el factor *bifidus* presente en la leche humana, y que ha sido identificado como N-acetyl-D-glucosamina, y la lactulosa, un disacárido compuesto de galactosa y fructosa, que también ha sido aislado de leche humana (Shah y Lankaputra, 2003). Otros factores bifidogénicos son los fructo-oligosacáridos (FOS), como la inulina, xilo-oligosacáridos, como la xilobiosa, oligosacáridos transgalactosilados, como la lactosucrosa, y oligosacáridos conteniendo maltosa y manosa. Entre los factores de crecimiento podemos nombrar compuestos nitrogenados de pequeño tamaño molecular como péptidos y aminoácidos presentes en hidrolizados de caseína, maltosa, extracto de levadura, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, treonina y cisteína (Gomes y Malcata, 1999, De Vuyst, 2000).

2.4- Criterios de selección de bacterias probióticas

Existen diversos criterios para la selección de bacterias para ser utilizadas como microorganismos probióticos. En primer lugar, hay que destacar que el criterio fundamental para la elección de una cepa probiótica es que la misma ejerza una acción benéfica en el huésped, determinada fehacientemente en estudios clínicos adecuados. Este tipo de criterio de selección se denomina **específico o funcional**, y se valora al momento de considerar el propósito de uso del probiótico (Havenaar y col., 1992, Sanders y Huis in't

Veld, 1999). Con respecto a los criterios funcionales, cabe aclarar que cada cepa probablemente cumpla uno o unos pocos, ya que lamentablemente no existen cepas multipropósito que ejerzan todos los efectos benéficos probióticos conocidos (Ouwehand y col., 2003).

Más allá de los criterios específicos, es importante recalcar que la cepa solamente puede ser usada y ejercer efectivamente su acción probiótica en el huésped si cumple una amplia serie de otros **criterios generales**, relacionados con aspectos de bioseguridad, tecnológicos y biológicos (Haavenar y col., 1992, Holzapfel y Schillinger, 2002, Ouwehand y col., 2002, Stanton y col., 2003). Por más que una cepa bacteriana tenga varias propiedades funcionales, si no cumple un mínimo de estos requisitos generales, existen muy escasas posibilidades de incorporarla en la dieta humana como bacteria probiótica.

2.4.1- Criterios generales

Criterios de bioseguridad

Las cepas seleccionadas para su potencial uso como probióticos deben ser cepas seguras, es decir tener el status GRAS (generally recognized as safe), no deben generar reacciones carcinogénicas, mutagénicas, alérgicas, tóxicas o patogénicas, ni los microorganismos o componentes celulares de los mismos, ni sus productos de fermentación. Se requiere que presenten estabilidad genética para el mantenimiento de sus propiedades benéficas (Havenaar y Huis in't Veld, 1992, Stanton y col., 2003), y que no posean genes de resistencia a antibióticos que podrían ser transferidos a otros microorganismos patógenos (Gibson y Fuller, 2000, Borrielo y col., 2003).

Por otro lado, las bacterias deben ser de origen intestinal humano, para aumentar las posibilidades de supervivencia y efectos beneficiosos en el hombre, dado por interacciones especie-específicas con el huésped (Gilliland, 1998, Gibson y Fuller, 2000, Ouwehand y col., 2002). Además, el origen humano les da una base de seguridad que es deseable (Salminen y Ouwehand, 2003). Sin embargo, el consenso sobre este criterio no es total, ya que algunos científicos sostienen que es más importante la especificidad de acción que la fuente del microorganismo, la cual es muy difícil de ser confirmada (FAO/OMS, 2001).

Criterios tecnológicos

Las bacterias probióticas deben encontrarse en altas concentraciones en los productos a los cuales fueron adicionadas, hasta el momento de su uso o consumo. Para ello se deben

considerar ciertas características, como la posibilidad de propagación económica y la resistencia a los procesos de obtención de cultivos concentrados. También deben mantener su viabilidad y características probióticas a lo largo del proceso industrial de elaboración y almacenamiento del producto en el que son introducidas, durante el cual pueden darse distintas condiciones de estrés para los microorganismos. Por ejemplo, los probióticos incorporados en un alimento se ven expuestos a condiciones que pueden resultar hostiles y afectar su supervivencia, como bajos valores de pH, cambios de temperatura y contenido de oxígeno, actividad acuosa relativamente baja, interacciones con los cultivos iniciadores y otros microorganismos presentes, y la presencia de bacteriófagos y de aditivos alimentarios (Haberer y col., 1996, Charteris y col., 1998, Vinderola, 2002). Finalmente, la adición de bacterias probióticas a un producto alimenticio no debe afectar negativamente las características organolépticas del alimento original (Gibson y Fuller, 2000, Salminen y Ouwehand, 2003).

Criterios biológicos

Según la vía de administración, los probióticos se encuentran con distintas barreras biológicas dispuestas naturalmente para la protección frente a la entrada de microorganismos patógenos al cuerpo humano. Los probióticos no deben ser eliminados por estos mecanismos de defensa del organismo para poder alcanzar el sitio de su acción benéfica en altas concentraciones. De este modo, los microorganismos utilizados por vía oral, deben ser resistentes frente a las condiciones adversas presentes en el TGI: enzimas de la cavidad oral (por ej.: lisozima y amilasa), gástricas (pepsina y lipasa), pancreáticas e intestinales, el bajo pH del estómago dado por la alta concentración de ácido clorhídrico y la presencia de ácidos biliares (Havenaar y col., 1992, Charteris y col. 1998). Hay que tener en cuenta que el alimento que se utiliza como vehículo de las bacterias puede afectar su tolerancia frente a estas barreras biológicas (FAO/OMS, 2001, Vizoso Pinto y col., 2006).

Por otro lado, la capacidad de adherencia a las células epiteliales intestinales (considerada huésped-específica) y al mucus intestinal es considerada una característica muy importante para aumentar la supervivencia y favorecer la colonización temporaria del probiótico en el intestino (Charteris y col., 1998).

2.4.2- Criterios específicos o funcionales

Existe una lista creciente de efectos benéficos sobre la salud, atribuidos al consumo de bacterias probióticas. Sin embargo, los mecanismos de acción de los mismos permanecen desconocidos en gran medida (Marco y col., 2006). A continuación se describen los potenciales efectos positivos de los probióticos, sus aplicaciones terapéuticas y algunos de los mecanismos de acción propuestos.

Promoción de la resistencia a la colonización y modulación de la microflora intestinal

Existen distintos estudios que indican que la administración de bacterias probióticas aumenta la resistencia a la colonización de bacterias patógenas sobre distintas partes del cuerpo, como el tracto gastrointestinal, urogenital y respiratorio (Havenaar y Huis in't Veld, 1992). Esta propiedad funcional es muy importante, por ejemplo, en la normalización de la actividad y composición de la microbiota intestinal, fundamental a su vez en la prevención o tratamiento de distintos desórdenes intestinales. En efecto, una gran cantidad de estudios en humanos demostraron que la administración de probióticos disminuía la duración y los síntomas de diarreas de diferente etiología, como ser diarrea infecciosa aguda, causada por rotavirus u otros enteropatógenos, diarrea asociada a terapias con antibióticos, y diarrea del viajero (Salminen y col., 1998, FAO/OMS, 2001, Ouwehand y col., 2002 y 2003). Asimismo, existen resultados que indican efectos positivos de los probióticos en la terapia y profilaxis de enfermedades inflamatorias intestinales, como la enfermedad de Crohn, así como el síndrome del intestino irritable, en las cuales se cree que un desbalance microbiano intestinal juega un papel importante (FAO/OMS, 2001). Además hay algunos trabajos que indican cierta actividad antagonista de probióticos contra *Helicobacter pylori*, patógeno que causa gastritis, úlceras y cáncer de estómago (FAO/OMS, 2001, Sanders, 2004).

Por otro lado, también hay resultados sobre la inhibición de patógenos fuera del TGI. Distintas investigaciones sugirieron que el uso de probióticos, fundamentalmente lactobacilos (microorganismos predominantes en la vagina), administrados por vía oral o vaginal, puede ayudar a controlar la incidencia y duración de infecciones urogenitales, causadas en un gran porcentaje por microorganismos de origen intestinal (Sanders, 2000, FAO/OMS, 2001, Sanders, 2004).

Los criterios de adhesión y colonización, nombrados anteriormente, son factores que, además de aumentar la posibilidad de permanencia del probiótico en el TGI,

probablemente tienen efectos positivos directos mediante una exclusión competitiva, previniendo o limitando la adhesión de patógenos al intestino. El impedimento de la absorción por un factor estérico o por la unión a los mismos receptores, y la inhibición de crecimiento o el desplazamiento de los patógenos luego de la adhesión, han sido los mecanismos planteados para la exclusión competitiva (Charteris y col., 1998, Marco y col., 2006). Asimismo, otros factores han demostrado ser importantes en la resistencia a la colonización por parte de los probióticos, como la habilidad de co-agregación (Charteris y col., 1998), la producción de sustancias antimicrobianas (como bacteriocinas, ácidos, peróxido de hidrógeno) (Fooks y Gibson, 2002, De Vuyst y col., 2004, Makras y De Vuyst, 2006), la activación del sistema inmune (Salminen, 1996, Gibson y Fuller, 2000, Silva y col., 2004) y la reducción de la permeabilidad de la mucosa (Ouwehand y col., 2002).

Modulación de la respuesta inmune

Otro efecto benéfico muy importante es la modulación de la respuesta inmune dada por la interacción con los tejidos linfoides asociados al intestino, en la cual la adherencia juega un papel muy importante. Diversos estudios han demostrado la modificación de parámetros inmunitarios por la acción de bacterias probióticas, incrementando sobre todo los niveles de células inmunoreactivas, como neutrófilos, macrófagos y linfocitos, o de distintos factores como citoquinas, inmunoglobulinas e interferón (Havenaar y Huis in't Veld, 1992, Sanders, 2004). Donnet-Hughes y col. (1999), por ejemplo, han encontrado que la actividad fagocítica de glóbulos blancos en sangre periférica se incrementaba luego de la administración de una cepa probiótica (*Lactobacillus johnsonii* La1) a voluntarios sanos. Por otro lado, Medici y col. (2004) observaron una estimulación de la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales y del número de células productoras de IgA, así como el mantenimiento de niveles adecuados de la relación entre linfocitos T CD4+ y CD8+ en ratones alimentados con un queso fresco conteniendo tres bacterias probióticas. Estos efectos sobre la respuesta inmune son muy importantes, ya que constituyen una línea de defensa primordial del organismo frente a la presencia de microorganismos patógenos invasores (Snel y van der Meer, 2003). En efecto, se ha comprobado una mayor supervivencia de animales de laboratorio infectados con patógenos a los que se les administró una dieta con probióticos que de aquellos con una dieta normal (Sanders, 2004). Además de estos efectos, también es promisoriosa la aplicación de probióticos con otros objetivos, por ejemplo disminuir el desarrollo de alergia y aliviar la inflamación intestinal,

sobre todo mediante un control del balance de la liberación de citoquinas pro y anti-inflamatorias (Ouwehand y col., 2002, Salminen y Ouwehand, 2003, Sanders, 2004).

Disminución del nivel de colesterol

Algunas cepas probióticas han demostrado un efecto hipocolesterolémico, lo que las convierte en una importante herramienta para la prevención de enfermedades cardiovasculares (Abd El-Gawad y col., 2005, Sanders, 2004). La acción hipocolesterolémica ha sido atribuida a la reducción de la absorción del colesterol dietario o endógeno por las bacterias probióticas, debido a una asimilación del mismo durante el crecimiento, a la incorporación del colesterol en la membrana celular, o a la unión del mismo a la superficie celular (Charteris y col., 1998, Liong y Shah, 2005). Otro de los mecanismos propuestos para este efecto, es la deconjugación de los ácidos biliares por parte de las bacterias probióticas, generando ácidos biliares libres. Dichos compuestos presentan una menor absorción intestinal, lo que supone que su eliminación en las heces sea más elevada, y que se produzca una disminución del colesterol sanguíneo, ya que éste es un precursor de la síntesis de los ácidos biliares en el hígado. Por otro lado, la absorción de colesterol es menor en presencia de los ácidos biliares libres (Charteris y col., 1998, Gilliland, 1998, Sanders, 2000). La deconjugación de ácidos biliares por parte de las bacterias probióticas es una propiedad controvertida de estos microorganismos, ya que ha sido asociada con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer, debido a que los ácidos biliares libres pueden ser transformados por la microbiota intestinal en ácidos biliares secundarios, que son potenciales carcinógenos (Ziemer y Gibson, 1998, Sanders, 2000). Finalmente, otra explicación para el efecto hipocolesterolémico se basa en la posible co-precipitación del colesterol con los ácidos biliares libres debido a la producción de ácido por parte de las bacterias (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

Disminución de la intolerancia a la lactosa

La intolerancia a la lactosa es debida a una deficiencia fisiológica de los niveles adecuados de la enzima β -galactosidasa, presente en las células del intestino delgado, y necesaria para hidrolizar este disacárido en glucosa y galactosa, las cuales son luego absorbidas en el intestino delgado. Niveles insuficientes de esta enzima provocan que la lactosa remanente pase al colon, donde es metabolizada por la microbiota generando distintos compuestos (ácidos orgánicos, dióxido de carbono, metano e hidrógeno), que conducen a un incremento de agua en el intestino por diferencia de presión osmótica. Estos

hechos causan dolor abdominal, diarrea acuosa y flatulencia (Chandan, 1999, Sanders, 2004). Numerosos estudios han demostrado la habilidad de las bacterias del yogur y, en menor medida, de distintas bacterias probióticas, de disminuir los síntomas asociados a la intolerancia a la lactosa, debido a que poseen actividad β -galactosidasa (Chandan, 1999, Ouwehand y col., 2003). La actividad de esta enzima depende del microorganismo, y el mecanismo de acción por el cual se ejerce el efecto benéfico en el huésped no es del todo conocido. Se han postulado distintas premisas: i) que las bacterias metabolizan intracelularmente la lactosa antes de llegar al intestino (Shah, 2003), ii) que la bilis incrementa la permeabilidad de las paredes celulares, permitiendo de este modo la entrada de lactosa al interior de la célula y su consiguiente hidrólisis por la lactasa (Gilliland, 1998, Sanders, 2000), y iii) que la enzima es liberada en el intestino debido a la lisis celular y allí metaboliza la lactosa (Charteris y col., 1998, Ouwehand y col., 2002). Asimismo, existen factores asociados al alimento que aportan al efecto benéfico cuando las bacterias son ingeridas dentro de un producto lácteo fermentado: la concentración de lactosa es menor y el tránsito gastrointestinal es más lento que en los productos no fermentados (Ouwehand y col., 2002, Shah, 2003, Gueimonde y Salminen, 2004).

Actividad anticarcinogénica

En general, el cáncer es causado por mutación o activación de genes anormales que controlan la división y el crecimiento celular. Sin embargo, la mayoría de estas células anormales no genera cáncer, debido a que las células normales las eliminan por competencia y el sistema inmune las destruye (Sanders, 2004). Existen muchos agentes que pueden causar cáncer, entre ellos distintos agentes químicos, muchos de los cuales pueden ser generados en el organismo por la actividad metabólica de la microbiota intestinal (Ouwehand y col., 2002). Existen resultados promisorios de algunos trabajos que indican la inhibición o retraso en la aparición de cáncer por la acción de probióticos, aunque estos resultados son aún muy preliminares (FAO/OMS, 2001). Las propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas pueden ser debidas a varios mecanismos, entre ellos, la activación del sistema inmune para disminuir la proliferación de las células cancerosas, la disminución de enzimas productoras de carcinógenos (β -glucuronidasa, azoreductasa, nitroreductasa) a través de una acción moduladora sobre la microbiota intestinal, detoxificación de compuestos carcinogénicos ingeridos, producción de compuestos inhibidores del crecimiento tumoral, y la producción de compuestos como el butirato que

estimula la muerte celular programada (apoptosis) de células anormales (Havenaar y Huisint' t Veld, 1992, Charteris y col., 1998, Sanders, 2000, Haberer y col., 2003).

Otros efectos

Asimismo, otras potenciales propiedades funcionales de las bacterias probióticas son el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal, la mejora de la absorción de calcio, la síntesis de vitaminas, el incremento de la motilidad intestinal, y un efecto antihipertensivo debido a compuestos producidos por bacterias probióticas, como péptidos derivados de la hidrólisis de la caseína y ácido γ -aminobutírico producido durante la fermentación, o por componentes de la pared celular bacteriana (Ziemer y Gibson, 1998, Holzapfel y Schillinger, 2002, Sanders, 2004).

2.5- Eficacia de los probióticos

Los efectos benéficos de las bacterias probióticas deben ser perfectamente documentados por estudios clínicos en humanos, diseñados según un estricto protocolo (Lee y Salminen, 1995, FAO/OMS, 2001, Salminen y Ouwehand, 2003). Los ensayos *in vitro* y/o en animales también resultan de gran utilidad, especialmente para la preselección de las bacterias probióticas, pero los estudios en humanos son los únicos que pueden garantizar el cumplimiento del efecto probiótico (Guarner y Schaafsma, 1998, Snel y van der Meer, 2003). Si bien un gran número de efectos beneficiosos atribuidos a los probióticos han sido reportados en la literatura científica, el número de ensayos clínicos rigurosamente diseñados aún resulta limitado (Playne y col., 2003).

Por otra parte, no hay todavía estudios que aporten evidencia sobre si una ingestión sistemática de probióticos en personas supuestamente sanas contribuye o no a mantener la salud. Hasta el momento, la ingestión de bacterias probióticas ha dado únicamente una colonización o supervivencia temporarias, confiriendo probablemente un efecto también temporario, sugiriendo la necesidad de un consumo continuo (FAO/OMS, 2001).

Hay que tener en cuenta además, que las diferentes matrices alimentarias pueden tener efectos sobre la actividad probiótica, de modo que el efecto probiótico debe ser estudiado en cada producto comercial específico (Schaafsma, 1996, FAO/OMS, 2001, Playne y col., 2003). Sin embargo, en algunos casos es difícil distinguir efectos producidos por las bacterias probióticas o por las características generales del alimento, por lo cual se deben incluir controles adecuados (Schaafsma, 1996, FAO/OMS, 2001).

Por otro lado, generalmente se reconoce que la eficacia de la actividad de una bacteria probiótica está directamente relacionada con el número de células microbianas activas y viables consumidas. Esto es así, incluso para aquellos efectos que implican la acción de componentes celulares, enzimas o productos de fermentación, y no necesariamente las células viables. En efecto, la viabilidad, se establece como el parámetro de la actividad probiótica, ya que es un indicador del número de células presentes, y más allá del principio activo puesto en juego, se ha encontrado que correlaciona bien con los efectos medidos (Sanders y Huis in't Veld, 1999). Además, diferentes efectos probióticos pueden requerir diferentes dosis de bacterias probióticas, aunque la información al respecto es muy limitada ya que existen pocos estudios de dosis-respuesta (Donnet-Hughes y col., 1999, Ouwehand y col., 2003, Salminen y Ouwehand, 2003). Aparte de la cantidad de bacterias ingeridas, es muy importante tener en cuenta el período de administración requerido para la producción de un efecto benéfico, concepto sobre el que no se dispone tampoco de gran conocimiento hasta el momento (Sanders y Huis in't Veld, 1999, Stanton y col., 2001).

Es bien sabido que una bacteria probiótica no puede ejercer sus efectos benéficos en el organismo, salvo que alcance muy altas concentraciones, de la cual no hay cifras exactas (Charteris y col., 1998). En general, una concentración de 10^7 UFC por g o mL de producto al momento de la ingesta se acepta como la población probiótica mínima necesaria para producir un efecto positivo en la salud. Asimismo, una ingesta de 10^8 - 10^9 UFC por día ha sido indicada como la mínima dosis terapéutica, lo cual se lograría con un consumo de 100 g o mL de producto (De Vuyst, 2000, Salminen y Ouwehand, 2003). Las cantidades citadas no deben ser consideradas como valores absolutos, ya que la mínima cantidad necesaria también depende del alimento en el que se ingieren las bacterias, ya que el mismo puede mostrar una acción protectora, y de la cepa utilizada que puede demostrar diferente sensibilidad a las barreras biológicas (Stanton y col., 2001).

3- Desarrollo de alimentos probióticos

3.1- Productos probióticos

Los alimentos probióticos son productos alimenticios que contienen microorganismos probióticos, en una matriz adecuada y en concentración suficiente para que su consumo proporcione el efecto benéfico postulado, además del aporte de nutrientes

intrínseco del alimento. Un desarrollo apropiado de alimentos probióticos es una tarea que involucra a un gran número de especialistas. Se necesitan expertos para estudiar el efecto beneficioso de la cepa probiótica, para desarrollar el producto y analizarlo, y también para venderlo (Saxelin y col., 2003).

Los productos probióticos disponibles en el mercado pueden ser clasificados en tres categorías (Sanders y Huis in't Veld, 1999):

- Alimentos tradicionales, como yogur o queso con bacterias probióticas agregadas, cuyo consumo tiene un fin principalmente nutricional. Ejemplos de estos productos son: **Vifit**, un yogur con *L. rhamnosus* GG (Campina Melkunie, Holanda), **Bifidus**, un yogur con *B. longum* (Morinaga Milk Industry, Japón) (Charteris y col., 1998, Sanders y Huis in't Veld, 1999), **queso Inner Gut** (Anchor) (Gibson y col., 2003), **BIOqueso Ilolay Vita**, un queso fresco con *B. bifidum*, *L. acidophilus* y *L. paracasei* (Sucesores de Alfredo Williner S.A., Argentina) (Medici y col., 2004).

- Suplementos alimentarios o leches fermentadas. Son alimentos formulados con el principal objetivo de incorporar probióticos o sus productos de fermentación a la dieta para la obtención del beneficio declarado para la cepa utilizada. Ejemplos de leches fermentadas comerciales son: **Actimel**, con *Lactobacillus casei* Immunitas (Danone, Francia), **Yakult**, con *Lactobacillus casei* Shirota (Yakult, Japón), y **LC1Go**, con *Lactobacillus johnsonii* (Nestlé, Suiza) (Stanton y col., 2001, Gibson y col., 2003).

- Suplementos dietarios, como cápsulas, polvo o tabletas, destinadas para su consumo por personas sanas con el fin de mejorar su estado de salud, o para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales y ciertas enfermedades hepáticas (Gomes y Malcata, 1999). En el mercado existen algunos productos de este tipo como **Multibionta** (*L. acidophilus*, *B. bifidum* y *B. longum*), **Protexin** (*S. thermophilus*, dos bifidobacterias y cuatro lactobacilos) (Gibson y col., 2003), y **Bioflora** (*L. casei*, *L. plantarum*, *Streptococcus faecalis* y *Brevibacterium linens*) que es elaborado en nuestro país por Biosidus S.A. (<http://www.sidus.com.ar/web/gef.nsf/?Open>).

Como puede observarse en los ejemplos mencionados anteriormente, los productos que han sido utilizados principalmente como vehículo de las bacterias probióticas son alimentos fermentados. Entre ellos, el área de mayor desarrollo, tanto a nivel de investigación como a nivel comercial, está constituida por los productos lácteos fermentados, principalmente yogur y otras leches fermentadas (Dave y Shah, 1998, Nighswonger y col., 1996, De Vuyst, 2000, Heller, 2001, Coeuret y col., 2004, Awaisheh y col., 2005). Las leches fermentadas y yogures fueron los primeros en ensayarse como

soporte de bacterias probióticas, pero luego surgieron otros alimentos como yogur congelado (Davidson y col., 2000), queso de suero (Madureira y col., 2005), productos cárnicos fermentados (Mahoney y Henriksson, 2003, Klingberg y Budde, 2006), leche fermentada de soja y yogur de soja (Abd El-Gawad y col., 2005), quesos (Stanton y col., 1998, Ross y col., 2002), helados (Hekmat y McMahon, 1992), producto de harina de avena fermentada mezclada con jugo de fruta (Molin, 2001), leche en polvo (FAO/OMS, 2001) y otros como postres lácteos, pan, chocolate, etc. (De Vuyst, 2000).

3.2- Productos lácteos como vehículo de bacterias probióticas

La selección de productos lácteos fermentados como vehículo de bacterias probióticas, es decir para su desarrollo como alimento probiótico, obedece a diversos motivos, que a su vez reflejan los enfoques de las distintas disciplinas sobre el tema.

En primer lugar podemos nombrar las características que determinan o influyen en la aceptabilidad del consumidor, un factor muy importante cuando se piensa en un desarrollo industrial rentable de estos productos. Los yogures y otras leches fermentadas ya cuentan con una imagen positiva desde el punto de vista de la salud, y son considerados alimentos funcionales. Además del beneficio nutricional por vitaminas y proteínas, entre otros, realizan un notable aporte de calcio, ya que los productos lácteos aportan del 65 al 70% del calcio total de la dieta occidental. Como ya se mencionó, el consumo del yogurt es beneficioso además para aquellas personas intolerantes a la lactosa, debido a la disminución de la concentración de lactosa con respecto a la leche y la incorporación de microorganismos (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*) con actividad β -galactosidasa (Heller, 2001, Playne y col., 2003, Saxelin y col., 2003, Stanton y col., 2003). Por otra parte, el queso muestra efectos similares, porque la cantidad de lactosa remanente en la cuajada es mínima (Heller y col., 2003). Otra ventaja radica en que los lácteos se consumen muy frecuentemente en la dieta, condición necesaria para una continuidad del efecto beneficioso, y su utilización masiva se remonta a tiempos muy remotos, especialmente en Europa y Oriente Medio (Heller, 2001, Simmering y Blaut, 2001, Spence, 2006). Además, los consumidores están acostumbrados a la presencia de microorganismos vivos en los productos fermentados, y los asocian con efectos beneficiosos en su salud (Sanders, 2000, Heller, 2001, Sanders, 2004).

Las características sensoriales de los alimentos constituyen un importante factor en la aceptabilidad del consumidor, ya que aún en alimentos más saludables, el sabor y aroma son cualidades que determinan la aceptación del consumidor (Simmering y Blaut, 2001,

Stanton y col., 2001). Los productos lácteos fermentados poseen características organolépticas apreciadas por los consumidores y son alimentos de gran aceptación (Boylston y col., 2004).

Además de los aspectos mencionados, relacionados sobre todo con el consumidor, hay razones tecnológicas que son importantes para el desarrollo de alimentos probióticos a partir de productos lácteos tradicionales. Los lácteos fermentados fueron diseñados para mantener la viabilidad de las bacterias utilizadas en la fermentación (Heller, 2001, Stanton y col., 2003). En el caso de yogures, por ejemplo, las bacterias utilizadas para su producción deben permanecer viables hasta el fin del período de vida útil del producto (ANMAT, 2006). Asimismo, en los quesos, la presencia de bacterias del starter y otras no pertenecientes al starter son indispensables durante el proceso de maduración para el desarrollo de las características organolépticas de un producto maduro, aún cuando la población de dichas bacterias puede mostrar cierta disminución durante este período (McSweeney, 2004b). De este modo, las tecnologías tradicionales pueden ser fácilmente adaptadas a la incorporación de probióticos en estos productos y favorecen el mantenimiento de una alta viabilidad (Stanton y col., 2003). También, el almacenamiento de los productos lácteos fermentados a baja temperatura es un factor que probablemente promueve la estabilidad de los probióticos (Sanders, 2004).

Por otro lado, existen diversos estudios que demuestran que los productos lácteos constituyen una matriz alimentaria protectora hacia las bacterias probióticas, que aumenta las posibilidades de que lleguen vivas hasta el intestino, sobreviviendo al estrés del TGI (Fernandes y col., 1992, Chandan, 1999, Sanders, 2004). Esta preservación ha sido atribuida a un efecto buffer producido por la leche y los productos derivados de la misma, que es muy importante sobre todo en el estómago donde el pH es muy bajo y muy agresivo hacia las bacterias (Fernandes y col., 1992, Saxelin y col., 2003). El efecto buffer de la leche y el yogur es principalmente determinado por la presencia de una alta concentración proteica, de fosfato soluble y fosfato de calcio coloidal y de citrato, y en el caso del yogur, también a su mayor contenido de sólidos totales y ácido láctico (Fernandes y col., 1992, McCarthy, 2003).

Vizoso Pinto y col. (2006) demostraron un efecto protector de la leche sobre la viabilidad de distintas cepas de *Lactobacillus* enfrentadas a varias condiciones de estrés: pH ácido, lisozima y pepsina. Schillinger y col. (2005) observaron que no hubo disminución de la población de *L. rhamnosus* GG y dos cepas del grupo de *L. casei* cuando se las expuso a un jugo gástrico simulado (pH 2 y pepsina) con el agregado de leche,

mientras que las mismas cepas habían mostrado una pérdida casi total de la viabilidad en la misma experiencia, pero sin agregado de leche. Vinderola y col. (2000b) demostraron un mayor sostenimiento de la viabilidad de distintas bacterias probióticas en un medio ácido (pH 2 y 3) cuando se incorporaron en un homogeneizado de queso que cuando se utilizaron en forma liofilizada.

Por otro lado, Gardiner y col. (1999b) también encontraron un efecto protector del yogur sobre la viabilidad de una cepa probiótica de *Enterococcus* en jugo gástrico a pH 2,0, el cual se incrementó a 3,65 luego del agregado del alimento. Estos autores postularon que este efecto buffer no fue el único responsable de la protección, sino que también contribuyeron otros factores, como la presencia de polisacáridos extracelulares, debido a que se observó una mayor disminución de la viabilidad al exponer a los microorganismos directamente a un jugo gástrico a pH 3,65.

El efecto protector de la viabilidad de probióticos no se restringe solamente a los productos lácteos, sino que se extiende a otros alimentos. En efecto, lactobacilos administrados en un alimento cárnico fermentado mostraron una mejor supervivencia en el TGI, evidenciado por una mayor recuperación fecal de los mismos, con respecto a la administración directa de los lactobacilos liofilizados (Klingberg y Budde, 2006).

Además de proteger a las bacterias mediante el efecto buffer, las leches fermentadas pueden contribuir a su adaptación a un medio ambiente ácido, ya que su pH varía entre 3,7 y 4,3 (Fernandes y col., 1992, Leverrier y col., 2005, Roy, 2005). Como se verá más adelante, esta adaptación al estrés ácido es una de las estrategias propuestas para mejorar la viabilidad de los probióticos en los productos lácteos fermentados (Ross y col., 2005).

Del análisis de los trabajos de investigación citados, se desprende que el estudio de la resistencia de las bacterias probióticas a las barreras biológicas debería ser realizado directamente en el alimento final, ya que la matriz alimentaria impacta considerablemente en la tolerancia al estrés del TGI (Schillinger y col., 2005).

3.3- Factores que afectan la viabilidad de bacterias probióticas en el producto

Más allá de las ventajas que presentan los productos lácteos como vehículo de bacterias probióticas, su supervivencia en este tipo de alimentos ha mostrado ser muy variable. En efecto, a pesar de numerosos resultados favorables, se han observado también algunas limitaciones en el mantenimiento de la viabilidad de las bacterias probióticas, dado que las condiciones ambientales del alimento no son las ideales para el crecimiento y actividad bacteriana (Boyston y col., 2004). La mayor o menor supervivencia se debe,

fundamentalmente, a su sensibilidad al estrés causado por el medio ambiente del alimento en el que fue incluido (Roy, 2005).

A continuación se discuten algunos de los factores que influyen en la capacidad de las bacterias probióticas de permanecer viables en el producto, y que deben ser cuidadosamente considerados en pos del desarrollo satisfactorio de alimentos probióticos.

3.3.1- Inoculación

Las bacterias probióticas se pueden agregar a los productos lácteos fermentados en distintos momentos de la elaboración: junto con el fermento primario antes de la fermentación, o luego de que este proceso ha terminado, en forma directa o pre-incubadas en una porción de la leche de elaboración (Simmering y Blaut, 2001, Saxelin y col., 2003). La presencia de las bacterias probióticas durante la fermentación aumenta la posibilidad que interactúen con el fermento primario y con los componentes químicos del alimento, con la consiguiente influencia en su viabilidad (Heller, 2001). La incubación de las bacterias probióticas antes de su agregado al producto tiene por objeto garantizar una alta carga probiótica en el mismo. El crecimiento de algunos probióticos, sobre todo bifidobacterias, en un producto que también contiene bacterias lácticas a veces es limitado por la mayor velocidad de crecimiento de estas últimas (De Vuyst, 2000, Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001, Doleyres y Lacroix, 2005). Sin embargo, otros autores han demostrado una mejor supervivencia de *L. acidophilus* en yogur cuando es incorporado junto con el fermento láctico que si se agregaba después de la fermentación, debido probablemente a una adaptación del probiótico a un medio que se tornaba más adverso durante la fermentación del producto (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

En la actualidad, los fermentos involucrados en la fabricación de productos lácteos, son casi exclusivamente cultivos de adición directa, y los fermentos probióticos no constituyen una excepción (De Vuyst, 2000, Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

La metodología de incorporación del fermento probiótico determinará el estado fisiológico de estas bacterias en el producto, que a su vez influye en el mantenimiento de la viabilidad de las mismas. Éste depende de varios factores: de la fase de crecimiento (logarítmico o estacionario) en la que se encuentran las bacterias al momento de su agregado al producto, de las condiciones que conducen al estado estacionario, del tratamiento de los probióticos durante y luego de su crecimiento, y de la composición del medio de cultivo de los mismos (Heller y col., 2003). En cuanto a la fase de crecimiento, se ha demostrado que las células en estado estacionario presentan una mayor tolerancia a

las condiciones adversas del medio, que las que se encuentran en fase logarítmica de crecimiento, debido a un proceso de adaptación (Bertazzoni Minelli y col., 2004, Doleyres y Lacroix, 2005). Leverrier y col. (2005) demostraron una mayor resistencia de propionibacterias en fase estacionaria que en fase de crecimiento exponencial, frente a varios factores de estrés (ácido, sales biliares y ambos). Con respecto a las condiciones que conducen del estado logarítmico al estacionario, se ha encontrado que, por ejemplo, la disminución de fuentes de carbono fue más favorable para la supervivencia bacteriana que el descenso de pH, aún en presencia de suficiente cantidad de azúcares fermentables (Heller, 2001). Por otro lado, la importancia del medio de cultivo de las bacterias probióticas se debe principalmente a la presencia de enzimas inducibles en algunas cepas, que podrían ser importantes para su actividad, como por ejemplo la β -galactosidasa en *L. acidophilus* (Gilliland, 1998, De Vuyst, 2000).

3.3.2- Composición del producto

Nutrientes

Las bacterias probióticas vivas pueden interactuar con el medio ambiente en el que se encuentran a través de sus distintas actividades metabólicas, lo que les permitirá, por un lado, cumplir con sus requerimientos nutricionales, y por otro lado, influir en la composición y, eventualmente, en la calidad del producto final. En consecuencia, resulta importante considerar si en el alimento se encuentran presentes los nutrientes esenciales para mantener la viabilidad bacteriana, entre ellos, los hidratos de carbono adecuados y en cantidades suficientes, así como aminoácidos y péptidos y ácidos grasos libres provenientes de un apropiado grado de hidrólisis de proteínas y lípidos, respectivamente (Heller, 2001, Stanton y col., 2003). Además, el medio ambiente químico del alimento puede ejercer cierta protección o, por el contrario, inhibir a la población probiótica. En este sentido, Vinderola y col. (2000a) han demostrado un efecto más inhibitorio sobre dos cepas probióticas, *B. bifidum* BBI y *L. acidophilus* LAI, de un yogur entero que de un yogur bajo en grasa.

La leche es un medio de crecimiento muy rico ya que contiene gran proporción de los nutrientes esenciales para la viabilidad de bifidobacterias y lactobacilos. Sin embargo, en general, el crecimiento de las bifidobacterias en leche es bajo, ya que estos nutrientes se encuentran en forma no aprovechable para estas bacterias, debido a su baja actividad proteolítica (Gomes y Malcata, 1999, De Vuyst, 2000, Stanton y col., 2003, Boylston y col., 2004). Por el contrario, muchos lactobacilos pueden crecer bastante bien en leche,

alcanzando concentraciones máximas alrededor de 10^8 - 10^9 UFC mL⁻¹ luego de 24 h de incubación a 37°C (Stanton y col., 2003). Este óptimo desarrollo celular ha sido atribuido a la capacidad de dichas bacterias de degradar las caseínas, gracias al complejo sistema proteolítico que poseen, aunque esta actividad depende de la especie y de la cepa (Grippon, 1994, Vassal, 1996).

Acidez

Todos los productos lácteos fermentados tienen pH ácido, debido a la producción de ácido láctico durante la fermentación, y en algunos casos la acidificación se incrementa durante el almacenamiento del producto. La acidez de estos productos es uno de los factores más influyentes en el mantenimiento de la viabilidad de las bacterias probióticas (Heller, 2001, Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001). En general, las bifidobacterias son menos tolerantes al medio ácido que los lactobacilos (De Vuyst, 2000, Shah, 2000). En este sentido, Donkor y col. (2006) han observado una mejor supervivencia de *L. acidophilus* L10 y *L. paracasei* L26 que *B. lactis* B94 en las condiciones ácidas del yogur, y atribuyeron esta diferencia a la mayor susceptibilidad de las bifidobacterias a los ácidos orgánicos y disminución del pH producidos durante el almacenamiento del producto. Sin embargo, la resistencia al medio ácido es cepa dependiente (Shah, 2000). Así, Vinderola y col. (2000a) demostraron una mayor sensibilidad de una cepa de *L. acidophilus* que de una cepa de *B. bifidum*, expuestas a un medio ácido con un pH entre 3,5 y 4,5.

Aditivos alimentarios

Es muy común en los alimentos actuales el agregado de distintos aditivos como colorantes, aromatizantes, espesantes, estabilizantes, acidulantes y saborizantes. Asimismo, existen ejemplos de leches fermentadas con la adición de pulpa o jugo de frutas, en los que además se permite la presencia de ciertos conservantes (ANMAT, 2006). Estos ingredientes pueden afectar la viabilidad de la población probiótica. En este sentido, Vinderola y col. (2002a) han estudiado la influencia de diferentes aditivos sobre la supervivencia de diversas cepas de bacterias probióticas. En dicho estudio, se ha demostrado un efecto inhibitorio de ciertos aditivos en las concentraciones normalmente utilizadas en los productos lácteos, mientras que otros demostraron inhibición solamente a concentraciones superiores a las comúnmente presentes en los alimentos. Los colorantes-saborizantes de vainilla y frutilla fueron los que ejercieron el mayor efecto, y los resultados fueron cepa-dependientes. Por otro lado, Awaisheh y col. (2005) observaron que ciertas

concentraciones de tres nutraceuticos (isoflavonas, ácidos grasos ω -3 y fitosteroles) disminuían el crecimiento de dos cepas probióticas, dando importancia a un estudio previo para seleccionar las concentraciones óptimas y no inhibitorias de estos compuestos para producir un yogur con bacterias probióticas y nutraceuticos.

Oxígeno

El oxígeno se disuelve muy rápidamente en la leche y sus derivados durante la elaboración, y dependiendo de la permeabilidad del envase del producto, podría entrar en el mismo en un alto porcentaje durante el almacenamiento (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001, Stanton y col., 2003). Asimismo, la influencia del mismo es máxima en condiciones de crecimiento óptimo de las bacterias, a una temperatura de 37°C. Por esta razón, la influencia del oxígeno sería más importante durante la elaboración de los productos lácteos que se produce a temperaturas cercanas a las óptimas, mientras que habría un mínimo efecto durante el almacenamiento, que se produce a temperaturas bajas (Talwalkar y Kailasapathy, 2003 y 2004).

3.3.3- Temperatura de elaboración y almacenamiento

La evolución de la temperatura durante la elaboración del producto puede afectar la viabilidad bacteriana. Así, por ejemplo, la incubación en el yogur se lleva a cabo a 42-43°C, una temperatura mayor que la temperatura óptima tanto para bifidobacterias como para lactobacilos. Por esta razón, se ha propuesto una incubación a 37°C para mejorar la supervivencia de los probióticos en leches fermentadas que los contienen (De Vuyst, 2000, Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001). Por otro lado, el agregado de bacterias probióticas a alimentos cuya fabricación incluye una etapa de calentamiento necesita especial atención para que las bacterias probióticas no sean destruidas. Un ejemplo de este tipo de productos son los quesos duros en los que la cuajada se somete a temperaturas de hasta 56°C (Heller, 2001).

En cuanto al almacenamiento de los productos lácteos fermentados, el uso de bajas temperaturas ha sido postulado como beneficioso, tanto para el mantenimiento de la viabilidad de las bacterias como para la estabilidad del alimento (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001, Doleyres y Lacroix, 2005). Asimismo, la baja temperatura disminuye la actividad metabólica, y por consiguiente la posibilidad de interacciones entre las bacterias y con la matriz alimentaria (Heller, 2001, Heller y col., 2003). Sin embargo, otros autores sostienen que la baja temperatura disminuye la viabilidad de probióticos (De Vuyst, 2000).

Por ejemplo, Roy y col. (1998) han demostrado una mayor disminución de bifidobacterias incorporadas a queso fresco, cuando fue almacenado a 4°C que cuando se mantuvo a 12°C. Con respecto a los productos congelados, varios de ellos han sido propuestos como buenos vehículos de bacterias probióticas, ya que, han demostrado mantener alta viabilidad de las mismas durante largos períodos de tiempo (Hekmat y McMahon, 1992, Davidson y col., 2000). Si bien el proceso de congelación puede causar la inactivación de microorganismos debido a que la formación de cristales altera la permeabilidad celular, en estos productos están presentes distintos crioprotectores, como caseína, sacarosa y grasa, que pueden proteger a las bacterias probióticas incorporadas (Stanton y col., 2003).

3.3.4- Interacciones microbianas

La presencia de bacterias, en general lácticas, en los productos lácteos fermentados es imprescindible, ya que juegan el papel tecnológico primordial al producir la acidificación y participar en el desarrollo de textura y *flavour*. Es posible que estas bacterias, agregadas en altas concentraciones al alimento y activas durante su producción, manifiesten cierto grado de interacción con los probióticos (Roy, 2005). En efecto, durante el crecimiento y a causa de su metabolismo, los fermentos lácticos producen gran cantidad de compuestos, que en algunos casos pueden ser inhibitorios para otros grupos bacterianos. Entre estas sustancias inhibitorias se encuentran el ácido láctico y otros ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas (Boylston y col., 2004). Asimismo, el antagonismo bacteriano se puede presentar a nivel de la competencia por los nutrientes presentes (Roy, 2005). Existen diversos estudios que demuestran efectos antagónicos entre distintas bacterias lácticas y bacterias probióticas. Nighswonger y col. (1996), han demostrado que la disminución de la viabilidad de algunas cepas de *L. acidophilus* incorporadas a yogur y buttermilk fue dependiente del fermento primario utilizado. Por otro lado, Vinderola y col. (2002b) han estudiado las interacciones microbianas entre distintas bacterias lácticas y probióticas, y han observado, en general, una mayor inhibición de probióticos sobre el fermento primario, que el efecto contrario. Además, entre las bacterias probióticas, *L. acidophilus* fue la única especie inhibida por las otras cepas probióticas ensayadas de *L. casei* y *Bifidobacterium*.

Por otro lado, también es posible que ocurran interacciones sinérgicas entre las bacterias. En este sentido, se ha demostrado que las cepas de *S. thermophilus* con alta habilidad de utilización de oxígeno son beneficiosas para las bifidobacterias, ya que generan un medio más anaerobio y por lo tanto más favorable para las mismas (De Vuyst,

2000, Stanton y col., 2003). Por otro lado, Gomes y col. (1998a) han observado cierto grado de simbiosis entre *L. acidophilus* y *B. lactis*, ya que demostraron un incremento en el crecimiento y acidificación cuando estas dos cepas fueron co-cultivadas en leche que cuando fueron ensayadas individualmente. Probablemente, la actividad proteolítica de *L. acidophilus* provee compuestos nitrogenados de pequeño tamaño molecular, indispensables para el crecimiento de *B. lactis*, mientras que esta última, mediante su producción de acetato, genera un efecto buffer en el medio, que podría ser beneficioso para el mantenimiento de la viabilidad de *L. acidophilus*.

Una elección apropiada de las cepas del fermento primario y probiótico, con el fin de evitar reacciones antagónicas y facilitar las interacciones positivas es primordial al momento de desarrollar un producto probiótico (Nighswonger y col., 1996, Vinderola y col., 2002b).

3.4- Metodologías para mejorar la viabilidad

El conocimiento y estudio de los factores que afectan la viabilidad de las bacterias probióticas ha llevado al desarrollo de distintas metodologías en pos de mejorar su supervivencia en distintos alimentos. A continuación se detallan algunas de estas estrategias.

3.4.1- Selección de cepas ácido-tolerantes

La tolerancia de las bacterias probióticas a un medio ácido es importante no sólo en el mantenimiento de su viabilidad en los productos, sino también en su supervivencia al ser expuestos al bajo pH gástrico (Shah, 2000, Bertazzoni Minelli y col., 2004). De este modo, las cepas que presentan mayor tolerancia serían más adecuadas para su incorporación a productos probióticos. Se han encontrado lactobacilos capaces de tolerar medios de muy bajo pH (pH 2,0) (Vinderola y Reinheimer, 2003, Bertazzoni Minelli y col., 2004, Liong y Shah, 2005).

3.4.2- Envases con escasa permeabilidad al oxígeno

Se ha propuesto la utilización de envases con permeabilidad al oxígeno nula o reducida como un medio para mejorar la viabilidad de bacterias probióticas. Así, por ejemplo, se ha demostrado una mejor supervivencia de *L. acidophilus* y bifidobacterias en un yogur en envase de vidrio que en envase plástico (Shah, 2000). También se han

ensayado materiales tradicionales de poliestireno a los que se les incorpora una capa impermeable a los gases (Talwalkar y Kailasapathy, 2004).

3.4.3- Fermentación en dos pasos

La fermentación en dos pasos ha sido propuesta para disminuir la eventual influencia negativa del fermento láctico sobre la población probiótica. En primer lugar se agregan e incuban las bacterias probióticas, y luego se agrega el fermento primario, una vez que los probióticos se encuentran en una etapa tardía de la fase de latencia o en una primera etapa de la fase logarítmica. Esta técnica ha permitido obtener una mayor población inicial y final de *L. acidophilus* y *B. longum* incorporados en un yogur (Shah, 2000).

3.4.4- Microencapsulación

La microencapsulación es un proceso en el cual las células libres son envueltas y retenidas dentro de una membrana que las separa del medio que las rodea (Shah, 2000, Talwalkar y Kailasapathy, 2003). La matriz de encapsulación disminuye la posibilidad de daño o muerte celular, y además permite la difusión de nutrientes en ambos sentidos, manteniendo de este modo la viabilidad celular (Talwalkar y Kailasapathy, 2004).

La microencapsulación ha sido utilizada satisfactoriamente para bifidobacterias y lactobacilos, y se ha demostrado un efecto protector en distintas situaciones: frente a altos niveles de oxígeno en leche y yogur (Talwalkar y Kailasapathy, 2003), en yogur convencional (Adhikari y col., 2000, Sun y Griffiths, 2000, Picot y Lacroix, 2004, Kailasapathy, 2006), frente a condiciones simuladas del TGI (Sun y Griffiths, 2000, Krasaekoopt y col., 2004, Picot y Lacroix, 2004.). Sin embargo, también se encontraron resultados negativos para algunas cepas y ciertos materiales de encapsulación (O'Riordan y col., 2001, Talwalkar y Kailasapathy, 2003, Krasaekoop y col., 2004, Picot y Lacroix, 2004).

3.4.5- Adaptación al estrés

La exposición de microorganismos a condiciones sub-letales o condiciones crecientes de estrés induce en los mismos una respuesta celular de adaptación, que mejora su supervivencia en subsiguientes exposiciones a dosis letales de estímulos similares (Talwalkar y Kailasapathy, 2004). Generalmente, esta adaptación a medios adversos está asociada a la inducción de un gran número de genes, a la síntesis de proteínas de respuesta al estrés y al desarrollo de resistencia cruzada a varios estímulos de estrés (Doleyres y

Lacroix, 2005). Esta habilidad de los microorganismos ha sido utilizada ampliamente para la obtención de cepas capaces de sobrevivir en condiciones desfavorables, ya sea de temperatura, oxígeno, acidez, etc., mejorando de esta manera su resistencia al procesamiento industrial y a las barreras biológicas (Ross y col., 2005). En un estudio de Saarela y col. (2004) se han observado respuestas cepa-específicas y distinto grado de resistencia de tres cepas de *Lactobacillus* y dos de *Bifidobacterium* expuestas a estrés ácido y estrés por temperatura. En este estudio, se han demostrado respuestas de adaptación y respuestas de protección cruzada en la mayoría de las cepas estudiadas.

3.4.6- Adición de sustancias promotoras del crecimiento

La adición de sustancias promotoras del crecimiento constituye otra estrategia para aumentar el desarrollo y supervivencia de las bacterias probióticas en los productos a los que son incorporadas, sobre todo debido a las dificultades de crecimiento de algunas de ellas en leche (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001). La adición de cisteína, concentrado de proteínas de suero, hidrolizados de caseína y triptona fueron efectivos para mejorar la viabilidad de bifidobacterias en yogur que contenía además *L. acidophilus* y *S. thermophilus*, mientras que la viabilidad de *L. acidophilus* fue únicamente aumentada por el agregado de cisteína (Dave y Shah, 1998). En otro trabajo, se logró un incremento del crecimiento y actividad metabólica de *B. lactis* por el agregado de hidrolizados de proteínas, siendo mayor la estimulación cuanto mayor era el porcentaje de hidrólisis. Por el contrario, estos hidrolizados no mejoraron el crecimiento y actividad de *L. acidophilus* (Gomes y col., 1998a). En ambos trabajos citados, la presencia de fuentes de nitrógeno en la forma de péptidos y aminoácidos libres se propuso como el factor crucial para el mejoramiento de la supervivencia de las bifidobacterias. Por otro lado, Lucas y col. (2004) observaron que la adición de hidrolizados de caseína o de proteínas de suero a leche con lactobacilos y streptococos, disminuía el crecimiento de los lactobacilos probióticos debido probablemente a una gran estimulación de *S. thermophilus*, pero mejoraba su supervivencia durante el almacenamiento, lo que sugiere que se deben balancear estos efectos contrarios para obtener un resultado beneficioso. El estudio del crecimiento y actividad metabólica de probióticos en leche, condujo a la observación que *L. rhamnosus* GG fue incapaz de fermentar la lactosa y necesitó fructosa para crecer, mientras que *B. animalis* y *L. reuteri* solamente crecieron bien en leche adicionada de triptona (Østlie y col., 2003). Los oligosacáridos son importantes promotores del crecimiento de las bifidobacterias, ya que pueden incrementar el desarrollo de las mismas en el producto y en

el TGI, actuando como prebióticos (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001). Estos compuestos se agregan habitualmente a varios alimentos (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001, Stanton y col., 2001, Playne y col., 2003).

3.5- Recuento de bacterias probióticas en los productos

Se ha mencionado que el status probiótico de un alimento está dado fundamentalmente por la concentración de bacterias probióticas vivas (Sanders y Huis int`Veld, 1999). Consecuentemente, disponer de métodos adecuados para el recuento de las bacterias probióticas en los productos en los que se incorporan reviste una importancia fundamental (Stanton y col., 2003). Sin embargo, en los productos lácteos fermentados, especialmente en el queso, la presencia de varios grupos microbianos con similares características de crecimiento: bacterias lácticas del fermento primario, bacterias lácticas no pertenecientes al fermento o NSLAB por sus siglas en inglés (*non starter lactic acid bacteria*) y varias especies de probióticos, complica la situación. La enumeración selectiva o diferencial de las bacterias probióticas en el producto resulta, por lo tanto, difícil de lograr (Boylston y col., 2004). Asimismo, los métodos de recuento deben ser simples, para efectuar el seguimiento de la concentración probiótica en el alimento desde la elaboración hasta que son adquiridos por los consumidores (Roy y col., 1998, Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

La utilización de medios de cultivo selectivos y/o diferenciales, constituye la estrategia más ampliamente aceptada para cumplir con el objetivo de enumerar los probióticos en el alimento. Los medios selectivos permiten solamente el crecimiento del microorganismo de interés, inhibiendo otras bacterias presentes en la muestra (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001, Darukaradhya y col., 2006). Asimismo, la modificación de las condiciones de incubación puede conducir a un crecimiento selectivo (Boylston y col., 2004). Por otro lado, los medios diferenciales permiten una fácil identificación y diferenciación de las colonias de distintas bacterias, debido principalmente a su diferente apariencia (Vinderola y Reinheimer, 1999, Boylston y col., 2004).

Se han publicado numerosos trabajos sobre el desarrollo y selección de medios de cultivo para el recuento selectivo y diferencial de distintas bacterias probióticas y bacterias lácticas (Roy y col., 1998, Vinderola y Reinheimer, 1999 y 2000, Darukaradhya y col., 2006). Sin embargo, la gran cantidad de medios propuestos y utilizados en los distintos trabajos refleja la falta de una metodología estándar para esta tarea (Boylston y col., 2004). Una de las principales dificultades se debe a que los microorganismos presentes en

distintos productos son muy variados, por lo que los requerimientos de la técnica de recuento son diferentes en cada caso. Además, se han observado diferencias en la recuperación celular y en la morfología de las colonias en distintos medios (Vinderola y Reinheimer, 1999, Boylston y col., 2004). Por las razones expuestas, se revela la importancia de la realización de pruebas previas de crecimiento, diferenciación y recuperación celular de cultivos puros de las bacterias utilizadas en cada producto particular, para lograr un recuento satisfactorio en los mismos.

4- Quesos probióticos

4.1- Ventajas del queso como vehículo de bacterias probióticas

Los alimentos probióticos comerciales más abundantes están representados por las leches fermentadas. Sin embargo, y probablemente a causa de las condiciones ambientales en el alimento, se ha detectado que en algunos de estos productos probióticos la concentración de bacterias probióticas puede encontrarse por debajo de los niveles requeridos (Vinderola y col., 2000a, Vinderola y Reinheimer, 2000, Coeuret y col., 2004). Por esta razón, se ha emprendido el estudio de otras matrices alimentarias como vehículo de bacterias probióticas, con la finalidad de lograr una mejor supervivencia de las mismas. Numerosos tipos de quesos presentan ventajas como soporte de las bacterias probióticas con respecto a las leches fermentadas, debido fundamentalmente a su composición (Ross y col., 2002, Boylston y col., 2004). En primer lugar, el pH de los quesos, entre 4,8 y 5,6, es mayor que el de las leches fermentadas (3,7-4,3), siendo de este modo un medio menos perjudicial y más estable para la supervivencia de probióticos, sobre todo de aquellas cepas con baja tolerancia ácida (Boylston y col., 2004). Asimismo, se ha demostrado un mayor efecto buffer del queso que del yogur, ya que 5 g de queso incorporado a 10 mL de jugo gástrico incrementaron el pH de 2,0 a 4,74, mientras que 5 mL de yogur aumentaron el pH solamente hasta 3,65 (Gardiner y col., 1999b). Además, la matriz cerrada del queso y su contenido de materia grasa relativamente alto también generan un ambiente protector hacia la viabilidad bacteriana (Gardiner y col., 1998). Otro factor importante en la protección, sobre todo de bacterias anaerobias, está relacionado con el ambiente relativamente anaerobio de este alimento, ya que el metabolismo de las bacterias del fermento primario disminuye el potencial redox en muy poco tiempo luego de la elaboración (Boylston y col., 2004, Roy, 2005). Por otro lado, durante la elaboración y maduración del queso, la

producción de para- κ -caseína y demás productos de hidrólisis de las caseínas por el coagulante y la generación de péptidos medianos y pequeños por la actividad proteolítica del fermento primario han sido sugeridos como promotores del crecimiento de ciertos probióticos (Boylston y col., 2004).

Teniendo en cuenta estas características, el queso ha sido propuesto como un alimento más eficaz que los tradicionales productos lácteos fermentados fluidos para proteger la viabilidad probiótica, no sólo durante la elaboración y almacenamiento del producto durante largos períodos, sino también durante el pasaje a través del TGI (Ross y col., 2002). Por ejemplo, Stanton y col. (1998) encontraron una concentración similar de una cepa probiótica de *L. paracasei* en el contenido intestinal de cerdos de 14 días, a los cuales se les había administrado 10^{11} UFC de los lactobacilos probióticos en yogur y 10^8 - 10^9 UFC en queso Cheddar (madurado 5 meses). Asimismo, Gardiner y col. (1999b) han demostrado una mayor recuperación fecal de una cepa probiótica de *Enterococcus* cuando la misma fue administrada a cerdos en un queso Cheddar (madurado durante 15 meses) que en un yogur fresco. En estos trabajos se concluyó que el queso Cheddar era un alimento tanto o más adecuado que el yogur para ser utilizado como vehículo de bacterias probióticas.

Las tradicionales leches fermentadas son productos frescos cuyo consumo se produce al poco tiempo de la elaboración, en general dentro del mes de manufactura (Ross y col., 2002). En contraste a estos productos, los quesos son alimentos con un período de vida útil más prolongado, que puede variar de uno a varios meses, dependiendo del tipo de queso, fresco, blando, semiduro o duro (Heller y col., 2003). Teniendo en cuenta esta característica, el desarrollo de quesos probióticos debe garantizar el mantenimiento de la viabilidad probiótica durante todo el período de maduración o vida útil del alimento (Ross y col., 2002). Además, también resulta necesario considerar que la actividad bioquímica de los probióticos agregados al queso no debe influir negativamente en la composición, *flavour*, textura y otras características sensoriales del producto típico (Boylston y col., 2004).

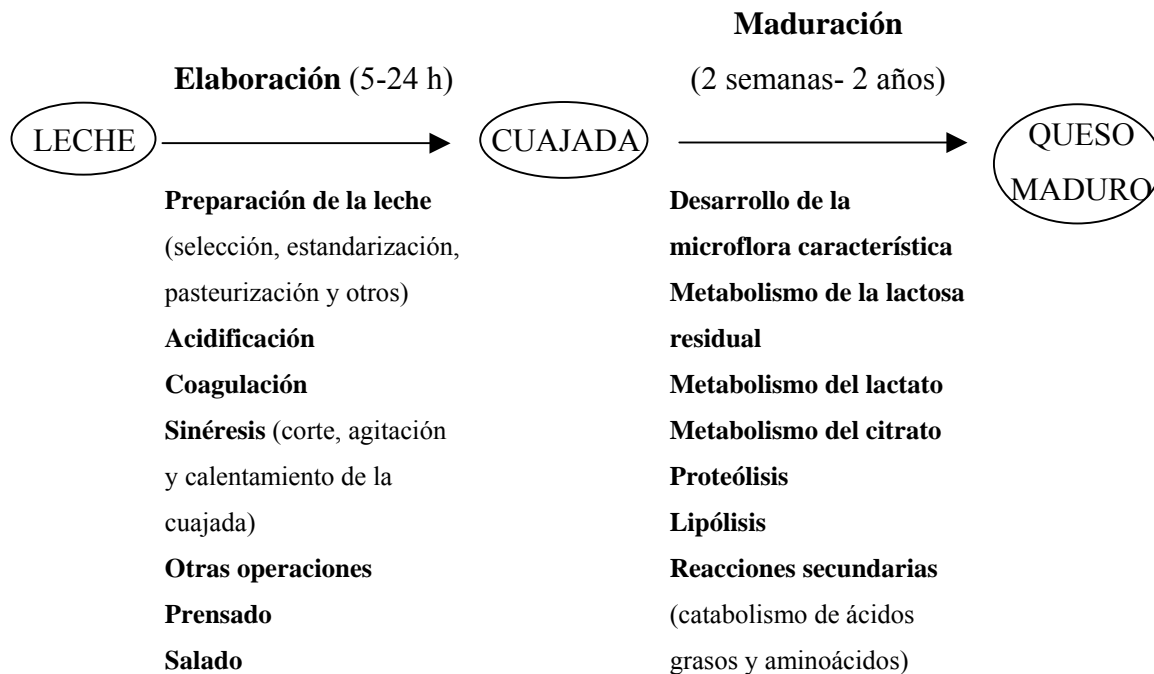
Finalmente, y a pesar de todas las ventajas del queso como vehículo de bacterias probióticas, se debe tener en cuenta que se trata de alimentos con alto contenido de sal y materia grasa, cuya ingesta diaria recomendada es relativamente baja. Por esta razón, la concentración de probióticos en el queso debería ser mayor que en las leches fermentadas, y su consumo restringido a personas sin problemas de hipertensión o cardiovasculares. Los quesos frescos podrían constituir una alternativa más versátil ya que su contenido de sal y

materia grasa pueden ser modulados con relativa facilidad. De todos modos, el desarrollo de quesos probióticos resulta una propuesta con grandes perspectivas, sobre todo en los países en los que el consumo de leches fermentadas es poco popular o para personas intolerantes a la lactosa (Heller y col., 2003).

4.2- Producción y maduración de quesos

La elaboración de quesos es básicamente un proceso de deshidratación, en el cual se produce una concentración (entre 6 a 12 veces) de la fracción grasa y proteica de la leche. Una de las etapas claves de este proceso es la coagulación de la caseína, que puede inducirse por acidificación, acidificación y calor, o mediante enzimas coagulantes, siendo esta última la metodología más común (Heller y col., 2003). A diferencia de la mayoría de los quesos coagulados por acidificación, que son consumidos inmediatamente luego de su elaboración, el proceso de producción de un queso coagulado enzimáticamente involucra dos etapas: elaboración y maduración (Figura 1).

Figura 1. Esquema general de producción de quesos coagulados enzimáticamente (Fox y McSweeney, 2004).



La composición de la leche y las operaciones del proceso de elaboración determinan la naturaleza y calidad del producto final, pero es durante la maduración que se desarrollan las características típicas del queso (Fox y McSweeney, 2004).

La maduración del queso es el proceso por el cual la cuajada, que tiene pobres características reológicas y sensoriales, se transforma en queso maduro, un producto muypreciado por sus buenas y diversas características de textura, aroma y sabor (Zalazar y col., 2004). Esta transformación se produce debido a que en la matriz del queso ocurren una muy compleja serie de reacciones bioquímicas, que pueden ser clasificadas como primarias y secundarias. Las primeras involucran el metabolismo de la lactosa residual, del citrato y del lactato, la lipólisis y la proteólisis, mientras que las segundas incluyen el metabolismo de los aminoácidos y ácidos grasos. Los cambios bioquímicos primarios son responsables principalmente de la textura y funcionalidad, mientras que los cambios secundarios tienen un papel fundamental en el desarrollo del *flavour* a través de la generación de gran cantidad de compuestos volátiles por modificaciones de los productos de las reacciones primarias (Fox, 2003, McSweeney, 2004a). Además de estas transformaciones enzimáticas, durante la maduración ocurren también procesos de naturaleza física, como la difusión de la sal y la evaporación del agua (Zalazar y col., 2004).

Los agentes responsables de las reacciones bioquímicas son enzimas de distinto origen (Fox y McSweeney, 2004):

- ❖ enzimas nativas de la leche,
- ❖ coagulante utilizado para la producción del queso,
- ❖ fermento primario,
- ❖ bacterias no pertenecientes al fermento o NSLAB, cuya presencia se debe a su supervivencia a la pasteurización o la contaminación posterior de la leche,
- ❖ fermento secundario o adjunto, utilizados para la producción de ciertos tipos de quesos, por ejemplo bacterias propiónicas en quesos suizos y ciertos hongos (*Penicillium roqueforti* y *P. camemberti*) en queso azul, Camembert y Brie. En este grupo también estarían incluidas las enzimas de fermentos lácticos adjuntos utilizados para mejorar el *flavour* del producto o acelerar el proceso de maduración, y de los fermentos probióticos.

Además de los agentes nombrados, es importante destacar que los microorganismos indeseables o sus enzimas, provenientes de contaminaciones o de una mala calidad de la leche, como clostridios o bacterias psicotrofas, pueden tener una gran influencia negativa en la maduración (Walstra y col., 1999b).

La influencia de cada una de estas enzimas dependerá de su concentración, y de las condiciones presentes en el medio ambiente del queso, que tienen gran impacto sobre la

actividad enzimática, como pH, contenido de cloruro de sodio, temperatura de maduración y contenido de agua (Walstra y col., 1999b).

4.2.1- Metabolismo de la lactosa, del lactato y del citrato

Durante la elaboración del queso, el fermento primario transforma la lactosa a ácido láctico, previo desdoblamiento en los monosacáridos glucosa y galactosa, lo que constituye su principal función tecnológica. Esta acidificación es esencial para la producción del queso, ya que favorece la coagulación y el desuerado, previene el crecimiento de microorganismos indeseables, e influye en la textura, modificando el grado de desmineralización de la caseína, y su susceptibilidad a las proteasas (Menéndez y col., 1999, Zalazar y col., 2004). La mayor parte de la lactosa se pierde en el suero como tal o como ácido láctico, permaneciendo solamente 1-2% de lactosa en la cuajada fresca, la cual en pocas horas es metabolizada principalmente por el fermento primario, y posiblemente también por las NSLAB (McSweeney, 2004a y 2004b). El L-lactato es el isómero producido mayoritariamente por el fermento láctico a partir de la lactosa. Las NSLAB pueden inducir la racemización del L-lactato a D-lactato, y en menor medida, producir D-lactato directamente. El D-lactato es menos soluble que su isómero L, y puede formar cristales insolubles de lactato de calcio, cuya presencia no afecta el *flavour* del queso, pero puede influir en la aceptación por parte del consumidor (McSweeney y Fox, 2004, McSweeney, 2004b). En algunas variedades de queso como el Gouda y el Edam, en los que se utilizan fermentos primarios heterofermentantes, la lactosa es convertida en un 50% a ácido láctico y el otro 50% es metabolizado a acetato, etanol y CO₂ (McSweeney, 2004b, Zalazar y col., 2004). El lactato puede constituir un sustrato importante para subsiguientes reacciones bioquímicas, como en el caso de quesos con bacterias propiónicas (Emmental, Gruyère), o con hongos (azules, Brie, Camembert) (McSweeney, 2004a).

Al igual que la lactosa, un gran porcentaje del citrato (94%) se pierde en el suero durante la elaboración. La pequeña cantidad de citrato remanente en la cuajada es metabolizada por fermentos mesófilos citrato positivos, como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Leuconostoc* spp., que son utilizados en quesos tipo Dutch, como Gouda y Edam, produciendo diacetilo, acetoina, acetato y CO₂, responsables del *flavour* y los pequeños ojos característicos de estas variedades (Fox, 2003).

4.2.2- Lipólisis

La degradación de los lípidos en el queso es producida principalmente por vía hidrolítica, ya que la vía oxidativa no es importante debido al bajo potencial redox del producto (McSweeney, 2004b). Este proceso es limitado en la mayoría de los quesos, siendo importante únicamente para dos familias de quesos: los quesos azules y los quesos duros de pasta cocida.

Los agentes lipolíticos que pueden estar presentes en el queso son las lipasas que acompañan a ciertos coagulantes, la lipasa nativa de la leche y enzimas lipolíticas microbianas. El cuajo en pasta de cabrito o cordero, que se utiliza en la producción de los quesos italianos Pecorino y Provolone, contiene una lipasa pregástrica específica de ácidos grasos (AG) de cadena corta esterificados en posición sn-3. En la leche, se encuentra la lipoproteína lipasa, enzima nativa muy sensible al calor y que se desnaturaliza casi por completo en la pasteurización. Por esta razón, su actividad, que es preferencial hacia AG de cadena mediana en posición sn-1 y sn-3, probablemente sólo sea importante en quesos elaborados con leche cruda, como el Parmigiano Reggiano. Dentro de las enzimas microbianas, las lipasas de *Penicillium roqueforti* han demostrado ser muy potentes, generando una extensiva lipólisis en los quesos azules. Otros microorganismos con activas lipasas son *P. camemberti* y microorganismos presentes en los quesos madurados en superficie como *Brevibacterium linens* y *Geotrichum candidum*. Las bacterias lácticas poseen una actividad lipolítica débil pero cuantificable, y esta acción sobre los triglicéridos puede ser observada en algunos quesos sin otras lipasas más potentes y con un tiempo de maduración prolongado (Fox, 2003, McSweeney, 2004a y b).

Los AG producidos en la lipólisis tienen una influencia directa sobre el *flavour*, sobre todo los AG volátiles de cadena corta. Además, son precursores de compuestos de *flavour*, producidos por transformaciones posteriores (esterificación, beta-oxidación, decarboxilación), en las que se producen ésteres, tioésteres, lactonas, metilcetonas, aldehídos y alcoholes (Fox, 2003).

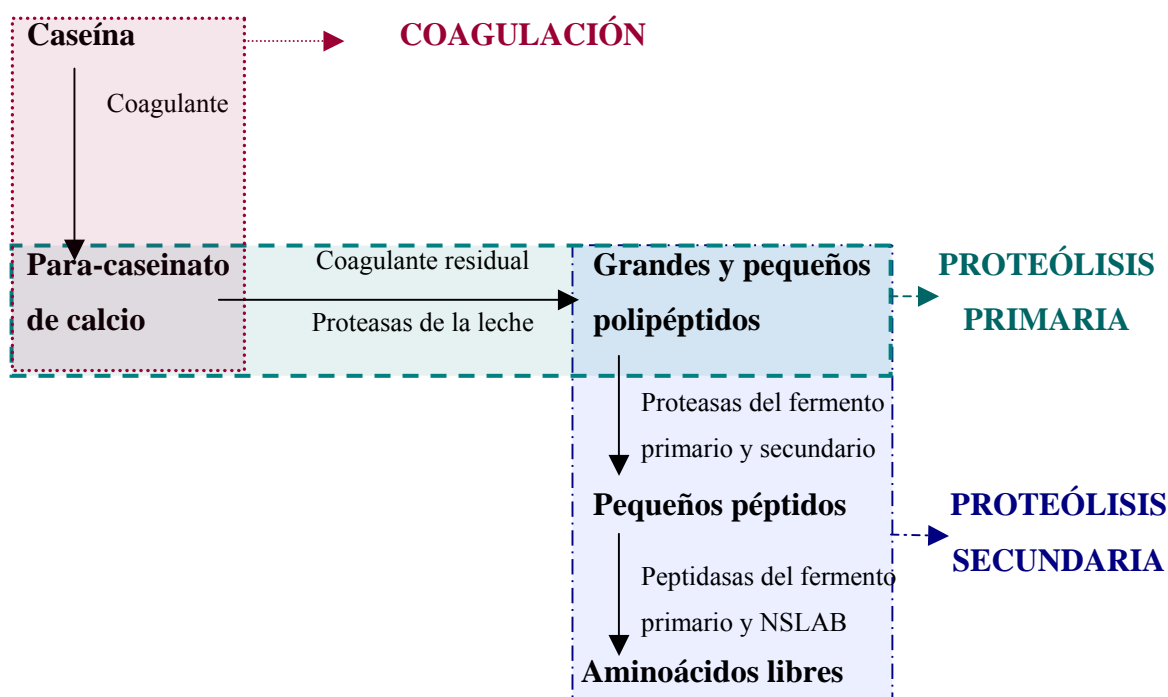
4.2.3- Proteólisis

Durante la maduración de quesos, el complejo conjunto de reacciones que involucra la degradación de proteínas a péptidos de diversos tamaños y aminoácidos libres se denomina proteólisis, siendo la transformación bioquímica primaria más importante en la mayoría de las variedades de queso. La importancia de la proteólisis está dada por su influencia en el desarrollo de textura y *flavour* del producto terminado. La degradación de

la matriz proteica, y la formación de nuevos grupos amino y carboxilo (ionizados al pH del queso) determinan la interacción proteína-agua e influyen en la textura del queso maduro. Asimismo, el aumento de pH originado por la liberación de amoníaco durante la proteólisis influye indirectamente en la textura. Por otro lado, la producción de péptidos cortos y aminoácidos libres, algunos de los cuales presentan sabor característico, son importantes en el *flavour* del producto, participando sobre todo en el sabor de fondo del queso. Además, la proteólisis favorece que durante la masticación se liberen compuestos sápidos de la matriz del queso (Fox, 2003, McSweeney, 2004b, Upadhyay y col., 2004). Recientemente, diversos estudios han demostrado que la influencia más importante de la proteólisis en el desarrollo del *flavour* del queso es indirecta y radica en la producción de aminoácidos libres, precursores por excelencia de compuestos de aroma y sabor. En efecto, la evidencia más reciente indica que el catabolismo de los aminoácidos libres por las bacterias lácticas del fermento y las NSLAB para dar compuestos tales como ácidos carboxílicos, ésteres, alcoholes, cetonas y tioésteres, es el conjunto de reacciones que determina el aroma y sabor de la mayor parte de los quesos (Wallace y Fox, 1996, Yvon y Rijnen, 2001, McSweeney, 2004b).

La proteólisis es catalizada por proteasas y peptidasas de diverso origen: coagulante, enzimas nativas de la leche y microbianas, cuya actividad depende del tipo de queso. En términos generales, la proteólisis en quesos puede ser esquematizada de la siguiente forma:

Figura 2. Esquema del proceso de proteólisis en quesos durante la maduración.



La coagulación enzimática de la leche, que tiene lugar durante la elaboración del queso, comprende la hidrólisis de la κ -caseína en el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ por la quimosina (coagulante), con la consiguiente producción de para- κ -caseína (κ -caseína f1-105) y caseínomacropéptido (κ -caseína f106-169). Dicha reacción constituye el inicio de la proteólisis en el queso y posibilita su obtención (Hynes, 1998, Upadhyay y col., 2004). Posteriormente, la proteólisis continúa más lentamente durante la maduración, como un proceso de cascada, actuando sucesivamente diferentes agentes proteolíticos sobre las caseínas enteras y sobre los distintos productos generados. Generalmente, el coagulante residual y las enzimas nativas de la leche actúan en primer lugar, hidrolizando las caseínas enteras en polipéptidos grandes y pequeños. Luego, se verifica la acción de las proteasas del fermento sobre estos productos produciendo péptidos pequeños o medianos. Finalmente, los péptidos son transformados a otros más pequeños o a aminoácidos libres por parte de las peptidasas del fermento primario o de las NSLAB (Sousa y col., 2001, Fox, 2003, McSweeney, 2004a y b).

Coagulante

La proporción de enzima coagulante que se retiene activa en la cuajada varía entre 0-30%, dependiendo del proceso de elaboración del queso (pH del desuerado, temperatura de cocción, humedad de la cuajada) y del tipo de enzima. Sin embargo, se ha demostrado que esta cantidad relativamente baja es responsable de la proteólisis primaria durante la maduración de la mayoría de los quesos, excepto los de pasta cocida (Lane y Fox, 1996, Mcsweeney, 2004a, Upadhyay y col., 2004, O'Mahony y col., 2005). La acción de la quimosina (EC. 3.4.23.4), el coagulante más ampliamente utilizado, sobre las distintas caseínas, ha sido estudiada, tanto en solución como *in situ*. La proteína más susceptible al ataque de esta enzima es la α_{s1} -caseína, siendo el principal sitio de ataque el enlace Phe₂₃-Phe₂₄, con la consiguiente producción de los péptidos α_{s1} (f1-23) y α_{s1} -I (f24-199). El primer péptido, más pequeño y soluble en agua, se degrada rápidamente por acción de las enzimas del fermento. El segundo péptido, insoluble en agua, es nuevamente atacado por la quimosina, en el enlace Leu₁₀₁-Lys₁₀₂ (Fox, 2003, McSweeney, 2004a). Además de los nombrados, existen otros sitios de corte de la quimosina sobre la caseína, que producen diversos péptidos medianos y pequeños. La velocidad de acción de la quimosina sobre la α_{s1} -caseína depende del pH y de la fuerza iónica del medio (Upadhyay y col., 2004). El pH óptimo de acción es 5,00 y concentraciones moderadas de sal, hasta 4%, incrementan la

hidrólisis de la α_{s1} -caseína por la quimosina, mientras que concentraciones mayores disminuyen su actividad. (Walstra y col., 1999b).

Con respecto a la β -caseína, si bien existen en su cadena polipeptídica en solución siete sitios de ataque por parte de la quimosina, la misma ha demostrado ser bastante resistente al ataque del coagulante en el queso (Fox y McSweeney, 1998a, Fox, 2003). La resistencia probablemente se deba a interacciones hidrofóbicas intra o intermoleculares entre residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal de la β -caseína que se ven favorecidos en el medio ambiente del queso. Dichas interacciones podrían bloquear los sitios de ataque específicos de la quimosina, lo que no deja de constituir una ventaja, ya que los péptidos resultantes de la acción de la quimosina sobre la β -caseína son generalmente hidrofóbicos y muchos poseen sabor amargo, lo que podría influir negativamente en el *flavour* del queso (Fox, 2003, McSweeney, 2004a).

La α_{s2} -caseína es bastante resistente a la hidrólisis por la quimosina, restringiéndose los sitios de ataque a la región hidrofóbica de la molécula. Asimismo, la para- κ -caseína es resistente a esta enzima, probablemente debido a su alto nivel de estructura secundaria (McSweeney, 2004a, Upadhyay y col., 2004).

Plasmina

La plasmina (EC. 3.4.21.7) constituye la enzima proteolítica nativa de la leche más importante. Es una proteasa alcalina, cuyo valor de pH y temperatura óptimos son 7,50 y 37°C. La plasmina, su precursor inactivo (plasminógeno) y el activador del plasminógeno se encuentran asociados a la micela de caseína y quedan mayoritariamente retenidos en la cuajada (McSweeney, 2004a, Zalazar y col., 2004). Los productos resultantes de la acción de la plasmina sobre las caseínas son péptidos grandes e intermedios (Upadhyay y col., 2004). En el queso, la influencia de la plasmina se considera generalmente limitada, siendo responsable de la hidrólisis de la β -caseína en la mayoría de los quesos madurados por bacterias lácticas. Sin embargo, su actividad cobra importancia en algunos quesos, dependiendo fundamentalmente de la temperatura de cocción y del pH durante la maduración (Fox, 2003). Las tecnologías de elaboración de quesos que incluyen una etapa de calentamiento a elevada temperatura favorecen la acción de la plasmina durante la maduración. Esto se debe, por un lado, al menor impacto de la quimosina, y, por otro lado, a una serie de modificaciones en el sistema plasmina-plasminógeno que se traduce en un incremento final de la actividad de la proteasa (Visser, 1993, Upadhyay y col., 2004).

La especificidad de acción de esta enzima es sobre uniones del tipo Lys-X y, en menor medida Arg-X, y actúa preferentemente sobre las caseínas β y α_{s2} , y en menor medida sobre α_{s1} . La κ -caseína es resistente a la acción de la plasmina. En la β -caseína existen varios sitios de corte de la plasmina, pero en quesos solamente tres enlaces son hidrolizados en forma significativa: Lys₂₈-Lys₂₉, Lys₁₀₅-His₁₀₆ y Lys₁₀₇-Glu₁₀₈. Como resultado de esta acción se producen las γ -caseínas: γ_1 -caseína (β -caseína f29-209), γ_2 -caseína (β -caseína f106-209), γ_3 -caseína (β -caseína f108-209), y componentes de la fracción proteosa-peptona (PP): PP8 rápida (β -caseína f1-28), PP8 lenta (β -caseína f29-105 y β -caseína f29-107), y PP5 (β -caseína f1-105 y β -caseína f1-107) (McSweeney, 2004a, Upadhyay y col., 2004). La α_{s2} -caseína exhibe varios sitios de corte de la plasmina, y su disminución durante la maduración probablemente sea debida a la acción de esta enzima. La α_{s1} -caseína también es susceptible de ser hidrolizada, pero a una velocidad mucho menor que la β -caseína, siendo probablemente la λ -caseína el producto de esta degradación (Upadhyay y col., 2004).

En leche también existen otras proteasas minoritarias, siendo la catepsina D, una proteasa ácida, una de las más estudiadas. Su acción sobre la α_{s1} -caseína es muy similar a la del coagulante, por lo que su influencia en quesos ha sido muy difícil de elucidar. La catepsina D está presente en el suero, por lo que gran parte se pierde durante la elaboración, y además es relativamente termosensible. Por estas razones, la importancia de esta enzima en la proteólisis durante la maduración se ha relativizado especialmente en quesos donde está presente la enzima coagulante (Sousa y col., 2001).

Enzimas microbianas

Los microorganismos capaces de influir en el proceso de proteólisis incluyen los pertenecientes al fermento primario, al fermento secundario o adjunto, y a las NSLAB.

Los fermentos secundarios no lácticos utilizados en quesos suizos y azules por ejemplo, tienen una gran importancia en el proceso de proteólisis de los quesos en los que se los utilizan (Sousa y col., 2001). Sin embargo, sus particularidades no se aplican a los quesos madurados internamente con bacterias lácticas, como los del presente trabajo, y no se describirán.

En la mayor parte de las variedades de quesos argentinos, las enzimas proteolíticas de origen microbiano provienen de bacterias lácticas, ya sea del fermento o NSLAB. La actividad proteolítica del fermento es considerada primordial en la proteólisis secundaria, en todos los quesos madurados sin hongos ni una flora superficial. Si bien las bacterias

lácticas son consideradas poco proteolíticas comparadas con otras bacterias, tienen un sistema proteolítico bastante completo, el cual les sirve para cumplir con sus exigentes requerimientos nutricionales de aminoácidos (Kok y de Vos, 1994, Steele, 1998, Sousa y col., 2001).

El sistema proteolítico de las bacterias lácticas es muy importante en el desarrollo de productos lácteos fermentados, ya que por un lado les permite crecer y acidificar en leche y por otro, contribuir al desarrollo de las propiedades organolépticas del producto (Gripon, 1994, Monnet y Gripon, 1997, Savijoki y col., 2006). El sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* ha sido objeto de numerosos y detallados estudios, mientras que las capacidades proteolíticas y peptidolíticas de otras bacterias lácticas son menos conocidas (Kok y de Vos, 1994). Sin embargo, diversos trabajos sobre lactobacilos sugieren que su equipo enzimático es similar al de los lactococos (Kok y de Vos, 1994, Steele, 1998).

En general, el sistema proteolítico de las bacterias lácticas está conformado por proteasas, que en su gran mayoría son extracelulares y se hallan unidas a la pared celular, sistemas de transporte de oligopéptidos y aminoácidos al interior celular y diversas peptidasas intracelulares (Kok y de Vos, 1994, Steele, 1998).

Proteasas: las proteasas unidas a la pared celular, denominadas lactocepinas, CEP (por sus siglas en inglés: cell-envelope proteinase), o Prt, son capaces de degradar proteínas, sobre todo hidrofóbicas como las caseínas, en oligopéptidos (Savijoki y col., 2006). En los lactococos, la CEP se encuentra generalmente codificada en plásmidos, los cuales pueden perderse fácilmente dando lugar a la existencia de cepas proteasa-negativas (Vassal, 1996). Por el contrario, la proteasa de pared en los lactobacilos es codificada en el genoma (Savijoki y col., 2006). Las lactocepinas han sido clasificadas en dos grupos según su especificidad hacia las caseínas: P_I, que degrada rápidamente la β -caseína, y muy lentamente la α_{s1} y la κ -caseína, y P_{III}, que hidroliza la β -caseína en forma diferente a la P_I y actúa rápidamente sobre la α_{s1} y κ -caseína (Visser, 1993, Kok y de Vos, 1994, Monnet y Gripon, 1997, Savijoki y col., 2006). En estudios posteriores, se detectaron lactocepinas tipo P_I/P_{III}, con especificidades intermedias a las nombradas, y se propuso otro esquema de clasificación según la especificidad de hidrólisis sobre el péptido α_{s1} (f1-23) (Kok y de Vos, 1994, Savijoki y col., 2006). Aparte de las lactocepinas, también se han detectado algunas proteasas intracelulares y de membrana, cuyo rol en la maduración no es conocido pero solamente podrían intervenir luego de su liberación por lisis celular (Visser, 1993).

Luego de la acción de las lactocepinas, los oligopéptidos resultantes pueden ser hidrolizados por las peptidasas intracelulares (Gripon, 1994, Kok y de Vos, 1994, Axelson,

1998, Christensen y col., 1999). Estas enzimas actúan sobre el sustrato luego de la internalización del mismo a través de diversos sistemas de transporte, capaces de introducir al interior celular péptidos de diverso tamaño (de 2 a 18 aminoácidos), y con distintas propiedades de hidrofobicidad (Savijoki y col., 2006). Las bacterias lácticas presentan gran número de peptidasas que pueden ser clasificadas de la siguiente manera:

Endopeptidasas: estas enzimas hidrolizan una unión interna dentro de la cadena polipeptídica (Khalid y Marth, 1990a, Upadhyay y col., 2004). Se han detectado tres tipos de oligoendopeptidasas en bacterias lácticas: PepO, PepF y PepE, clasificadas de acuerdo a la especificidad de sustrato (Monnet y Gripon, 1997, Upadhyay y col., 2004). Estas enzimas no pueden degradar caseínas intactas, pero sí péptidos más pequeños derivados de las mismas, de hasta 35 residuos (Christensen y col., 1999, Savijoki y col., 2006).

Exopeptidasas: son aquellas que liberan al mismo tiempo uno o dos residuos de aminoácidos del extremo de péptidos cortos (Khalid y Marth, 1990a, Upadhyay y col., 2004). Todas catalizan la hidrólisis de aminoácidos o péptidos desde el extremo N-terminal, excepto las carboxipeptidasas.

Di y tripeptidasas: dipeptidasas como PepV y PepD y tripeptidasas como PepT pueden hidrolizar di y tripéptidos con una muy amplia especificidad, con algunas excepciones, por ejemplo ciertos péptidos que contienen prolina (Christensen y col., 1999, Upadhyay y col., 2004).

Aminopeptidasas: hidrolizan el aminoácido N-terminal, con diferente especificidad que depende del tamaño del péptido original y de las características del residuo terminal (Savijoki y col., 2006). Existe una aminopeptidasa de amplia especificidad, PepN, que hidroliza preferentemente aminoácidos básicos o hidrofóbicos/no cargados, y, por lo tanto, resulta potencialmente importante para la transformación de péptidos amargos en no amargos (Upadhyay y col., 2004). Otra aminopeptidasa con una muy amplia especificidad es PepC, que hidroliza aminoácidos básicos, ácidos, hidrofóbicos/no cargados y aromáticos, y además puede degradar di y tripéptidos (Christensen y col., 1999). Por otra parte, PepA hidroliza péptidos de 2 hasta 10 aminoácidos con una especificidad muy estrecha hacia residuos terminales ácidos, como glutámico y aspártico, y PepL ataca preferentemente di y algunos tripéptidos con leucina en el extremo N-terminal (Upadhyay y col., 2004). La piroglutamil aminopeptidasa (o peptidasa carboxil pirrolidona, PCP), es extremadamente específica ya que hidroliza un residuo de ácido piroglutámico, que se genera por ciclación de glutamina en el extremo N-terminal (Monnet y Gripon, 1997).

Peptidasas específicas de prolina: las caseínas muestran una proporción relativamente importante de prolina, un aminoácido que debido a su estructura cíclica influye en la conformación espacial de la cadena polipeptídica (Fox y McSweeney, 1998b). Las bacterias lácticas han evolucionado hasta disponer de una variedad de peptidasas específicas de péptidos que contienen prolina (Kok y de Vos, 1994). La aminopeptidasa dipeptidil X-prolil (PepX) libera dipéptidos X-Pro del extremo N-terminal, y en algunos casos también X-Ala. La prolina iminopeptidasa (PepI) hidroliza la prolina terminal de di, tri y oligopéptidos, mientras que la aminopeptidasa PepP libera el aminoácido terminal de péptidos con la secuencia X-Pro-Pro-X_n y X-Pro-X_n. Por último, existen dos dipeptidasas específicas de prolina: prolinasa (PepR) y prolidasa (PepQ), que hidrolizan dipéptidos con la secuencia Pro-X y X-Pro, respectivamente (Upadhyay y col., 2004).

Carboxipeptidasas: si bien aún no se han purificado enzimas que hidrolicen el extremo C-terminal de péptidos (Monnet y Gripon, 1997, Savijoki y col., 2006), se ha encontrado cierta actividad carboxipeptidasa en algunas bacterias lácticas, sobre todo lactobacilos (Gripon, 1994, Macedo y col., 2000).

Se ha verificado que algunas bacterias lácticas son capaces de regular su sistema proteolítico, probablemente a nivel transcripcional, de acuerdo a la composición de nitrógeno del medio de crecimiento. Un medio rico en aminoácidos y péptidos pequeños genera una menor producción de las enzimas y transportadores que componen el sistema proteolítico (Gilbert y col., 1997, Monnet y Gripon, 1997, Savijoki y col., 2006).

Actividad proteolítica de especies bacterianas utilizadas como probióticos

Existen diversos estudios sobre las capacidades enzimáticas de los lactobacilos mesófilos, que forman parte de las NSLAB, o son utilizados habitualmente como adjuntos. Entre ellos, los lactobacilos del grupo de *Lactobacillus casei* constituyen uno de los grupos microbianos más frecuentemente utilizado como probiótico. En varios trabajos se ha determinado la existencia de un amplio rango y diversos niveles de actividad de proteasas y peptidasas (amino, di y tripeptidasas, peptidasas específicas de prolina) en lactobacilos, entre los cuales había cepas del grupo de *L. casei*. Los perfiles y actividades enzimáticas, que constituyen uno de los parámetros utilizados para la selección de bacterias para su uso como adjuntos, presentaron diferencias entre especies y cepas (Arora y Lee, 1990, Khalid y Marth, 1990b, Peterson y col., 1990, Habibi-Najafi y Lee, 1994, Williams y Banks, 1997). Además, los resultados de diversos autores coincidieron en que las cepas del grupo de *L. casei* poseían una alta actividad hidrolítica sobre péptidos hidrofóbicos, lo cual resulta

favorable desde el punto de vista de su utilización en quesos ya que disminuye la cantidad de compuestos nitrogenados amargos (Peterson y col., 1990, Macedo y col., 2000). Es generalmente aceptado que los lactobacilos mesófilos tienen un sistema proteolítico más limitado que las especies termófilas, ya que, a diferencia de éstos, crecen bien en leche solamente cuando es suplementada con aminoácidos y péptidos (Fox, 2003, Upadhyay y col., 2004). Gilbert y col. (1997) demostraron una menor actividad caseinolítica y peptidolítica de una cepa de *L. casei* con respecto a tres cepas de lactobacilos termófilos. Por otro lado, Macedo y col. (2000) observaron una mayor actividad peptidasa (amino y dipeptidasa y prolidasa y prolinasa) de una cepa de *L. paracasei* subsp. *paracasei* con respecto a cepas de lactococos, leuconostoc y enterococos. *L. paracasei* fue menos específica en su acción peptidolítica, pero más activa que el lactococo. En este trabajo, también fue detectada una cierta actividad carboxipeptidasa en todas las cepas estudiadas.

Con respecto a *L. acidophilus*, otra de las cepas utilizadas como probiótico, Shihata y Shah (2000), han reportado actividad proteolítica en la mayoría (12 de un total de 14) de las cepas estudiadas, así como una alta actividad peptidolítica (amino, di y tripeptidasa). Asimismo, la presencia de proteasas intracelulares, aminopeptidasas, dipeptidasas, X-prolil dipeptidil aminopeptidasa, ha sido citada para cepas de *L. acidophilus* (Khalil y Marth, 1990a, Upadhyay y col., 2004).

El sistema proteolítico de bifidobacterias, por otro lado, ha sido menos estudiado. Generalmente, su dificultad de crecimiento en leche ha sido asociada a una escasa actividad proteolítica (Boyslton y col., 2004). Shihata y Shah (2000) comprobaron la ausencia de actividad proteolítica en 10 cepas, de un total de 12 estudiadas, lo que diferenció claramente a las bifidobacterias de las bacterias lácticas ensayadas en dicho estudio. En cuanto a la acción peptidolítica, se detectaron niveles elevados de varias peptidasas (aminopeptidasa, dipeptidasa, tripeptidasa) en algunas especies de bifidobacterias (Desjardins y col., 1990a, Shihata y Shah, 2000). Asimismo, Abu-Tarabousch y col. (1998) detectaron diferentes niveles de actividad proteolítica, medida por el incremento de grupos amino libre, en varias especies de bifidobacterias desarrolladas en leche de vaca y camello fermentada y no-fermentada. En general, la mayor actividad se observó en leche de camello, probablemente por la mayor disponibilidad de péptidos.

Rol de las enzimas microbianas en la proteólisis del queso

Si bien el rol fisiológico de las lactocepinas es producir oligopéptidos a partir de las caseínas intactas, en el queso estas enzimas actúan mayormente sobre los péptidos generados por la acción del coagulante y la plasmina a partir de la α_{s1} y β -caseína (McSweeney, 2004a). Varios autores han estudiado el rol de la proteasa de pared en la composición y calidad del queso elaborando productos con fermento Prt⁺ o Prt⁻. El principal rol de la proteasa de pared en la maduración ha demostrado ser la producción de compuestos nitrogenados menores, que a su vez, son sustratos de las peptidasas. La Prt tuvo además un efecto positivo en el *flavour* del queso (Law y col., 1993, Lane y Fox, 1996). Law y col. (1993) observaron que el nivel de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular fue menor en los quesos con bacterias Prt⁻, debido probablemente a la menor cantidad de sustratos disponibles para la acción de las peptidasas. Varios de los péptidos generados por las lactocepinas son hidrofóbicos y potencialmente amargos, y pueden generar este sabor defectuoso en el queso (Gripon, 1994, Monnet y Gripon, 1997), sobre todo cuando su actividad no está equilibrada con la acción de diversas peptidasas con acción “*debbitering*”, es decir de transformación de péptidos amargos a no amargos (Steele, 1998, Fox, 2003). Las lactocepinas tipo P_I hidrolizan la β -caseína en forma similar a la quimosina (Visser, 1993), y han sido más comúnmente ligadas a la producción de péptidos amargos que las P_{III} (Monnet y Gripon, 1997).

Posteriormente a la acción de las proteasas, actúan las peptidasas intracelulares. El contacto entre los sustratos (péptidos), y las peptidasas endocelulares puede producirse de dos maneras diferentes. Por un lado, es posible que los péptidos sean internalizados en la célula, ya sea por difusión, o a través de los sistemas de transporte (Monnet y Gripon, 1997). Este último mecanismo necesita energía, que normalmente se obtiene a partir de los hidratos de carbono, un recurso escaso en el queso (Walstra y col., 1999b). Por otro lado, existe abundante evidencia de que las peptidasas intracelulares se ponen en contacto con su sustrato principalmente luego de la muerte y lisis celular, lo cual garantiza la accesibilidad a los sustratos (Gripon, 1994, Walstra y col., 1999b, Upadhyay y col., 2004, Savijoki y col., 2006). Es importante destacar que la autólisis es considerada un hecho muy importante para que los fermentos lácticos primarios o adjuntos demuestren un impacto significativo en la proteólisis secundaria (Madkor y col., 1999, 2000a y 2000b, Hannon y col., 2003). Sin embargo, se suele acordar en que un adecuado balance de células vivas, muertas y que sufrieron lisis es la mejor situación para el desarrollo de aroma y sabor en el queso (Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

La importancia de las bacterias lácticas en la hidrólisis de caseína y péptidos también ha sido estudiada mediante ensayos donde quesos acidificados químicamente eran comparados con quesos testigo con fermento. También existen numerosos trabajos que estudian productos elaborados utilizando diferentes starters. Los resultados obtenidos han evidenciado que las bacterias lácticas ejercen gran influencia en la proteólisis secundaria, ya que producen mayormente compuestos nitrogenados pequeños. Esta acción se demuestra fundamentalmente por el incremento de los aminoácidos libres, y en los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC (Lane y col., 1995, Lynch y col., 1997, Hynes y col., 2001, Hynes y col., 2003a). Además, tal contribución se ve reflejada en un leve aumento de la cantidad de nitrógeno soluble, cambio que resulta por el contrario importante desde el punto de vista cualitativo, ya que se incrementan los compuestos de menor tamaño (Gripon, 1994).

Similarmente, algunas cepas de lactobacilos utilizados como fermentos adjuntos han generado un aumento en la cantidad total y modificaciones en el perfil de aminoácidos libres, siendo este hecho más notorio cuando se estudió su efecto en ausencia del fermento primario (Lane y col., 1995, Lynch y col., 1996 y 1997, Hynes y col., 2003a y c, DiCagno y col., 2006).

Asimismo, se ha demostrado que la interacción entre fermentos primario y adjunto puede influir en la proteólisis, ya que se observó un incremento de aminoácidos libres provocado por lactobacilos pero que fue dependiente del starter utilizado (Hynes y col., 2001, 2002 y 2003a). También es importante considerar la estabilidad de las enzimas microbianas en el medio ambiente del queso, el cual puede generar una inhibición de las mismas (Laan y col., 1998, Madkor y col., 1999). Por último, el agregado de lactobacilos adjuntos ha sido asociado a un incremento del *flavour* en quesos o sistemas modelo de quesos *via* el catabolismo de los aminoácidos (Lynch y col., 1996, Madkor y col., 1999, Hynes y col., 2003a, Thage y col., 2005). Sin embargo, también ha sido demostrada para algunas cepas una influencia negativa por la producción de *off-flavours* (Antonsson y col., 2003).

4.3- Antecedentes de desarrollo de quesos probióticos

Existen estudios previos sobre la incorporación de bacterias probióticas en diferentes tipos de quesos. Entre ellos, la variedad más ampliamente utilizada como modelo de estudio ha sido el queso Cheddar, un queso duro de pasta semicocida muy popular en Europa anglosajona, Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda (Dinakar y Mistry, 1994,

Gardiner y col., 1998, 1999a, 1999b y 2002, Stanton y col., 1998, Daigle y col., 1999, McBrearty y col., 2001, Darukaradhya y col., 2006, Ong y col. 2006 y 2007, Phillips y col., 2006). Otras variedades de queso, utilizados para el desarrollo de quesos probióticos han sido: quesos frescos como Cottage (Blanchette y col., 1996, O'Riordan y Fitzgerald, 1998), Crescenza (Gobbetti y col., 1998), y otros (Roy y col., 1998, Vinderola y col., 2000b, Buriti y col., 2005), y quesos semiduros como Gouda (Gomes y col., 1995 y 1998b), Pikantne (madurado en superficie) (Songisepp y col., 2004), y queso turco blanco (Feta) (Kasimoğlu y col., 2004). También existen antecedentes sobre variedades elaboradas con leche de oveja, como Canestrato Pugliese (Corbo y col., 2001), leche de búfala, como Kariesh (Murad y col., 1998) y Tallaga (El-Zayat y Osman, 2001), y leche de cabra (Gomes y Malcata, 1998).

4.3.1- Viabilidad de probióticos en el queso

Entre los trabajos publicados sobre quesos probióticos, las bifidobacterias fueron las bacterias más comúnmente ensayadas, sobre todo en forma individual, en combinaciones de cepas de este género, y también en forma conjunta con *L. acidophilus*. También han sido frecuentemente utilizadas cepas de *Enterococcus faecium*, *L. acidophilus* y *L. paracasei*, en forma individual, y también estas dos últimas especies juntas en combinación con bifidobacterias (Tabla 3).

Los quesos frescos son productos no madurados, o con un corto período de maduración, cuyo consumo se produce al poco tiempo de la manufactura, por lo cual se consideraron, a priori, el mejor soporte para el mantenimiento de la viabilidad probiótica (Heller y col., 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos en quesos frescos fueron dispares. Por ejemplo, se observó un buen mantenimiento de la viabilidad en un queso fresco elaborado con combinaciones de dos y tres cepas probióticas, durante 60 días de maduración (Vinderola y col., 2000b). También en otro queso fresco, *L. acidophilus* y *B. lactis* se mantuvieron viables durante 28 días cuando fueron agregadas individualmente o en forma conjunta (El-Zayat y Osman, 2001), y en queso Minas, *L. acidophilus* permaneció estable durante 21 días (Buriti y col., 2005). También se obtuvo alta concentración de *B. bifidum* en queso Kariesh, pero solamente se estudió por un período de 10 días (Murad y col., 1998). La supervivencia de bifidobacterias adicionadas en queso Cottage controlado durante 14 días, demostró ser cepa-dependiente, obteniéndose para algunas de las cepas ensayadas un buen mantenimiento de la viabilidad, mientras que para otras se observaron disminuciones de 3 órdenes (O'Riordan y Fitzgerald, 1998). En este

mismo tipo de queso, Blanchette y col. (1996) determinaron una buena viabilidad de *B. infantis* solamente por 5 días, siendo la misma no detectable a los 28 días de maduración. Igualmente, otra cepa de *B. infantis* incorporada a queso Crescenza demostró una mayor pérdida de viabilidad que *B. longum* y *B. bifidum*, que permanecieron en altos niveles durante el período de estudio (15 días) (Gobbetti y col., 1998). Asimismo, Roy y col. (1998) observaron que dos cepas de bifidobacterias usadas en forma individual mantenían una concentración mayor a 10^6 UFC g⁻¹, solamente durante 15 días, disminuyendo severamente luego de 30 días.

Resulta interesante destacar que en la obtención de dos tipos de quesos frescos se ha utilizado leche concentrada por ultrafiltración como estrategia tecnológica para disminuir las pérdidas de probióticos en el suero, o mejorar la supervivencia probiótica (Roy y col., 1998, Vinderola y col., 2000b). En este sentido, se ha observado una mayor concentración celular final cuando la fermentación de leche por bifidobacterias se realizaba en leche ultrafiltrada (sin control del pH), en la cual la mayor concentración proteica y sales insolubles generaba un efecto buffer. En varios estudios se ha demostrado que los factores inhibidores del crecimiento de bifidobacterias en un medio de fermentación son la acumulación de compuestos metabólicos finales y la disminución de nutrientes (Boylston y col., 2004).

Los quesos semiduros y duros han sido referidos como menos apropiados que los quesos blandos para su uso como vehículo de bacterias probióticas, debido a su largo período de maduración, que puede variar entre algunos meses y varios años (Heller y col., 2003). Sin embargo, existen ejemplos de resultados satisfactorios en cuanto al mantenimiento de la viabilidad probiótica en quesos madurados, aunque también se verificaron casos con resultados negativos. En general, se ha observado que muchas variedades de queso con su proceso típico o pequeñas modificaciones tecnológicas pueden ser adecuadas para mantener bacterias probióticas viables, siendo la principal fuente de variabilidad en los resultados, la resistencia probiótica cepa-específica en dicho medio ambiente. Por ejemplo, en Canestrato Pugliese, un queso duro italiano, se ha demostrado que dos cepas de bifidobacterias mostraban niveles de viabilidad diferentes, manteniéndose una de ellas en valores adecuados, mientras que la otra disminuía a 10^5 UFC g⁻¹. En este trabajo se realizó una pequeña modificación tecnológica para evitar la excesiva acidificación de la cuajada (Corbo y col., 2001). En queso Feta, *L. acidophilus* demostró buen mantenimiento de la viabilidad durante 90 días. Se logró una mayor concentración probiótica en quesos madurados envasados al vacío que en aquellos en salmuera,

probablemente por inhibición por la alta concentración de sal en estos últimos (Kasimoğlu y col., 2004). Asimismo, en queso Gouda, *B. lactis* y, sobre todo, *L. acidophilus*, mostraron una mayor disminución de su concentración a mayores concentraciones de sal en el queso, y sobre todo en las últimas semanas de maduración, debido a la difusión de la misma al interior del producto. Sin embargo, ambas cepas se mantuvieron en niveles aceptables. El proceso de producción del queso fue levemente modificado para lograr una acidificación con los probióticos similar a la del queso típico. En este queso, el agregado de hidrolizados de proteínas no mejoró la viabilidad de las bifidobacterias, y además tuvo efecto negativo en el *flavour* (Gomes y col., 1995).

Los trabajos que utilizan como modelo de estudio al queso Cheddar, han aportado evidencia sobre su utilidad como soporte de bacterias probióticas. En efecto, la mayoría de las cepas estudiadas, ya sea en forma individual o en combinaciones, ha demostrado un mantenimiento de altas concentraciones a través del período de estudio, que fue variable entre 2 meses a 2 años. Entre los trabajos reportados, se encontraron solamente tres cepas cuya viabilidad fue menor a 10^6 UFC g^{-1} al final de la maduración: *L. acidophilus* L10 y La5 (Phillips y col., 2006) y *B. longum* BB536 (McBrearty y col., 2001). Por otro lado, en un trabajo reciente en el cual se utilizaron seis cepas probióticas: dos bifidobacterias, dos *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. paracasei* en forma individual, se observó que la mayor disminución de viabilidad durante los 6 meses estudiados fue para las cepas de *L. acidophilus* (Ong y col., 2007). Diferentes resultados de supervivencia fueron obtenidos para una misma cepa probiótica de *L. acidophilus*: L10, cuando se utilizó en forma conjunta a otras dos mismas cepas: *Bifidobacterium lactis* B94 y *Lactobacillus paracasei* L26. Phillips y col. (2006) reportaron una gran pérdida de viabilidad de L10 durante 32 semanas, mientras que Ong y col. (2006) obtuvieron una viabilidad alrededor de 10^8 UFC g^{-1} para esta cepa durante 6 meses. En el primer trabajo, los quesos fueron madurados a una temperatura entre 9-10°C, mientras que en el segundo, la temperatura de maduración fue 4°C. Esta diferencia en el proceso de maduración pudo haber influido en los diferentes resultados obtenidos para la misma cepa.

En la mayoría de los trabajos, los probióticos son adicionados junto al starter. Sin embargo, Dinakar y Mistry (1994) agregaron los mismos en una etapa tardía de la elaboración, más específicamente durante la trituración de la cuajada (*milling*), con el objetivo de incrementar la viabilidad de los probióticos. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, debido a que no solamente no hubo disminución de la población, sino que se observó un crecimiento durante la maduración por dos años de dos cepas de bifidobacterias

ensayadas en forma individual. Además, estos autores incorporaron las bifidobacterias previa encapsulación o directamente liofilizadas, pero no observaron diferencias en la viabilidad en el queso entre ambas formas de adición. Por otro lado, Daigle y col. (1999) realizaron la adición de *B. infantis* en queso Cheddar en una crema que fue previamente inoculada e incubada con esta cepa probiótica, obteniendo buen mantenimiento de la viabilidad. Esta metodología de adición sería un ejemplo de una fermentación en dos pasos, metodología que ha sido descrita como una estrategia para incrementar la viabilidad probiótica en los productos.

Tabla 3. Viabilidad de probióticos en quesos: estudios previos.

QUESO	PROBIÓTICOS	VIABILIDAD	FUENTE
Cheddar	<i>Bifidobacterium bifidum</i> encapsulado (ATCC 15696) <i>Bifidobacterium bifidum</i> (Chr. Hansen)	<i>B. bifidum</i> ATCC 15696: $2,6 \cdot 10^7$ UFC g^{-1} – 24 meses y <i>B. bifidum</i> (Chr. Hansen): $1,4 \cdot 10^7$ UFC g^{-1} – 24 meses. Ambas cepas incrementaron su concentración durante la maduración	Dinakar y Mistry, 1994
Cheddar	3 cepas de <i>Lactobacillus salivarius</i> y 2 cepas de <i>Lactobacillus paracasei</i> .	<i>L. salivarius</i> : 10^6 UFC g^{-1} - 8 meses. <i>L. paracasei</i> : 10^8 UFC g^{-1} – 8 meses.	Gardiner y col., 1998
Cheddar	<i>Lactobacillus paracasei</i> NFBC 338 y la variante resistente a la rifampicina (NFBC 338 Rif ^R)	$2,9 \cdot 10^8$ y $4,5 \cdot 10^7$ UFC g^{-1} – 90 días para NFBC 338 y NFBC 338 Rif ^R , respectivamente. La primera cepa se mantuvo constante hasta los 180 días, mientras que la segunda disminuyó hasta $2,1 \cdot 10^6$ UFC g^{-1} .	Stanton y col., 1998
Cheddar	<i>Enterococcus faecium</i> PR88	10^8 UFC g^{-1} – 9 meses.	Gardiner y col., 1999a
Cheddar	<i>Enterococcus faecium</i> Fargo 688	$4 \cdot 10^8$ UFC g^{-1} – 15 meses	Gardiner y col., 1999b
Cheddar	<i>Bifidobacterium infantis</i>	$5 \cdot 10^6$ UFC g^{-1} -12 semanas	Daigle y col., 1999
Cheddar	<i>Bifidobacterium longum</i> BB536 <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	<i>B. longum</i> : 10^5 UFC g^{-1} – 6 meses <i>B. lactis</i> : 10^8 UFC g^{-1} – 6 meses	McBrearty y col., 2001
Cheddar	<i>Lactobacillus paracasei</i> NFBC 338 Rif ^r	$7,7 \cdot 10^7$ UFC g^{-1} – 3 meses	Gardiner y col., 2002
Cheddar	<i>Lactobacillus acidophilus</i> L10 y <i>Bifidobacterium lactis</i> B94, en forma conjunta.	L10: $6 \cdot 10^8$ UFC g^{-1} – 1 mes y $2 \cdot 10^6$ UFC g^{-1} – 2 meses B94: 10^7 UFC g^{-1} – 1 mes y $2,5 \cdot 10^6$ UFC g^{-1} – 2 meses	Darukaradhya y col., 2006
Cheddar	1) <i>L. acidophilus</i> L10 + <i>B. lactis</i> B94 + <i>L. paracasei</i> L26 2) <i>L. acidophilus</i> La5 + <i>L. casei</i> Lc1 + <i>B. lactis</i> Bb12 3) <i>Bifidobacterium</i> sp. DR10 + <i>L. rhamnosus</i> DR20.	Bifidobacterias: B94: $4 \cdot 10^7$ UFC g^{-1} , Bb12: $1,4 \cdot 10^8$ UFC g^{-1} , DR10: $5 \cdot 10^8$ UFC g^{-1} - 32 semanas. Grupo <i>L. casei</i> : L26 $2 \cdot 10^7$ UFC g^{-1} , Lc1: $1,6 \cdot 10^7$ UFC g^{-1} , DR20: $9 \cdot 10^8$ UFC g^{-1} . Ambos grupos presentaron un máximo a las 12 semanas, y luego una pequeña disminución. <i>L. acidophilus</i> : L10 y La5: gran disminución $\rightarrow 4,9 \cdot 10^3$ y $3,6 \cdot 10^3$ UFC g^{-1} -32 semanas, respectivamente.	Phillips y col., 2006
Cheddar	1) <i>L. acidophilus</i> 4962 + <i>L. casei</i> 279 + <i>B. longum</i> 1941, en forma conjunta 2) <i>L. acidophilus</i> L10, <i>L. paracasei</i> L26, <i>B. lactis</i> B94, en forma conjunta	1-3 10^8 UFC g^{-1} - 6 meses para las tres cepas en la experiencia 1. 0,3-3 10^8 UFC g^{-1} - 6 meses para las tres cepas en la experiencia 2. En ambas experiencias, la menor concentración fue de las bifidobacterias.	Ong y col. 2006
Cheddar	<i>L. acidophilus</i> 4962, <i>L. casei</i> 279, <i>B. longum</i> 1941, <i>L. acidophilus</i> L10, <i>L. paracasei</i> L26, <i>B. lactis</i> B94.	Todas las cepas mostraron concentraciones a los 6 meses de más de 10^8 UFC g^{-1} . Las cepas de <i>L. acidophilus</i> presentaron la mayor disminución en su concentración.	Ong y col., 2007

QUESO	PROBIÓTICOS	VIABILIDAD	FUENTE
Gouda	<i>Bifidobacterium</i> sp. Bo y <i>Lactobacillus acidophilus</i> Ki, en forma conjunta.	<i>Bifidobacterium</i> sp.: 2-4 10 ⁹ UFC g ⁻¹ - 1 semana y 6-18 10 ⁸ UFC g ⁻¹ - 9 sem. <i>L. acidophilus</i> 2,5-4 10 ⁸ UFC g ⁻¹ - 1 semana, y 0,2-5 10 ⁷ UFC g ⁻¹ - 9 semanas.	Gomes y col., 1995
Queso de cabra	<i>Bifidobacterium</i> sp. Bo y <i>Lactobacillus acidophilus</i> Ki, en forma conjunta.	<i>Bifidobacterium</i> sp.: 0,7-10 10 ⁷ UFC g ⁻¹ - 70 días. <i>L. acidophilus</i> 0,6-3 10 ⁷ UFC g ⁻¹ - 70 días. Desde el inicio hasta el final de la maduración, las poblaciones disminuyeron entre 1 y 2 órdenes logarítmicos.	Gomes y Malcata, 1998
Canestrato Pugliese	<i>Bifidobacterium bifidum</i> Bb02 <i>Bifidobacterium longum</i> Bb46	Ambas cepas hasta los 19 días: 1,2 - 7,9 10 ⁷ UFC g ⁻¹ . A los 56 días Bb02: 10 ⁶ UFC g ⁻¹ , y Bb45 10 ⁵ UFC g ⁻¹ , usados en forma individual o conjunta.	Corbo y col., 2001
Pikantne	<i>Lactobacillus fermentum</i> ME-3	5 10 ⁷ UFC g ⁻¹ - 66 días. Hubo una pequeña disminución entre 24 y 54 días, que fue compensado por un leve incremento hasta los 66 días.	Songisepp y col., 2004
Blanco turco	<i>L. acidophilus</i>	10 ⁶ -10 ⁷ UFC g ⁻¹ - 90 días. Se observó lenta disminución desde los 7 días de maduración.	Kasimoğlu y col., 2004
Fresco	<i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium longum</i>	Ambas cepas: 10 ⁶ UFC g ⁻¹ - 15 días. A los 30 días, la población disminuyó marcadamente.	Roy y col., 1998
Cottage	<i>Bifidobacterium infantis</i>	10 ⁵ - 10 ⁷ UFC g ⁻¹ - 5 días. Luego hubo una gran disminución, siendo no detectables a los 28 días.	Blanchette y col., 1996
Cottage	7 cepas de bifidobacterias	Resultados dispares: dos cepas mantuvieron alta concentración y las otras disminuyeron 2 y 3 órdenes logarítmicos, durante 14 días a 4°C.	O'Riordan y Fitzgerald, 1998
Kariesh	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,1-3,0 10 ⁸ UFC g ⁻¹ - 10 días.	Murad y col., 1998
Crescenza	<i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> y <i>B. longum</i> . Cepas usadas individualmente o en combinación, células libres o inmobilizadas.	A los 14 días: <i>B. bifidum</i> : 1,1 10 ⁸ UFC g ⁻¹ , <i>B. infantis</i> : 1,7 10 ⁵ UFC g ⁻¹ y <i>B. longum</i> : 1,3 10 ⁷ UFC g ⁻¹ . Cuando se usaron las tres cepas juntas, tanto en forma libre como inmobilizadas, la viabilidad fue 10 ⁵ UFC g ⁻¹ .	Gobbetti y col., 1998
Tallaga	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5 <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Ambas cepas, usadas en forma individual o conjunta, se mantuvieron en niveles mayores a 10 ⁹ UFC g ⁻¹ - 28 días.	El-Zayat y Osman, 2001
Fresco	5 cepas de bifidobacterias, dos cepas de <i>L. acidophilus</i> , y dos cepas de <i>L. casei</i> . Se utilizaron combinaciones de 2 y 3 cepas.	Todas las combinaciones fueron satisfactorias, mostrando disminuciones hasta los 60 días de menos de un orden logarítmico, con concentraciones finales mayores a 10 ⁶ UFC g ⁻¹ .	Vinderola y col., 2000b
Fresco Minas	<i>L. acidophilus</i> La5	10 ⁶ UFC g ⁻¹ - 21 días	Buriti y col., 2005

4.3.2- Influencia de probióticos en la proteólisis durante la maduración

En la gran mayoría de los trabajos sobre quesos probióticos existentes hasta la fecha, se estudió la supervivencia de las bacterias probióticas pero no se investigó el impacto de sus actividades bioquímicas en la composición y calidad del producto final. En unos pocos casos, se determinó el efecto sobre los parámetros de composición global, además de realizar una evaluación sensorial y, eventualmente evaluar la actividad metabólica por análisis de lactosa y ácidos orgánicos (Roy y col., 1998, Stanton y col., 1998, Vinderola y col., 2000b, Gardiner y col., 2002, Songisepp y col., 2004, Phillips y col., 2006, entre otros).

La influencia de los probióticos en la proteólisis se encuentra escasamente documentada. En varias de las investigaciones realizadas, se estudió únicamente la proteólisis primaria, a través de índices no específicos como Nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6), o bien electroforesis o HPLC de la fracción de nitrógeno insoluble en agua (NI-agua) (Dinakar y Mistry, 1994, El-Zayat y Osman, 2001, Kasimoğlu y col., 2004, Buriti y col., 2005). En otros trabajos también han sido incluidos análisis que reflejan la proteólisis secundaria, la cual en general ha demostrado ser la más afectada por el agregado de diversos fermentos adjuntos. Ejemplos de tales índices lo constituyen las fracciones nitrogenadas que contienen compuestos de bajo peso molecular, nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (NS-TCA) y en ácido fosfotúngstico (NS-PTA), y el contenido de aminoácidos libres (AAL), aminoácidos libres totales (AALT), y perfiles por HPLC de exclusión molecular o de fase reversa de la fracción soluble en agua o a pH 4,6 (Corbo y col., 2001, McBrearty y col., 2001, Ong y col., 2006 y 2007). Por último, sólo en dos trabajos se ha estudiado la actividad de peptidasas presentes en el queso (Gobbetti y col., 1998, Corbo y col., 2001).

El impacto de bacterias probióticas agregadas parece ser significativo en los niveles de AALT o NS-PTA (que es un índice de los AALT) y de ciertos AAL individuales. También estos resultados han demostrado ser dependientes de la especie y de la cepa utilizada. Por ejemplo, McBrearty y col. (2001) han determinado un mayor incremento de los AALT por *B. lactis* que por *B. longum*. Estos resultados pueden deberse a actividades enzimáticas diferentes entre ambas cepas, y también a diferencias en la concentración probiótica en los quesos, que fue mayor para *B. lactis*, o también a que los mismos presentaron mayor humedad que los quesos con *B. longum*. En este trabajo no se detectó influencia en el perfil peptídico obtenido por HPLC de exclusión molecular. Contrariamente a estos resultados, Corbo y col. (2001) han demostrado la influencia de *B.*

bifidum y *B. longum*, utilizados en forma individual o conjunta en queso Canestrato Pugliese, en los péptidos de menor tamaño (determinados por RP-FPLC), mientras que ningún efecto fue observado en los AALT y en el perfil de AAL. Una influencia variable según la cepa utilizada también fue obtenida por otros investigadores en queso Cheddar, que observaron un incremento en el nivel de AALT para algunas de las cepas de lactobacilos probióticos estudiadas (Gardiner y col., 1998, Stanton y col., 1998). Asimismo, Ong y col. (2007), que estudiaron el efecto de dos bifidobacterias, dos cepas del grupo de *L. casei* y dos *L. acidophilus*, han observado un incremento de NS-TCA para solamente una de las cepas de cada grupo. En este mismo trabajo, se observó una mayor concentración de NS-PTA para varias cepas de lactobacilos y bifidobacterias, teniendo estas últimas una mayor influencia. También fue demostrado un evidente efecto de los lactobacilos, sobre todo del grupo de *L. casei*, en los perfiles electroforéticos. De esta manera, se observaron contribuciones a diferente nivel en la proteólisis: en la peptidolisis por las bifidobacterias, y en la proteólisis por los lactobacilos. Estos resultados demuestran que los fermentos probióticos adjuntos también pueden influir en la proteólisis primaria. Otros ejemplos de este hecho, son el incremento en el nivel de NS-pH 4,6 demostrado en queso Feta con *L. acidophilus* (Kasimoğlu y col., 2004), y en NS-agua y en la degradación de α_{s1} -caseína por electroforesis en queso Cheddar con *B. infantis* (Daigle y col., 1999). Asimismo, tres cepas de bifidobacterias en queso Crescenza han demostrado producir un incremento de NS-pH 4,6, durante el corto período de estudio, de 14 días (Gobbetti y col., 1998). A pesar de la reconocida baja actividad proteolítica de las bifidobacterias, los trabajos citados han demostrado que algunas de ellas fueron capaces de influir en la proteólisis del queso, tanto secundaria como primaria.

La utilización de cepas en forma aislada o conjunta puede ejercer diferente efecto en el queso. En este sentido, Ong y col. (2007) determinaron un incremento del nivel de NS-agua en quesos elaborados con seis cepas probióticas en forma individual, mientras que la utilización de las mismas en un fermento mixto en combinaciones de tres cepas, no tuvo efecto sobre este índice (Ong y col., 2006), a pesar que en ambos trabajos, las concentraciones alcanzadas por los probióticos fueron similares. En ambos trabajos, se observó un incremento de los niveles de NS-TCA y NS-PTA en los quesos probióticos. Comparando los valores absolutos de las fracciones nitrogenadas en los dos trabajos, se observa que el NS-agua fue mayor con las cepas individuales, mientras que las otras dos fracciones fueron mayores en los quesos con tres cepas. De este modo, una mayor

concentración de adjuntos, debido a la presencia de tres cepas en alta concentración, produjo un mayor incremento en la velocidad de peptidólisis con respecto a la proteólisis.

Por último, se observó un incremento de la actividad de ciertas peptidasas en quesos elaborados con diferentes bifidobacterias, sobre todo con *B. bifidum* (Gobbetti y col., 1998, Corbo y col., 2001).

5- Fundamentos de la elección del tema de estudio

La industria láctea en Argentina tiene una gran importancia, debido a los altos niveles de producción de la misma, sobre todo en las provincias de Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires y Entre Ríos. En el año 2005, se produjeron 9493 millones de litros de leche, de los cuales un 38,7% ha sido destinado a la elaboración de quesos, constituyendo los mismos el principal producto derivado de la industrialización de esta materia prima (Zalazar y col., 1999, Lavabre, 2005). La producción de quesos en nuestro país en el año 2001 ha sido de 420000 toneladas, siendo de esta manera el principal productor en América del Sur. Estos valores ubican a nuestro país en la posición número 10 en la escala mundial de elaboración de quesos. Por otro lado, Argentina también se encuentra entre los mayores consumidores de quesos, superada únicamente por países industrializados, mayormente europeos, además de Estados Unidos. En el ranking mundial, Argentina se encuentra en el lugar número 20 en cuanto a su consumo per cápita de quesos, con un valor de 12,2 kg por habitante por año (Fox y McSweeney, 2004). Si bien su posición en la escala mundial disminuyó con respecto a años anteriores, el consumo absoluto se ha incrementado.

Los quesos de pasta semidura representan un alto porcentaje de la elaboración total de quesos en nuestro país. Del total de la leche destinada a la elaboración de quesos, un 37,4% es utilizado para la elaboración de quesos semiduros (Lavabre, 2005). Entre ellos, el queso Pategrás es la variedad más popular, que originalmente buscaba reproducir productos similares de Francia o Italia, pero que actualmente tiene características típicas argentinas debido a cambios introducidos con el tiempo, tanto en la tecnología como en los fermentos utilizados. El Pategrás Argentino se consume principalmente como queso de mesa. En su elaboración se utilizan bacterias lácticas termófilas, generalmente streptococos, y el período de maduración es variable, entre 1-2 meses según el tamaño de la horma. En la forma más común de comercialización, piezas cilíndricas de unos 4 kg, la maduración requiere 45 días (Zalazar y col., 1999).

En los últimos años, en Argentina, al igual que en el resto del mundo, han aparecido en el mercado gran número de yogures y leches fluidas fermentadas con bacterias probióticas agregadas. En contraste a esto, el mercado nacional de quesos probióticos es un área con muy poco desarrollo. En efecto, en la actualidad existe solamente un queso probiótico en el mercado nacional, de pasta blanda y elaborado con leche ultrafiltrada. En este producto se han incorporado tres cepas probióticas, las cuales mantienen una muy buena viabilidad durante todo el período de vida útil del producto, pero no existen estudios sobre la influencia de las bacterias en la composición del queso. Debido a la relativa novedad de este tipo de alimentos funcionales, aún no se han sancionado normativas nacionales completas que reglamenten las concentraciones probióticas requeridas. En el Código Alimentario Argentino (Cap. 8, art. 576, inciso 2.2.3), solamente se explica que para el caso de adicionar bifidobacterias y declararlas en el rótulo del envase de leches fermentadas, los niveles mínimos deben ser de 10^6 UFC g^{-1} (ANMAT, 2006).

Por otro lado, en la mayoría de los trabajos publicados en todo el mundo sobre el desarrollo de quesos probióticos, se estudió únicamente la viabilidad probiótica en el producto elaborado generalmente con fermentos lácticos mesófilos (comúnmente lactococos). Sólo en tres trabajos previos se estudiaron quesos elaborados con fermentos lácticos termófilos: en queso Fresco Argentino (Vinderola y col., 2000b), Canestrato Pugliese (Corbo y col., 2001) y Crescenza (Gobbetti y col., 1998). En la bibliografía no se dispone de suficientes datos sobre interacciones de fermentos termófilos y bacterias probióticas, las cuales pueden ser muy importantes en el mantenimiento de la viabilidad probiótica en el queso.

Con respecto al impacto de los probióticos en el proceso de proteólisis, éste ha sido estudiado en algunos trabajos por distintos tipos de análisis. Sin embargo, muy escasos trabajos, todos muy recientes, realizaron un estudio exhaustivo de este proceso y en ninguno de ellos se han estudiado en profundidad los perfiles peptídicos obtenidos por RP-HPLC. Estos perfiles constituyen una huella digital del proceso proteolítico, y son una de las metodologías sugeridas para el estudio de la influencia del starter o de fermentos adjuntos en la proteólisis de quesos (Sousa y col., 2001). Asimismo, el queso Cheddar, que ha sido el modelo seleccionado para estos estudios, se caracteriza por un proceso de elaboración muy particular, incluyendo salado directo, molido de la cuajada y cheddarización, que lo diferencian de la mayoría de los quesos argentinos, y en general, de la mayor parte de las variedades europeas (Fox y McSweeney, 2004). Como ya fue explicado en detalle en la introducción, en el estudio de la viabilidad e influencia de

bacterias probióticas en alimentos, no es posible extrapolar resultados de una cepa probiótica a otra, ni de una matriz alimentaria a otra diferente. No existen aún datos bibliográficos sobre la influencia de bacterias probióticas en queso semiduro similar al Pategrás.

En el contexto planteado, el desarrollo de un queso semiduro argentino con bacterias probióticas constituye una excelente oportunidad para el lanzamiento de un nuevo alimento funcional. Sin embargo, como etapa previa a todo desarrollo industrial, se deben realizar estudios que permitan establecer los parámetros de elaboración, la viabilidad microbiana y la influencia sobre las características finales de los quesos semiduros con el agregado de bacterias probióticas.

OBJETIVOS



2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo general

En este trabajo se plantea el estudio de la influencia de la adición de bacterias probióticas sobre el perfil de proteólisis de quesos semiduros argentinos. Estos conocimientos serán aplicados para desarrollar un producto con el agregado de fermentos adjuntos de bacterias probióticas, que sumando los beneficios de un producto probiótico, conserve el perfil de maduración típico del queso original

2.2- Objetivos particulares

- Estudiar la metodología de agregado de los cultivos probióticos durante el proceso de fabricación de quesos semiduros.

- Elaborar quesos semiduros a escala planta piloto con la adición de bacterias probióticas como starters secundarios o adjuntos.

- Analizar el efecto del fermento probiótico sobre el perfil de proteólisis del queso durante su maduración.