

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS**  
**BIOLÓGICAS**

Tesis desarrollada en el

**INSTITUTO DE LACTOLOGÍA INDUSTRIAL**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

---

**PERFILES DE LIPÓLISIS Y**  
**CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE**  
**QUESOS SEMIDUROS CON BACTERIAS**  
**PROBIÓTICAS COMO FERMENTO ADJUNTO**

POR

**DIEGO JAVIER MERCANTI**

---

**Director: ING. CARLOS ZALAZAR**

**Co-directora: DRA. ANDREA QUIBERONI**

Tesis presentada para optar por el grado académico de  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**SANTA FE**

**- 2007 -**

**JURADOS DESIGNADOS PARA LA EVALUACIÓN**

**DE LA PRESENTE TESIS:**

**TITULARES**

DRA. SILVIA N. GONZÁLEZ

DR. ENRIQUE AGULLÓ

DR ARTURO C. SIMONETTA

**SUPLENTE**

DR. MIGUEL S. PAULETTI

## AGRADECIMIENTOS

EN PRIMER LUGAR QUIERO AGRADECER AL ING. CARLOS ZALAZAR, MI DIRECTOR, POR HABERME RECIBIDO COMO PARTE DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN DEL INLAIN Y POR HABER SIDO MI GUIA CONSTANTE DURANTE TODOS ESTOS AÑOS DE TRABAJO, NO SOLO DURANTE EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS SINO TAMBIÉN DENTRO DE OTROS PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DE LOS CUALES ME HA HECHO PARTÍCIPE.

A ANDREA QUIBERONI, MI CO-DIRECTORA, POR SU EXCELENCIA COMO INVESTIGADORA Y COMO PERSONA, Y SU CONTINUA PREDISPOSICIÓN A AYUDARME Y ENSEÑARME TODO LO NECESARIO DENTRO DEL ÁMBITO DE LA MICROBIOLOGÍA.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO, POR EL INTERÉS Y TIEMPO DEDICADOS A LA EVALUACIÓN DE LA PRESENTE TESIS.

AL CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET), POR EL OTORGAMIENTO DE LA BECA QUE ME PERMITIÓ LLEVAR A CABO LA PRESENTE TESIS.

A LA AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA (ANPCyT), POR EL FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO QUE PERMITIÓ DESARROLLAR EL PRESENTE TRABAJO.

A MARIO Y A CARLOS MEINARDI, POR HABERME ENSEÑADO TANTO DURANTE LAS ELABORACIONES DE LOS QUESOS, POR SU CORDIALIDAD Y SENCILLEZ, POR SU AMISTAD Y POR TANTOS MOMENTOS AGRADABLES COMPARTIDOS.

A SUSANA PALMA, POR SU PACIENCIA Y TIEMPO DEDICADOS A ENSEÑARME TÉCNICAS DE LABORATORIO Y SU CONTRIBUCIÓN A TRAVÉS DE ALGUNAS DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

A CRISTINA, SUSANA BERNAL Y ÉRICA, POR SUS VALIOSOS APORTES AL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS.

AL GRUPO DE MICROBIOLOGÍA DEL INLAIN, POR EL SOPORTE BRINDADO, EN ESPECIAL A JORGE REINHEIMER POR CEDER GENTILMENTE UNA DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS ESTUDIADAS.

A NORA SABBAG Y SU GRUPO DE PANELISTAS, POR EL GRAN ENRIQUECIMIENTO DE LA TESIS QUE SIGNIFICÓ EL CONJUNTO DE ANÁLISIS SENSORIALES REALIZADOS.

A LA FIRMA MILKAUT S. A. (FRANK, SANTA FE), POR LA DONACIÓN DE LA LECHE Y DE LA CREMA DE LECHE UTILIZADA PARA LA ELABORACIÓN DE LOS QUESOS.

A CARINA, POR SU AMISTAD, COMPAÑERISMO Y AYUDA EN EL LABORATORIO; A “MECHI”, “DANI”, EMILIO, “NANDO”, “LA NATO” Y “MANKI” POR LA HERMOSA AMISTAD FORJADA A LO LARGO DE ESTOS AÑOS, TANTO DENTRO COMO FUERA DEL LABORATORIO; AL RESTO DE MIS COMPAÑEROS POR HACER DEL MISMO UN LUGAR DE TRABAJO TAN AGRADABLE, TANTO LOS QUE AÚN TRABAJAN ALLÍ: LUJÁN, SILVINA, BELÉN, VERÓNICA, VIVIANA Y PATRICIA, COMO LOS QUE NO: AGUSTÍN, LAURA, EUGENIA, LUCIANA Y MARIANA.

A MIS PADRES, QUE ME POSIBILITARON HABER LLEGADO HASTA ACÁ.

A PAOLA, POR HABER ESTADO A MI LADO DURANTE TODA ESTA ETAPA DE MI VIDA.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Abreviaturas y Símbolos</b>	<i>x</i>
<b>Resumen y Abstract</b>	
Resumen	<i>xii</i>
Abstract	<i>xvii</i>
<b>1. Introducción</b>	
1. Nutracéuticos y alimentos funcionales	01
1.1. Definiciones	01
1.2. Historia	02
1.3. Clasificación	02
1.4. Funciones	03
2. El tracto gastrointestinal y su microbiota	05
2.1. Funciones de la microbiota intestinal	05
2.2. Factores que afectan la composición de la microbiota intestinal	06
2.3. Mejoramiento del balance microbiano intestinal	10
3. Probióticos	10
3.1. Historia	10
3.2. Definición	11
3.3. Bacterias utilizadas como probióticos	12
3.3.1. Lactobacilos	13
3.3.2. Bifidobacterias	15
3.4. Prebióticos	16
3.4.1. Simbióticos	18
3.5. Criterios de selección de bacterias probióticas	18
3.5.1. Propiedades de bioseguridad	19
3.5.2. Propiedades tecnológicas	20
3.5.3. Propiedades biológicas	21
3.5.4. Propiedades probióticas	22
3.5.4.1. Mejora de la intolerancia a la lactosa	23
3.5.4.2. Prevención y tratamiento de infecciones gastrointestinales	23
3.5.4.3. Reducción de los niveles de colesterol	25
3.5.4.4. Prevención de cáncer	26

3.5.4.5. Prevención y tratamiento de alergias	26
3.5.4.6. Otros efectos	27
3.6. Eficacia de los probióticos	27
3.7. Productos probióticos en el mercado	29
3.7.1. Productos probióticos no lácteos	30
3.8. Incorporación en alimentos: factores a tener en cuenta.	30
3.8.1. Concentración mínima requerida	30
3.8.2. Estabilidad durante el almacenamiento del producto	31
3.8.2.1. pH	31
3.8.2.2. Oxígeno	32
3.8.2.3. Preparación previa del inóculo	32
3.8.3. Métodos de identificación y recuento en la matriz alimentaria	34
3.8.4. Propiedades sensoriales del producto	34
4. Quesos	35
4.1. Características y clasificación	35
4.2. Maduración	36
4.2.1. Hidrólisis de la lactosa y catabolismo del lactato	36
4.2.2. Catabolismo del citrato	38
4.2.3. Proteólisis y catabolismo de los aminoácidos	38
4.2.4. Lipólisis	39
4.3. Incorporación de bacterias probióticas: ventajas con respecto a las leches fermentadas	44
4.4. Antecedentes de quesos probióticos	44
4.5. Producción, consumo y exportación de quesos: situación actual en Argentina	48
5. El queso Pategrás Argentino	49
5.1. Características tecnológicas y bioquímicas	49
6. Justificación del tema elegido para el desarrollo de la Tesis	51
<b>2. Objetivos del Trabajo</b>	
1. Objetivo general	53
2. Objetivos específicos	53
<b>3. Materiales y Métodos</b>	
1. Cepas probióticas utilizadas	54

1.1. Cepas comerciales	54
1.2. Cepa aislada en el INLAIN	55
2. Diseño experimental	56
3. Preparación del sustrato lácteo graso	57
4. Elaboraciones de quesos	60
5. Determinaciones fisicoquímicas	62
5.1. Leche y crema de leche	62
5.1.1. pH	62
5.1.2. Materia grasa	63
5.2. Quesos	63
5.2.1. pH	64
5.2.2. Materia grasa	64
5.2.3. Extracto seco	65
5.2.4. Proteínas totales	65
5.2.5. Cloruro de sodio	66
6. Recuentos microbiológicos	67
7. Determinación del perfil de ácidos grasos libres en quesos	68
7.1. Extracción y aislamiento de los ácidos grasos libres	69
7.2. Derivatización	70
7.3. Cromatografía gaseosa	70
8. Determinación del contenido de colesterol en quesos	71
8.1. Extracción del colesterol	71
8.2. Cromatografía gaseosa	72
9. Determinación de azúcares en quesos	72
9.1. Determinación del contenido de galactosa	72
9.2. Determinación del contenido de azúcares reductores totales	73
10. Análisis sensoriales en quesos	74
10.1. Evaluación sensorial descriptiva	74
10.2. Evaluación sensorial de aceptabilidad	75
11. Análisis estadísticos	76
<b>4. Resultados</b>	
1. Características fisicoquímicas de los quesos	78
2. Análisis microbiológicos	84
3. Análisis de las transformaciones de la materia grasa	92

3.1. Lipólisis: ácidos grasos libres totales	93
3.2. Lipólisis: perfiles de ácidos grasos libres individuales	96
3.2.1. Ensayo 1: <i>Lactobacillus acidophilus</i> A	96
3.2.2. Ensayo 2: <i>Lactobacillus paracasei</i>	98
3.2.3. Ensayo 3: <i>Lactobacillus acidophilus</i> B	98
3.2.4. Ensayo 4: <i>Bifidobacterium lactis</i>	100
3.2.5. Ensayo 5: <i>Lactobacillus acidophilus</i> C	102
3.2.6. Ensayo 6: <i>Lactobacillus casei</i>	102
3.2.7. Ensayo 7: <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	104
3.2.8. Ensayo 8: fermento probiótico mixto: <i>Lactobacillus acidophilus</i> C, <i>Lactobacillus paracasei</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i>	106
3.2.9. Análisis por componentes principales de los perfiles de AGL	108
3.3. Determinación del contenido de colesterol	115
4. Determinación del contenido de azúcares	117
5. Análisis sensoriales	117
5.1. Análisis sensoriales descriptivos	117
5.1.1. Atributos sensoriales de apariencia, aroma y sabor	118
5.1.2. Atributos sensoriales de textura	121
5.2. Análisis sensoriales de aceptabilidad	124
5.2.1. Primera prueba de aceptabilidad	126
5.2.2. Segunda prueba de aceptabilidad	127
5.2.3. Tercera prueba de aceptabilidad	129
<b>5. Discusión de Resultados</b>	
1. Fundamentos de los diferentes tipos de adición del fermento probiótico	131
2. Composición de los quesos	133
3. Análisis microbiológicos	137
4. Lipólisis	145
5. Contenido de colesterol	153
6. Transformación de azúcares	155
7. Análisis sensoriales	157
<b>6. Conclusiones</b>	
Conclusiones	165

## **7. Apéndice**

7.1. Concentraciones de ácidos grasos libres determinadas por cromatografía gaseosa en cada muestra individual para los ocho ensayos realizados	169
---	-----

## **8. Bibliografía**

Bibliografía	177
--------------	-----



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Géneros microbianos numéricamente dominantes en el tracto gastrointestinal humano adulto.	09
<b>Figura 2.</b> Evolución del pH en los quesos T de todos los ensayos.	82
<b>Figura 3.</b> Evolución del pH en los quesos tipo E1 de todos los ensayos.	83
<b>Figura 4.</b> Evolución del pH en los quesos tipo E2 de todos los ensayos.	83
<b>Figura 5.</b> Recuentos microbiológicos de los fermentos primario y probióticos en los quesos correspondientes a los 8 ensayos.	84
<b>Figura 6.</b> Cromatograma típico donde se observan los picos correspondientes a los nueve ácidos grasos cuantificados, los ácidos enántico y margárico y el ácido butírico	92
<b>Figura 7.</b> Representación gráfica de las concentraciones de ácidos grasos libres totales para los quesos de los 8 ensayos.	95
<b>Figura 8.</b> Concentraciones de ácidos grasos libres correspondientes al Ensayo 1.	97
<b>Figura 9.</b> Concentraciones de ácidos grasos libres correspondientes al Ensayo 2.	99
<b>Figura 10.</b> Concentraciones de ácidos grasos libres correspondientes al Ensayo 3.	100
<b>Figura 11.</b> Concentraciones de ácidos grasos libres correspondientes al Ensayo 4.	101
<b>Figura 12.</b> Concentraciones de ácidos grasos libres correspondientes al Ensayo 5.	103
<b>Figura 13.</b> Concentraciones de ácidos grasos libres correspondientes al Ensayo 6.	104
<b>Figura 14.</b> Concentraciones de ácidos grasos libres correspondientes al Ensayo 7.	105
<b>Figura 15.</b> Concentraciones de ácidos grasos libres correspondientes al Ensayo 8.	107
<b>Figura 16.</b> Análisis por componentes principales de los perfiles de AGL de los 8 Ensayos, a 3 y 60 días de maduración. Gráfico de <i>loadings</i> o cargas factoriales.	110
<b>Figura 17.</b> Análisis por componentes principales de los perfiles de AGL de los 8 ensayos, a 3 y 60 días de maduración. Gráfico de <i>scores</i> o puntajes.	111
<b>Figura 18.</b> Análisis por componentes principales de los perfiles de AGL de los 8 ensayos, a 60 días de maduración. Gráfico de <i>loadings</i> o cargas factoriales.	113
<b>Figura 19.</b> Análisis por componentes principales de los perfiles de AGL de los 8 ensayos, a 60 días de maduración. Gráfico de <i>scores</i> o puntajes.	114
<b>Figura 20.</b> Contenido de colesterol en quesos Pategrás.	115
<b>Figura 21.</b> Ensayo sensorial de aceptabilidad de quesos Pategrás con adición de <i>Lactobacillus acidophilus</i> A (Ensayo 1, E1 y E2) y sin adición de probióticos (T).	127
<b>Figura 22.</b> Ensayo sensorial de aceptabilidad de quesos Pategrás con adición del	

fermento probiótico mixto (Ensayo 8, E1 y E2) y sin adición de probióticos (T).	128
<b>Figura 23.</b> Ensayo sensorial de aceptabilidad de quesos Pategrás con adición de <i>Bifidobacterium lactis</i> (Ensayo 4, E1), <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (Ensayo 2, E1) y sin adición de probióticos (T).	130

---

### TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Estudios reportados y efectos científicamente establecidos de algunas cepas probióticas disponibles comercialmente.	28
<b>Tabla 2.</b> Cepas probióticas incorporadas en quesos (ensayos en orden cronológico).	56
<b>Tabla 3.</b> Descriptores utilizados para el análisis sensorial descriptivo de quesos.	75
<b>Tabla 4.</b> Escala hedónica utilizada para la evaluación sensorial de aceptabilidad.	76
<b>Tabla 5.</b> Composición y pH de los quesos testigo (T), experimental 1 (E1) y Experimental 2 (E2) en los 8 ensayos.	79
<b>Tabla 6.</b> Ácidos grasos libres totales para los quesos de los 8 ensayos a 3 y 60 días de maduración.	94
<b>Tabla 7.</b> ANOVA realizado para determinar diferencias significativas en las concentraciones de cada AGL entre 3 y 60 días de maduración, para el Ensayo 1.	97
<b>Tabla 8.</b> ANOVA realizado para determinar diferencias significativas en las concentraciones de cada AGL entre 3 y 60 días de maduración, para el Ensayo 2.	99
<b>Tabla 9.</b> ANOVA realizado para determinar diferencias significativas en las concentraciones de cada AGL entre 3 y 60 días de maduración, para el Ensayo 4.	101
<b>Tabla 10.</b> ANOVA realizado para determinar diferencias significativas en las concentraciones de cada AGL entre 3 y 60 días de maduración, para el Ensayo 5.	103
<b>Tabla 11.</b> ANOVA realizado para determinar diferencias significativas en las concentraciones de cada AGL entre 3 y 60 días de maduración, para el Ensayo 7.	105
<b>Tabla 12.</b> ANOVA realizado para determinar diferencias significativas en las concentraciones de cada AGL entre 3 y 60 días de maduración, para el Ensayo 8.	107
<b>Tabla 13.</b> Análisis sensoriales descriptivos en quesos Pategrás con y sin adición de probióticos. Atributos sensoriales visuales, de aroma y de sabor.	119
<b>Tabla 14.</b> Análisis sensoriales descriptivos en quesos Pategrás con y sin adición de probióticos. Atributos sensoriales de textura.	123
<b>Tabla 15.</b> Puntajes medios ponderados para ensayos sensoriales de aceptabilidad en quesos Pategrás con y sin adición de probióticos	125

## ABREVIATURAS

**AC:** análisis de cluster.

**ACP:** análisis por componentes principales.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**AGL:** ácidos grasos libres.

**ANOVA:** análisis de la varianza.

**APC:** agar para recuento en placa; acrónimo del inglés *agar plate count*.

**ARN:** ácido ribonucleico.

**ATCC:** colección Americana de cultivos tipo; acrónimo del inglés: *American Type Culture Collection*.

**CLA:** ácidos linoleicos conjugados; acrónimo del inglés: *conjugated linoleic acid*.

**cm:** centímetro/s.

**CP:** componente principal.

**DO:** densidad óptica.

**E1:** queso experimental 1.

**E2:** queso experimental 2.

**FOS:** fructo-oligosacáridos.

**g:** gramo/s.

**GRAS:** generalmente reconocidas como seguras; acrónimo del inglés: *Generally Recognized As Safe*

**h:** hora/s.

**HTST:** alta temperatura, corto tiempo; acrónimo del inglés: *High Temperature, Short Time*.

**IDF:** Federación Internacional de la Lechería; acrónimo del inglés *International Dairy Federation*.

**Ig:** inmunoglobulina.

**IMCU:** Unidad internacional de coagulación de leche; acrónimo del inglés: *International Milk Clotting Unit*.

**Kg:** kilogramo/s.

**L:** litro/s.

**LPL:** lipoproteína lipasa.

**LSD:** mínima diferencia significativa; acrónimo del inglés: *least significant difference*.

**mg:** miligramo/s.

**µg:** microgramo/s.

**mL:** mililitro/s.

**µL:** microlitro/s.

**mol% C+G:** composición molar porcentual del ácido desoxirribonucleico en citosina y guanina, con respecto al total de bases nitrogenadas.

**MRS:** De Man, Rogosa and Sharpe (medio de cultivo utilizado para lactobacilos).

**NAD<sup>+</sup>/NADH:** nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada/reducida)

**NSLAB:** bacterias lácticas no pertenecientes al fermento primario; acrónimo del inglés: *non starter lactic acid bacteria*.

**NS-pH 4,6:** nitrógeno soluble a pH 4,6.

**NT:** nitrógeno total.

**% (p/p):** porcentaje de peso en peso (gramos/100 gramos).

**ppm:** partes por millón.

**psig:** libras por pulgada cuadrada manométrica; acrónimo del inglés: *pounds per square inch gauge*.

**% (p/v):** porcentaje de peso en volumen (gramos/100 mililitros)

**SLG:** sustrato lácteo graso.

**T:** queso testigo.

**UFC:** unidades formadoras de colonias.

**UV:** ultravioleta.

### **Nomenclatura de ácidos grasos:**

**C<sub>6:0</sub>:** ácido caproico

**C<sub>7:0</sub>:** ácido enántico

**C<sub>8:0</sub>:** ácido caprílico

**C<sub>10:0</sub>:** ácido cáprico

**C<sub>12:0</sub>:** ácido láurico

**C<sub>14:0</sub>:** ácido mirístico

**C<sub>16:0</sub>:** ácido palmítico

**C<sub>17:0</sub>:** ácido margárico

**C<sub>18:0</sub>:** ácido esteárico

**C<sub>18:1</sub>:** ácido oleico

**C<sub>18:2</sub>:** ácido linoleico

## **Resumen y Abstract**

## Resumen

Existe actualmente una tendencia mundial creciente al consumo de alimentos que de alguna manera mejoren la salud o el estado fisiológico del individuo. Dentro de estos alimentos, denominados funcionales, una gran fracción corresponde a aquéllos con adición de probióticos. Los mismos pueden considerarse, aunque poseen numerosas definiciones, microorganismos vivos que, administrados en dosis adecuadas, confieren un efecto beneficioso al huésped. En general se trata de cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y diversas especies de *Bifidobacterium*, aisladas de heces de humanos. Sin embargo, no todas las cepas de estas especies pueden considerarse probióticas, ya que para ello deben cumplir requisitos de bioseguridad, tecnológicos (supervivencia en el alimento en al menos  $10^7$  UFC  $g^{-1}$  o  $mL^{-1}$ ), biológicos (resistencia al pasaje gastrointestinal), y probióticos, entre los cuales podemos mencionar la mejora de la intolerancia a la lactosa, prevención y tratamiento de infecciones gastrointestinales, reducción del colesterol, y prevención de cáncer y alergias, entre otros. Una cepa probiótica determinada normalmente cumple uno o unos pocos de tales efectos, y su eficacia debe ser documentada con experimentos en humanos bien diseñados. Aunque esto representó un problema durante muchos años, en la actualidad existen numerosas cepas probadamente probióticas, las cuales son muy utilizadas por la industria alimentaria, casi exclusivamente por el sector lácteo, para su incorporación en diversos productos.

Si bien los primeros alimentos probióticos conocidos (y aún ahora los principales) fueron las leches fermentadas, los quesos presentan muchas ventajas comparativas: el mayor pH y contenido de materia grasa, el menor potencial redox y una matriz sólida resultarían protectivos para las bacterias probióticas. De esta manera, estos cultivos se han ido incorporando en una gran variedad de quesos, por ejemplo Cheddar, Crescenza, Gouda, Cottage, Fresco (en Argentina) y Minas, entre otros. Estos productos han resultado, en general, exitosos desde el punto de vista de la supervivencia de los probióticos durante la maduración. Un factor importante a tener en cuenta es la forma de agregado de los fermentos probióticos durante la elaboración, ya que la misma puede afectar tanto la supervivencia como la expresión bioquímica de dichas cepas a lo largo de la maduración. Además, se debe contar con métodos confiables de identificación y recuento en la matriz alimentaria.

Por otro lado, en quesos probióticos no se ha prestado mayor atención a otros aspectos esenciales que definen su calidad, tales como buenos parámetros sensoriales,

tanto de textura como de aroma y sabor, que derivan de un correcto balance en la compleja serie de reacciones químicas que se producen durante la maduración. Estas reacciones comprenden, a grandes rasgos, la transformación de los azúcares residuales, el catabolismo del citrato, la proteólisis, la lipólisis y el catabolismo de los ácidos grasos libres, y pueden ser altamente influenciados por la presencia de bacterias probióticas.

El sector lácteo tiene un impacto significativo en la economía argentina, y dentro de los quesos semiduros, el Pategrás es la variedad más importante. A pesar de que las tendencias de mercado actuales impulsan el desarrollo de productos con alto valor agregado, en Argentina no existen antecedentes de quesos semiduros probióticos. Es por ello que en el presente trabajo de Tesis se planteó la elaboración de quesos Pategrás a escala planta piloto, con la adición de diversas bacterias probióticas como fermentos adjuntos, con el objetivo de verificar su viabilidad y analizar su influencia sobre las transformaciones de la materia grasa y de los azúcares durante la maduración. Asimismo, el trabajo se complementó con la determinación de las características sensoriales al final de la maduración en quesos con bacterias probióticas, a fin de determinar diferencias con el queso Pategrás elaborado de forma tradicional.

Los probióticos estudiados fueron seis cepas comerciales (*Lactobacillus acidophilus* A, B y C, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium lactis*) y una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* previamente aislada y caracterizada en nuestro laboratorio. Las cepas se utilizaron, en forma individual, en cada uno de siete ensayos llevados a cabo. Se realizó un octavo ensayo con una mezcla de tres cepas probióticas (*Lactobacillus acidophilus* C, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis*), teniendo en cuenta la selección de una cepa de cada grupo microbiano. En un mismo día se elaboraron un queso testigo (T), siguiendo el protocolo de elaboración del queso Pategrás Argentino tradicional, y dos quesos experimentales: ya sea con adición directa de probióticos en forma liofilizada (E1), o con incubación previa en un sustrato lácteo graso (E2). En los tres tipos de queso se utilizó *Streptococcus thermophilus* como fermento primario de acidificación. Este esquema se repitió en tres días diferentes (réplicas) por ensayo.

Los quesos obtenidos, de aproximadamente 4 Kg, se maduraron a 12°C y 80% de humedad relativa durante 60 días, y se realizaron diversos ensayos a lo largo de la maduración. La composición global (extracto seco, materia grasa y proteínas totales) se determinó a los 3 días, excepto el contenido de sal que se analizó a los 30 días. La evolución del pH se determinó a 3, 30 y 60 días. Se realizaron recuentos celulares de los

fermentos primario y probiótico a los 0, 3, 15, 30, 45 y 60 días. Las transformaciones de la materia grasa se controlaron mediante la cuantificación de los ácidos grasos libres (AGL) y el contenido de colesterol a 3 y 60 días. El contenido de galactosa y de azúcares reductores se determinó a los 60 días. En forma complementaria a los análisis físicoquímicos, en los quesos ya maduros se realizaron evaluaciones sensoriales descriptivas de atributos sensoriales de color, aroma, sabor y textura, empleando un panel de evaluadores entrenados en degustación de quesos, y una encuesta sensorial de preferencia, con un grupo de personas no entrenadas. Todos los resultados se analizaron empleando herramientas estadísticas adecuadas.

Los parámetros de composición global analizados se encontraron dentro de los límites normales para este tipo de queso, y no se presentaron diferencias significativas entre quesos testigo y experimentales. El pH, por otro lado, presentó ligeras diferencias en algunas de las experiencias, tendiendo a ser los quesos experimentales algo más ácidos, en especial los quesos E2. Sin embargo, estas diferencias no se mantuvieron en ningún caso a lo largo de toda la maduración, y sólo fueron significativas al momento del consumo del producto (60 días) para *Lactobacillus acidophilus* B, en ambos quesos experimentales.

Todas las cepas probióticas mostraron una buena retención en la cuajada durante las elaboraciones, con bajos niveles de pérdida en suero. Se observó un crecimiento durante los primeros 3 días de maduración, en mayor o menor medida de acuerdo a la cepa, y un mantenimiento de niveles mayores al mínimo recomendado en quesos ( $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> o g<sup>-1</sup>) hasta los 60 días. Las máximas poblaciones celulares se alcanzaron para las cepas del grupo de *Lactobacillus casei*, siguiendo en orden de magnitud *Lactobacillus acidophilus*, y finalmente *Bifidobacterium lactis*. La viabilidad de las cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* C y *Bifidobacterium lactis* no fue sensiblemente distinta entre los quesos donde se estudiaron individualmente y combinadas. Con respecto a la metodología de adición, no se encontraron diferencias de concentración entre quesos experimentales E1 y E2, para ninguna de las cepas probióticas estudiadas. En todos ensayos se observaron concentraciones del fermento primario altas ( $>10^8$  UFC g<sup>-1</sup>) e iguales entre quesos testigo y experimentales, no siendo afectado por la presencia de bacterias probióticas, durante toda la maduración.

Puede considerarse que ninguna de las cepas probióticas modificó la magnitud ni el perfil de liberación de ácidos grasos del queso Pategrás elaborado de manera tradicional. Todos los quesos presentaron a los 3 días un perfil de AGL similar al



correspondiente al de la grasa de leche. En los quesos testigo de 60 días, se observaron leves incrementos en los AGL, característicos de la maduración de este tipo de queso, que no posee fuertes agentes lipolíticos. Asimismo, todos los quesos con cepas probióticas presentaron perfiles similares a los quesos testigo correspondientes, lo cual era previsible debido a que estos microorganismos poseen muy baja o nula actividad lipolítica. No se observó ninguna reducción en el contenido de colesterol en quesos elaborados con las cepas *Lactobacillus acidophilus* A, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis*, entre el inicio y el final de la maduración, por lo que se concluye que dichas cepas no pueden metabolizar este compuesto durante la maduración del queso Pategrás.

Las concentraciones de azúcares reductores y galactosa fueron iguales entre sí en todos los quesos de 60 días analizados, por lo que concluimos que no hubo residuos de otros azúcares reductores (lactosa, glucosa) en ningún queso al final de la maduración. Los valores observados fueron extremadamente bajos en todos los tipos de queso. En quesos testigo, elaborados con *Streptococcus thermophilus* como único fermento, la casi ausencia de galactosa podría explicarse por el desarrollo de flora NSLAB, que llegó a niveles superiores a  $10^7$  UFC g<sup>-1</sup> a los 60 días. En quesos experimentales, la galactosa podría haberse metabolizado tanto por la flora NSLAB como por los probióticos utilizados como fermento adjunto, si bien este hecho no se pudo verificar.

Salvo excepciones, no se encontraron diferencias significativas en los puntajes asignados a los parámetros sensoriales descriptivos de apariencia, aroma y sabor (aspecto de la masa; color; aroma; gusto ácido; gusto a crema; gusto residual) y textura (elasticidad; cohesividad; corte; aspereza) entre quesos con y sin probióticos, tanto cuando se utilizó *Bifidobacterium lactis*, diversas especies de *Lactobacillus* (*L. acidophilus* A y C, *L. paracasei*) o la mezcla de tres cepas. Por otro lado, la encuesta de aceptabilidad realizada entre 114 personas arrojó resultados positivos, que permitirían inferir que la comercialización de quesos Pategrás con la adición de tales cepas probióticas no se vería negativamente afectada por el gusto del consumidor promedio, con relación al queso tradicional. En efecto, la aceptabilidad resultó positiva y similar a la correspondiente a los quesos testigo; de entre el 71,0% y el 89,4%, con una media cercana al 80%. Un promedio ponderado de cada muestra ubicó a todos los quesos utilizados para la encuesta, tanto testigos como experimentales, entre las opciones “me gusta poco” y “me gusta moderadamente”, no registrándose tampoco diferencias significativas de acuerdo a la forma de adición de los probióticos.

Como conclusión general podemos decir que el queso Pategrás resultó un muy buen vehículo para el agregado de bacterias probióticas, ya que: i) se logró la incorporación exitosa de siete cepas probióticas y una combinación de tres de ellas empleando una metodología simple; ii) todas mantuvieron niveles de viabilidad mayores a los mínimos recomendados para un alimento probiótico, durante un período de maduración de 60 días; iii) excepto un caso aislado, no se observó una acidificación mayor a la de los quesos testigo, en el momento del consumo del producto; iv) no se modificaron las características típicas del queso Pategrás Argentino, en lo referente a la liberación de ácidos grasos durante la maduración y v) se verificaron buenas características sensoriales en los quesos con adición de probióticos, y una aceptabilidad media-alta por parte del público en general.

Teniendo en cuenta el actual desarrollo en el campo de los alimentos funcionales y la existencia de un único queso probiótico en nuestro país, que además no se ha caracterizado desde el punto de vista de sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales, podemos decir que el aporte realizado por el presente trabajo para el desarrollo de un producto novedoso ha sido significativo.

## **Abstract**

Nowadays, there are worldwide trends in favor to the consumption of foods that improve in some way the physiological state and health of human beings. Among these foods, called functional foods, one large proportion corresponds to those with addition of probiotics. Although the term “probiotic” has been given numerous definitions, it can be regarded as “living microorganisms that, when administered in correct doses, exert a positive effect to the host”. They comprise mainly strains of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, and several species of *Bifidobacterium*, isolated from human faeces. However, not all the strains belonging to these species can be considered probiotics, as long as they must fulfill requirements of safety, technological (survival at a minimum rate of  $10^7$  UFC  $g^{-1}$  or  $mL^{-1}$  in the product where they are incorporated), biological (resistance during the gastrointestinal passage), and are supposed to have probiotic effects, such as improvement of lactose intolerance, prevention and treatment of diarrhoea and gastrointestinal infections, reduction of blood cholesterol levels, and prevention of cancer and allergies, among others. One given probiotic strain is likely to possess just one or a few of these probiotic effects, and its efficacy is required to be proved and documented with positive results from well-designed human tests. For many years, it was difficult to conduct such assays. Nevertheless, at the present time there is a high number of strains whose probiotic properties have been perfectly established, which are being widely used by food industry, mainly by the dairy sector, for its incorporation on an immense variety of commercial products.

In spite of the fact that the first probiotic foods ever known (and still now being the main group) were fermented milks, cheeses present several advantages as a vehicle for delivering of probiotic cultures: the higher pH and fat content, lower redox potential and a solid matrix would protect probiotic cultures against the environment. Hence, probiotics have increasingly been incorporated in a wide variety of cheeses, such as Cheddar, Crescenza, Gouda, Cottage, Fresco (in Argentina) and Minas, among others. These products were successful from the point of view of the survival of probiotics during ripening. The methodology utilized for addition of probiotic cultures during cheese-making is a major variable to take into account, as it could influence the survival of such strains, and the expression of different biochemical pathways throughout ripening. Besides, reliable methods for counting and identification in the food matrix are mandatory.

On the other hand, not much attention has been paid to some key features that outline the quality of probiotic cheeses, such as sensory parameters of texture and flavor, which in turn are the result of a correct balance within the complex series of chemical reactions that takes place during ripening. These reactions involve the degradation of residual carbohydrates, citrate catabolism, proteolysis, lipolysis and free fatty acids catabolism, and can be highly influenced by the presence of probiotics.

The dairy sector has a major impact on the Argentinean economy, and Pategrás Argentino is the main variety produced within the semi-hard cheeses segment. Even when the current marketing trends encourage the development of high added value products, there is no background of probiotic semi-hard cheeses production in Argentina. Given these facts, in the present work it has been planned the making of Pategrás Argentino cheeses at pilot plant scale, with addition of probiotics as secondary adjuncts, so as to verify their viability and analyze their influence on the fat and sugar degradation during ripening. Moreover, the work was enriched with sensory analyses conducted at the end of ripening in some of the probiotic cheeses, in order to detect differences with respect to the Pategrás cheese manufactured by using the standard technology.

Six commercially available probiotic strains (*Lactobacillus acidophilus* A, B and C, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis*) and one strain of *Lactobacillus rhamnosus*, previously isolated and characterized in our laboratory, were studied. Each probiotic strain was individually assayed in each of seven cheese-making trials, and an additional trial was conducted in order to test a combination of three strains (*Lactobacillus acidophilus* C, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*), one from each probiotic group. One control cheese without probiotics (T), and two cheeses with addition of probiotic cultures, either as a lyophilized culture (E1) or after a preincubation step in a milk-milk fat substrate (E2), were manufactured per day. *Streptococcus thermophilus* was used as primary acidification culture in all the cheeses. This scheme was performed in triplicate (in different days) per trial.

Cheeses obtained, of about 4 Kg, were ripened at 12°C and 80% relative humidity for 60 days, and different analyses were performed throughout ripening. Cheese composition (dry matter, fat matter and protein content) was assessed at 3 days, except salt content, determined in 30-day-old cheese samples. pH evolution was followed at 3, 30 and 60 days. The survival of primary and probiotic cultures was

determined at 0, 3, 15, 30, 45 and 60 days. Fat changes were evaluated by means of free fatty acids (FFA) and cholesterol assessments, at 3 and 60 days of ripening. Galactose and reducing sugars were quantified in 60-day-old cheeses. Additionally, descriptive sensory analyses (appearance, flavour, and texture) and an opinion poll, performed by trained and non-trained people, respectively, were conducted on mature cheeses. All the results were processed using suitable statistics techniques.

Gross composition was inside the ranges established for this type of cheese, significant differences were not found between control and probiotic cheeses. pH, instead, showed few slightly differences, some probiotic cheeses tending to be more acid, especially E2. However, those differences were not present all through the ripening, and in 60-day cheeses accounted only for cheeses E1 and E2 with *Lactobacillus acidophilus* B.

All the probiotics showed a good retention in the curd, with low losses in whey during cheese manufacture. A general increase in the probiotic cell counts was observed during the first 3 days, which was variable according to the strain. From day 3 to 60 they remain quite constant, at levels always higher to the minimum recommended ( $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> o g<sup>-1</sup>). The highest populations were observed for the strains of *Lactobacillus casei* group, followed by *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacterium lactis* in the third place. Viability of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* C and *Bifidobacterium lactis* were not different when used either as a mixture culture or alone. Methodology of probiotic cultures addition (E1 versus E2) did not influence survival of probiotics in cheese, for any of the strains studied. Primary starter was found in similar concentrations in cheeses with and without probiotics ( $>10^8$  UFC g<sup>-1</sup>) all along the ripening period.

None of the probiotic strains modified neither the amount nor the distribution of FFA of traditionally-made Pategrás cheese. FFA profiles at 3 days matched that of cow milk fat, in all cheeses. Control cheeses showed slight increases in FFA up to 60 days, which is typical of cheeses without strong lipolytic agents. In the same way, FFA profiles for probiotic cheeses were similar to those ones for control cheeses, which was not surprising as probiotics are known to possess a rather low lipolytic activity. Cheeses with *Lactobacillus acidophilus* A, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis* did not undergo a decrease in cholesterol content from 3 to 60 days, so we concluded that such strains are not capable to metabolize cholesterol during ripening of Pategrás cheese.

Concentrations of galactose were extremely low and almost the same as those of reducing sugars, in all the samples analyzed. Hence, we assumed that there were no residues of other reducing sugars (lactose, glucose) in mature cheeses. In control cheeses, made only with *Streptococcus thermophilus* as starter, NSLAB microflora ( $>10^7$  UFC g<sup>-1</sup> at 60 days) could have metabolized most of the initial galactose, while in probiotic cheeses its metabolization could have been carried out either by probiotic bacteria or NSLAB microflora, which could not be verified.

With the exception of a small number of cases, there were no differences between control and probiotic cheeses, for scores assigned to descriptive sensory parameters of either appearance, aroma and flavour (general aspect, colour, aroma, acid taste, cream taste, residual taste) or texture (elasticity, cohesiveness, cutting properties, roughness). This applies to cheeses manufactured with *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus* A and C, *Lactobacillus paracasei*, and the mixture of three strains. On the other hand, the opinion poll conducted on 114 people showed optimistic results, according with which the marketing of Pategrás cheeses with addition of probiotics would not be negatively affected by average consumer preferences, as compared with traditional Pategrás cheese. Actually, the acceptance was positive and similar to that of control cheeses, between 71,0% and 89,4%, with an average value of about 80%. Grade point averages defined all the cheeses used in the survey (both control and probiotic), between the pre-defined options “like slightly” and “like moderately”, not existing differences due to the probiotic addition methodology.

As a general conclusion, Pategrás cheese was an appropriate food for delivering of probiotics, since: i) one probiotic addition methodology was simple and successful; ii) viability of probiotic cultures always exceeded minimum levels recommended for a probiotic food, all through the ripening period; iii) despite one single case, acidification was not higher in mature probiotic cheeses; iv) typical FFA release during the ripening of Pategrás cheese was not modified by probiotic addition, and v) probiotic cheeses showed good sensory attributes and a quite high acceptance by normal consumers.

Taking into account the current development in the functional foods area, and the occurrence of only one probiotic cheese in the argentinean market, which in addition has not been characterized from the physicochemical and sensory point of view, we can state that this work has significantly contributed to the development of a novel product with enhanced characteristics.

# **1. Introducción**

## 1. Nutracéuticos y alimentos funcionales

### 1.1. Definiciones

En la actualidad existe una proporción creciente de la población mundial más preocupada que nunca antes por su estado de salud. Esto se debe probablemente a un progresivo conocimiento sobre las enfermedades responsables de la mayor cantidad de muertes en el mundo desarrollado, y cuya prevención y tratamiento depende en gran medida de la alimentación y del estilo de vida, entre las que podemos citar enfermedades coronarias, cáncer, osteoporosis, artritis y diabetes tipo II. Esta toma de conciencia está acoplada con la expansión de vehículos educativos (diarios, revistas, programas de televisión y, por sobre todo, Internet) dedicados a llamar la atención entre las estrechas relaciones dieta-salud. Existen numerosas páginas de Internet desarrolladas por agencias gubernamentales que proveen invaluable información respecto de la etiología, prevención y tratamiento de varias enfermedades, entre las que podemos citar las correspondientes al Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA; [www.nal.usda.gov](http://www.nal.usda.gov)) y organizaciones tales como la Asociación Americana del Corazón ([www.americanheart.org](http://www.americanheart.org)) y la Sociedad Americana de Cáncer ([www.cancer.org](http://www.cancer.org)).

Otra razón para la toma de conciencia colectiva es tal vez el crecimiento relativo del sector de la población con edad avanzada. Paralela al envejecimiento poblacional, sobreviene una elevada incidencia de las enfermedades mencionadas anteriormente, y esto enfoca el interés científico especialmente hacia la prevención y tratamiento de dichos desórdenes de la salud. Numerosas empresas internacionales han reconocido un mercado en pleno desarrollo en este ámbito, y han invertido millones de dólares para la investigación de compuestos nutracéuticos, y el desarrollo y comercialización de nuevos productos llamados alimentos funcionales. Llegados a este punto, es importante aclarar el significado de dos términos importantes: nutracéuticos y alimentos funcionales.

El concepto de nutracéutico puede definirse de la siguiente manera:

*“Químicos encontrados como componentes naturales de alimentos u otra forma comestible, que se ha comprobado que son beneficiosos para el cuerpo humano previniendo o tratando una o más enfermedades, o mejorando el estado fisiológico. Los nutrientes esenciales pueden ser considerados nutracéuticos si proveen un beneficio adicional a su rol en el crecimiento normal o mantenimiento del cuerpo humano”* (Wildman, 2001a).

Por otro lado, una definición de alimentos funcionales puede ser la siguiente:



*“Un alimento, natural o formulado, el cual mejora el estado fisiológico o previene o trata enfermedades y desórdenes. Los alimentos funcionales incluyen aquellos desarrollados con el propósito de mejorar tanto la salud como el estado fisiológico. El Instituto de Alimentos Medicinales y Consejo de Nutrición definió a los alimentos funcionales como cualquier alimento o ingrediente alimentario que puede proveer un beneficio a la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contiene”* (Wildman, 2001a).

## **1.2. Historia**

La noción de que determinados alimentos pueden utilizarse en la prevención y/o tratamiento de diversas enfermedades data de mucho tiempo atrás. Hace más de 2500 años, Hipócrates proclamó: “Dejemos que los alimentos sean la medicina y la medicina los alimentos” (Wildman, 2001a). La fascinación por la naturaleza y la utilización médica y espiritual de plantas fueron comprobadas en las civilizaciones egipcia, griega y romana. Sin embargo, es probable que nuestros antepasados hayan considerado los resultados de carácter mágico y sobrenatural. El término “nutracéutico” y su campo de investigación son conceptos modernos. Los primeros conocidos, al menos en el mundo occidental, fueron las fibras y  $\beta$ -caroteno provenientes de las plantas, y los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3. Recién en las últimas décadas del siglo veinte los científicos fueron capaces de aislar concretamente componentes de los alimentos y llevar a cabo investigaciones de laboratorio y clínicas de manera correcta, para comprobar la eficacia de los nutracéuticos. Al día de hoy, el número de nutracéuticos reportados asciende a varios cientos de compuestos (Wildman, 2001b).

## **1.3. Clasificación**

Dependiendo del interés de cada persona, el esquema de clasificación para los nutracéuticos puede variar. Por ejemplo, los médicos cardiólogos u oncólogos pueden estar más interesados en sus efectos quimiopreventivos o terapéuticos, mientras que los científicos que trabajan en el desarrollo de alimentos pueden tener en cuenta no sólo sus efectos fisiológicos, sino también su estabilidad, las propiedades sensoriales del alimento en que se encuentran, y la relación costo-beneficio de su utilización (Wildman, 2001b). De esta manera, las formas más conocidas de clasificación para los nutracéuticos están basadas en el tipo de alimento que los contiene, en su mecanismo de acción o bien de acuerdo a su naturaleza química.

Un esquema de clasificación basado en el tipo de alimento en que se encuentran, distingue entre nutraceuticos provistos por plantas, animales o microorganismos (bacterias y levaduras). Sin embargo, la fuente alimentaria puede no ser el organismo de origen, por ejemplo en el caso de los ácidos linoleicos conjugados (CLA), los cuales forman parte de la grasa láctea pero son producidos por bacterias en el rumen de la vaca. Por otro lado, un mismo componente puede estar presente en alimentos de origen vegetal, animal o microbiano, aunque normalmente en diferentes concentraciones. Es por eso que existe otro esquema, basado también en el tipo de alimento, que agrupa nutraceuticos teniendo en cuenta sólo aquellos alimentos que los contienen en proporción relativamente elevada, lo cual resulta más apropiado cuando se desea investigar un compuesto o grupo de compuestos en particular.

Otra forma de clasificar nutraceuticos es de acuerdo a su mecanismo de acción. Este sistema no tiene en cuenta la fuente alimentaria, pero sí las propiedades fisiológicas. Este modelo resulta muy útil, por ejemplo, para una persona que está genéticamente predispuesta a padecer determinadas enfermedades.

Por último, la categorización basada en la naturaleza química de cada nutraceutico, permite realizar una clasificación grosera en varios grupos grandes, una subclasificación posterior en grupos menores, y así sucesivamente. Una primera clasificación podría comprender los siguientes grupos mayoritarios (Wildman, 2001b):

- \* Derivados isoprenoides
- \* Sustancias fenólicas
- \* Ácidos grasos y lípidos estructurales
- \* Hidratos de carbono y derivados
- \* Derivados de aminoácidos
- \* Microorganismos (probióticos)
- \* Minerales

Mientras que los demás grupos incluyen moléculas o elementos, los microorganismos implican la utilización de células intactas (probióticos), así como también sustancias promotoras del crecimiento de dichos microorganismos, denominadas prebióticos.

#### **1.4. Funciones**

Los efectos positivos sobre la salud que poseen diferentes compuestos nutraceuticos constituyen un conjunto muy amplio y diverso. Resulta interesante que

algunos compuestos poseen más de un mecanismo de acción, siendo una de las familias de compuestos más versátiles desde este punto de vista los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 (Wildman, 2001b).

Partiendo de la clasificación anterior, de acuerdo a su naturaleza química, podemos mencionar uno o más efectos atribuidos a cada grupo de nutraceuticos. Dentro de los derivados isoprenoides, se encontró una acción inhibidora del crecimiento de tumores en animales expuestos a carcinógenos y precarcinógenos (Crowell y Elson, 2001). Los carotenoides, incluidos dentro de este grupo, poseen una actividad antioxidante que supone un efecto supresor de radicales libres, capaces de oxidar lípidos insaturados, y una acción protectora del ADN frente al ataque por radicales libres, bloqueando de esta manera el desarrollo de aterogénesis y cáncer, respectivamente (Faulks y Southon, 2001).

Los compuestos fenólicos constituyen una familia muy diversa que incluye antocianinas, cumarinas, flavonoides, taninos y lignina. Se observó que la proteína de soja rica en isoflavonas afecta favorablemente la densidad mineral ósea, previniendo de esta manera la osteoporosis (Potter y col., 1998), y los compuestos flavonoides en general parecen tener una acción antioxidante que podría tener efecto sobre la salud humana (DiSilvestro, 2001).

Se ha encontrado una relación inversamente proporcional entre el consumo de fibra alimentaria vegetal, hidratos de carbono complejos no digeribles por los seres humanos, y el riesgo de padecer cáncer de colon (Spiller y Spiller, 2001). Estudios epidemiológicos extensivos han demostrado una reducción del riesgo de enfermedades coronarias asociada al consumo elevado de fibras (Anderson y Hanna, 1999; Wolk y col., 1999).

Dentro de los nutraceuticos de carácter lipídico encontramos a los ácidos grasos  $\omega$ -3, los cuales probaron, entre otras cosas, ser efectivos en la prevención de muerte súbita inducida por isquemia en animales (Billman y col., 1997) y tener un moderado efecto beneficioso en pacientes con artritis reumatoidea (Volker y Garg, 2001). A partir de estudios *in vitro* con líneas celulares de adenocarcinoma humano existen razones para creer, a pesar de no existir pruebas clínicas ni estudios epidemiológicos, que los esfingolípidos inhiben el cáncer de colon humano (Merrill y Schmelz, 2001). También dentro de esta categoría el ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado presente en altas concentraciones en el aceite de oliva, juega un papel fundamental en la reducción del

riesgo de enfermedades coronarias (Renaud y col., 1995) y cáncer, en especial cáncer de mama (Landa y col., 1994).

Con respecto a los minerales, varios de ellos han sido reconocidos por su potencial nutracéutico; el calcio sería el más importante por su relación con la salud ósea, el cáncer de colon y tal vez hipertensión y enfermedades cardiovasculares, y el potasio por su efecto antihipertensivo. La utilización como nutracéuticos de algunos oligoelementos tales como cobre, selenio, manganeso y zinc, en relación a su capacidad antioxidante cuando se encuentran como cofactores enzimáticos, se encuentra actualmente en discusión (Wildman, 2001b).

Finalmente encontramos a los nutracéuticos microbianos (probióticos) y los prebióticos, sustancias no digeribles que estimulan su crecimiento. Debido a la diversidad de efectos comprobados sobre la salud y a su relevancia en el marco de la presente Tesis, ambos conceptos serán extensivamente desarrollados más adelante.

## **2. El tracto gastrointestinal y su microbiota**

El cuerpo humano es el reservorio de alrededor de  $10^{14}$  bacterias, aproximadamente 10 veces el número de células que forman los tejidos del cuerpo. La mayoría de ellas se encuentra en el tracto gastrointestinal, especialmente en el colon, y se conocen como la microbiota intestinal (Salminen y Ouwehand, 2003). Se estima que las células bacterianas son responsables de la mitad del peso húmedo del contenido del colon (Isolauri y col., 2004). Frecuentemente se discute sobre la microbiota intestinal tratándola como si fuese una entidad definida. Sin embargo, la acumulación de datos científicos indica que esta comprende una mezcla dinámica de microorganismos, cuya composición varía tanto a lo largo del tracto gastrointestinal como entre el lumen y la mucosa (Isolauri y col., 2004).

### **2.1. Funciones de la microbiota intestinal**

La actividad metabólica de la microbiota intestinal es comparable con la del hígado, nuestro órgano metabólicamente más activo; se ha sugerido que puede incluso ser potencialmente mayor (Salminen y Ouwehand, 2003). El metabolismo bacteriano en el intestino está involucrado en la fermentación de fuentes de carbono exógenas y endógenas. La fermentación de diferentes tipos de oligosacáridos es beneficiosa para el huésped, ya que provee de energía de manera adicional bajo la forma de ácidos grasos

de cadena corta. De estos, el ácido butírico, como fuente de energía principal para el epitelio intestinal, es importante para mantener la salud de la mucosa en el colon (Brouns y col., 2002). Además, varios miembros de la población microbiana del intestino producen vitaminas (Isolauri y col., 2004). Sin embargo, la microbiota intestinal puede también utilizar otros sustratos tales como proteínas y aminoácidos, cuya fermentación puede generar una variedad de sustancias tóxicas que pueden actuar como inductores y promotores de tumores (Mykkänen y col., 1998).

Otra función esencial de la microbiota intestinal es la de proveer protección contra microorganismos externos. Diferentes estudios han demostrado que los animales criados en un ambiente libre de gérmenes son altamente susceptibles a infecciones; por consiguiente, la microbiota intestinal es considerada un componente esencial en la barrera de defensa de las mucosas. El fenómeno en cuestión se denomina “resistencia a la colonización”: las bacterias de la mucosa intestinal compiten con las bacterias patógenas por los mismos sitios de unión, usan los mismos nutrientes y producen varios compuestos que inhiben tanto el crecimiento de patógenos como de otras bacterias exógenas que pasan a través del tracto gastrointestinal y no son miembros residentes de la microbiota intestinal (Adlerberth y col., 2000).

Finalmente, la microbiota intestinal provee un estímulo importante para la maduración del sistema inmune. El sistema inmune está inmaduro en el recién nacido y se desarrolla tras la exposición a los microorganismos; la presencia de estos se relaciona con un incremento en el número de placas de Peyer y de células productoras de inmunoglobulina (Ig)A (Moreau, 2000), originando de ese modo la barrera inmunológica de la mucosa intestinal. El estudio de las interacciones entre las bacterias y el sistema inmune innato y adaptado de la mucosa, provee una base para conocer más a fondo cómo logra la microbiota intestinal alcanzar y mantener un estado de salud óptimo en el huésped, a pesar de la presencia constante en el lumen del intestino de una miríada de antígenos de origen alimentario y microbiano.

## **2.2. Factores que afectan la composición de la microbiota intestinal**

La microbiota intestinal se adquiere inmediatamente luego del nacimiento, y a partir de ese momento comienza a sufrir modificaciones en su composición; existen enormes variaciones a lo largo de la vida de una persona, pero especialmente durante los primeros años de vida (Mitsuoka, 1992). Durante la vida adulta, la microbiota intestinal es relativamente estable (Zoetendal y col., 1998). Sin embargo, se producen

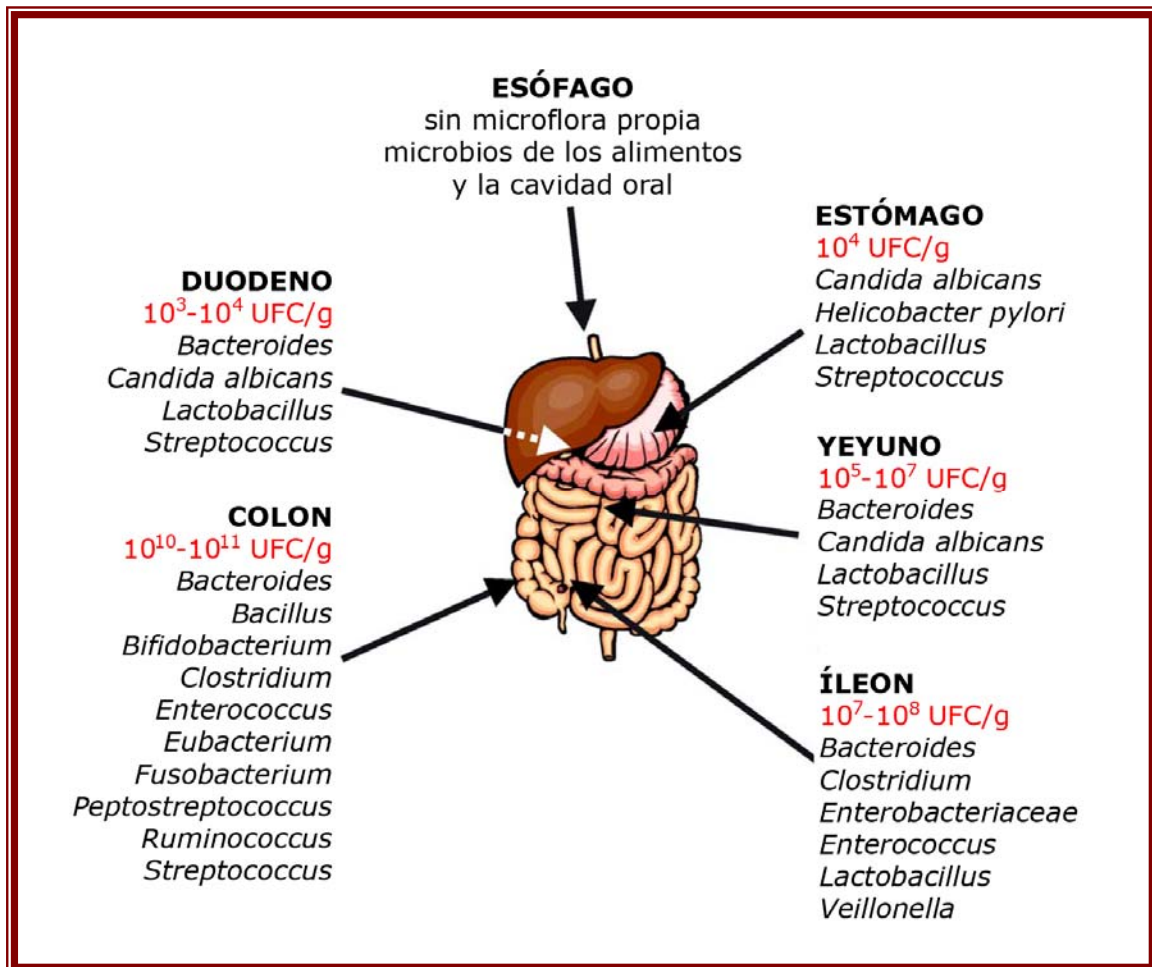
cambios nuevamente durante el envejecimiento; tanto los niveles como la diversidad de las bifidobacterias tienden a decaer (Mitsuoka, 1990; Hopkins y Macfarlane, 2002). Estas modificaciones están determinadas tanto por factores genéticos como ambientales, y es por eso que cada individuo, aún los gemelos homocigóticos, posee una microbiota característica y única (Zoetendal y col., 2001). En un primer estadio de vida, los factores claves para el establecimiento de la microbiota son las características genéticas y el tipo de parto, y a partir de allí son preponderantes otros factores tales como la composición de la dieta, terapias de antibióticos, infecciones, intoxicaciones alimentarias, medio ambiente y contaminación, stress, estado general de salud y envejecimiento (Salminen y Ouwehand, 2003).

Antes del parto el feto, incluyendo su intestino, es estéril. El parto natural expone al bebé a la microflora vaginal e intestinal, principalmente *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* y *Peptococcus*, que constituyen la principal fuente bacteriana que colonizará el intestino del recién nacido (Larsen y Monif, 2001). El parto por cesárea, sin embargo, expone al recién nacido directamente a los microbios del ambiente, lo cual altera el desarrollo normal de la microbiota (Grönlund y col., 1999). La colonización en este caso se realiza por pasos, inicialmente por anaerobios facultativos tales como enterobacterias, coliformes y lactobacilos, y luego por bifidobacterias y bacterias lácticas. La falla de una sucesión controlada de pasos puede culminar en el desarrollo de enfermedades infecciosas, inflamatorias y alérgicas en la vida adulta (Isolauri y col., 2004).

La contribución de la dieta es especialmente importante para el desarrollo de la microflora en los primeros años de vida. Métodos moleculares han determinado que las bacterias lácticas están presentes en proporciones menores al 1% de la microbiota intestinal en neonatos, mientras que las poblaciones de bifidobacterias alcanzan entre el 60 y el 90% (Favier y col., 2002; Vaughan y col., 2002). La alimentación con leche materna tiende a aumentar notablemente los niveles de bifidobacterias en el intestino del neonato en relación al empleo de leches maternizadas (Harmsen y col., 2000). Esto puede explicarse en parte debido a que la leche materna humana contiene factores de crecimiento específicos para bifidobacterias, que estimulan su crecimiento diferencial con respecto a otras bacterias intestinales, incluyendo *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis* (Shah y Lankaputra, 2003). Con la introducción de alimentos sólidos, la microbiota sufre un cambio dramático y se diversifica notablemente; aproximadamente a los 2 años de vida la diversidad es similar a la de un adulto (Favier y col., 2002).

La población microbiana en el intestino de una persona adulta resulta, por lo tanto, muy compleja y heterogénea, e incluye varios cientos de especies bacterianas diferentes. Aproximadamente 400 tipos de bacterias se han aislado de heces de humanos (Tannock, 1999). Como se dijo anteriormente, debido a los cambios en el ambiente a lo largo del tracto gastrointestinal, tanto la concentración como la composición bacteriana varían considerablemente. El elevado flujo digestivo en la parte superior del tracto gastrointestinal no permite la acumulación de una gran microbiota, a lo cual contribuyen las secreciones del estómago, hígado y páncreas (Isolauri y col., 2004). Así, en el estómago encontramos microorganismos en niveles entre  $10^3$  y  $10^4$ /g. La entrada al intestino está escasamente poblada y la microbiota está compuesta principalmente por anaerobios facultativos y estrictos, incluyendo estreptococos, *Bacteroides*, lactobacilos y levaduras (Isolauri y col., 2004). En la parte inferior del tracto gastrointestinal, el flujo digestivo se ralentiza y su composición es menos dañina para las bacterias, permitiendo el establecimiento de la microbiota. Debido a la total carencia de oxígeno en esta zona, las bacterias anaeróbicas predominan claramente frente a las aeróbicas (Tannock, 1999). De esta manera, en el colon encontramos bacterias en concentraciones de hasta  $10^{12}$ /g, siendo los géneros predominantes *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. y bifidobacterias, y en menor magnitud *Bacteroides*, *Clostridium*, *Peptococcus* y *Fusobacterium*, así como también eubacterias (Shah y Lankaputra, 2003). En la Figura 1 se presenta un esquema con los géneros microbianos dominantes a lo largo del tracto gastrointestinal.

También existen grandes diferencias entre el lumen y la mucosa; mientras que el ambiente del lumen es anaeróbico, en la mucosa es más bien microaerofílico debido al oxígeno liberado por los tejidos. Por otro lado, células de la mucosa secretan sustancias antimicrobianas tales como lisozima y defensinas (Hornef y col., 2002), mientras que los enterocitos transportan IgA secretoria desde la lámina propia hacia el lumen (Lloyd, 2003). Esto se traduce en una composición microbiana diferente entre el lumen y la mucosa, y aún dentro de la misma especie encontramos diferentes cepas entre ambos compartimentos (Nielsen y col., 1994).



**Figura 1.** Géneros microbianos numéricamente dominantes en el tracto gastrointestinal humano adulto (adaptado de Ouwehand y Vesterlund, 2003).

Enfermedades tanto gastrointestinales como extraintestinales pueden influenciar la microbiota, y viceversa. La enfermedad alterante de la microbiota intestinal más documentada es la diarrea infecciosa aguda (Isolauri y col., 2002a). Se han observado, por otra parte, menores niveles de bifidobacterias y mayores niveles de clostridios en niños alérgicos respecto de niños sanos (Isolauri y col., 2002b). Además, los niños alérgicos estaban colonizados principalmente con *Bifidobacterium adolescentis*, y los sanos mayormente con *B. bifidum* (Ouwehand y col., 2001). Estos dos grupos de bifidobacterias indujeron perfiles de citoquinas diferentes en estudios *in vitro* (He y col., 2002). De esta manera, se demuestra que la composición inicial de la microbiota intestinal puede afectar el desarrollo inmunológico del huésped aún antes de que el fenotipo de respuesta inmune esté bien consolidado (Isolauri y col., 2004).



### 2.3. Mejoramiento del balance microbiano intestinal

El crecimiento y la actividad metabólica de la microbiota intestinal tienen una gran influencia en nuestro bienestar fisiológico y nutricional. De acuerdo a la revisión realizada anteriormente, la microbiota intestinal cumple numerosas funciones dentro del organismo, y existe una estrecha asociación entre su composición y la presencia de enfermedades. Muchas de las especies que conforman la microbiota intestinal ejercen efectos beneficiosos sobre la salud; entre ellas se destacan los miembros de las especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Algunas otras especies, en cambio, bajo ciertas circunstancias, pueden potencialmente producir efectos nocivos, entre ellos algunas especies de clostridios, bacterias reductoras de sulfato y bacterias con capacidad fermentadora de aminoácidos (Salminen y Ouwehand, 2003). Un balance óptimo es aquel en el cual las bacterias beneficiosas predominan sobre las potencialmente dañinas; y por eso es lógico suponer que, si se pueden tomar medidas efectivas con el objetivo de modificar de manera inteligente tal balance, las mismas resultarán en un claro beneficio para la salud (Salminen y Ouwehand, 2003). Hasta el momento, se han encontrado dos métodos efectivos para lograr tal cometido: la modificación directa de la microbiota intestinal a través de la incorporación de microorganismos (probióticos), principalmente bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y el uso de prebióticos, ingredientes alimentarios no digeribles que actúan de manera indirecta favoreciendo la proliferación selectiva *in vivo* de determinadas bacterias probióticas con respecto a las demás. A continuación se tratarán en detalle estas metodologías.

## 3. Probióticos

### 3.1. Historia

La idea de que la ingesta de bacterias vivas podría modular la flora intestinal, promoviendo efectos beneficiosos, no es nueva. A comienzos del siglo veinte, el premio Nobel Elie Metchnikoff fue el primero en proponer un razonamiento científico para los efectos benéficos del consumo de las bacterias del yogur. El relacionó la longevidad de cierta población búlgara con el consumo de yogur conteniendo especies de *Lactobacillus*, y sugirió que la dependencia de los microbios intestinales con los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar nuestra microbiota y reemplazar microbios dañinos por otros útiles (Metchnikoff, 1907). En la misma época Tissier, un pediatra francés, observó un escaso número de bacterias con formas morfológicas de Y

(bifidobacterias) en niños con diarrea y aconsejó la administración de dichas bacterias a infantes enfermos, en la creencia de que las mismas desplazaban a las bacterias patógenas (Tissier, 1906). En la década del '30, Minoru Shirota enfocó su trabajo en la selección de cepas de bacterias lácticas que pudieran sobrevivir el pasaje a través del intestino y en el uso de tales cepas para el desarrollo de leches fermentadas (Salminen y Ouwehand, 2003). Sin embargo, una larga serie de estudios realizados en este ámbito no fue suficiente para la demostración inequívoca de tales efectos beneficiosos, debido principalmente a experimentos pobremente diseñados y detalles poco claros sobre los productos analizados y las cepas ensayadas. Hace sólo unos pocos años, diferentes investigadores han aislado cepas probióticas perfectamente caracterizadas, que sobreviven las condiciones acídicas del estómago, toleran las sales biliares, se adhieren a la mucosa intestinal y ejercen beneficios sobre la salud.

### **3.2. Definición**

La palabra probiótico deriva del griego y significa (contrariamente a la definición de antibiótico) “a favor de la vida” (Salminen y Ouwehand, 2003). La definición de probiótico ha evolucionado desde comienzos de la década del '60. Hace ya más de 30 años, Parker (1974) desarrolló este concepto como “suplementos para alimentación animal que tienen un efecto beneficioso sobre el animal huésped afectando su flora intestinal” Quince años más tarde, Fuller (1989) lo definió como “un suplemento alimentario de microbios vivos, el cual afecta positivamente al animal huésped a través del mejoramiento de su balance microbiano intestinal”. Esta definición remarca la importancia de las células vivas como componente de un probiótico efectivo. Unos años después, Havenaar y Huis in't Veld (1992) redefinieron y expandieron esta definición a “un cultivo simple o mezcla de microorganismos el cual, aplicado al hombre o animales, afecta beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la microbiota indígena”. Esta última definición desarrolla los siguientes conceptos:

- introduce el concepto de uso humano,
- la actividad probiótica no se encuentra restringida a la microbiota intestinal sino que incluye las posibles aplicaciones de comunidades microbianas en otros sitios, tales como la piel y los tractos respiratorio y urogenital,
- el probiótico puede consistir de un monocultivo o una mezcla de cultivos.

Más recientemente, Reuter (1997) propuso la siguiente definición: “una preparación microbiana que contiene células vivas o muertas, incluyendo sus metabolitos, la cual está previsto que mejore el balance microbiano o enzimático en las superficies mucosas o que estimule mecanismos inmunitarios”; esta definición incluye también microorganismos no viables y metabolitos microbianos a la vez que da una idea del mecanismo de la acción probiótica. Dos años después, Salminen y col. (1999) postulan sencilla y globalmente que los probióticos “son preparaciones de células microbianas o componentes celulares microbianos que tienen efectos positivos sobre la salud y el bienestar del huésped”. Finalmente, la Organización de la Agricultura y los Alimentos de las Naciones Unidas, en conjunto con la Organización Mundial de la Salud (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2001) postuló que los probióticos son “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto beneficioso al huésped”, introduciendo el concepto de una dosis mínima necesaria. Esta definición, que incluye sólo organismos vivos, resulta actualmente la más aceptada.

Sin embargo, aún existen controversias en torno a la definición, en especial con respecto a la inclusión de células no viables, fracciones celulares y/o metabolitos. Un caso que merece particular atención es el de las bacterias del yogur, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, las cuales no llegan vivas al intestino debido a que no resisten la acidez del estómago, pero poseen efectos probióticos bien documentados (Rizkalla y col., 2000; Boudraa y col., 1990; Meydani y Ha, 2000). No obstante, dichos efectos no se cumplen si el yogur ha sido pasteurizado (con la consiguiente muerte bacteriana) previo a su consumo (Rizkalla y col., 2000). De este modo, el hecho de que al momento de su consumo necesiten estar vivas, y de que todas las cepas utilizadas cumplan al menos el criterio de mejorar la intolerancia a la lactosa, incluye a las bacterias del yogur dentro de la categoría de probióticos (Guarner y col., 2005).

### **3.3. Bacterias utilizadas como probióticos**

Los probióticos utilizados en la actualidad son casi exclusivamente bacterias aisladas de intestino humano y, a excepción de las bifidobacterias, son mayormente bacterias lácticas. Dentro de éstas se destaca el empleo de diferentes especies de lactobacilos. No obstante existen excepciones, como es el caso de *Saccharomyces*

*boulardii*, una levadura que no es de origen humano y posee efectos probióticos comprobados (Czerucka y Rampal, 2002).

### 3.3.1. Lactobacilos

Los lactobacilos son bacilos Gram-positivos, catalasa negativos, preferentes de un ambiente microaerofílico, no formadores de esporos, que producen ácido láctico como el principal producto final de la fermentación. Poseen requerimientos nutricionales complejos, requiriendo hidratos de carbono, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos, sales, derivados de ácidos nucleicos y vitaminas (Curry y Crow, 2003a). Constituyen un grupo de bacterias muy diverso, como se puede deducir de su amplio rango de contenido mol% C+G (composición molar porcentual del ADN en citosina y guanina con respecto al total de bases nitrogenadas) que varía entre el 32% y el 55%, y la baja homología en el ADN entre distintas especies (Limsowtin y col., 2003). El género ha sido dividido en tres grupos en base a las características fermentativas de cada uno (Limsowtin y col., 2003):

1. Lactobacilos homofermentativos obligados: fermentan las hexosas casi exclusivamente a ácido láctico, las pentosas y el gluconato no son fermentados. Algunas de estas especies son importantes en la manufactura de quesos, yogures y bebidas probióticas.
2. Lactobacilos heterofermentativos facultativos: fermentan las hexosas a ácido láctico únicamente o, bajo condiciones limitantes de glucosa, producen además ácidos acético y fórmico, y etanol; las pentosas se fermentan con producción de ácido láctico y acético. Varias especies se asocian tradicionalmente con leches fermentadas y ensilados.
3. Lactobacilos heterofermentativos obligados: fermentan las hexosas a ácido láctico, CO<sub>2</sub>, ácido acético y/o etanol; las pentosas se fermentan con producción de ácido láctico y acético. En determinados contextos se consideran microorganismos que provocan el deterioro de alimentos.

Los lactobacilos juegan dos roles principales en la elaboración de productos lácteos: como cultivos iniciadores, para producir ácido rápidamente, y como cultivos probióticos. Además de estas dos funciones principales, pueden también producir bacteriocinas, exopolisacáridos y contribuir al desarrollo de sabor y aroma en diferentes productos lácteos. Sin embargo, su presencia en productos lácteos puede constituir

también una desventaja, ya que algunos de ellos son capaces, bajo ciertas condiciones, de causar defectos de textura, aroma y/o sabor (Curry y Crow, 2003a).

Los lactobacilos son los constituyentes mayoritarios de la flora denominada NSLAB (bacterias lácticas no pertenecientes al fermento primario; acrónimo del inglés *non starter lactic acid bacteria*), siendo una de las pocas bacterias contaminantes que son capaces de crecer en el queso luego de la manufactura. La composición de la flora NSLAB es compleja, proviene de la leche cruda y del ambiente de la quesería, y puede evolucionar desde niveles casi indetectables inmediatamente luego de la fabricación, hasta convertirse en la flora dominante en quesos de larga maduración (aproximadamente 4 meses o más) (Fox y col., 1998). Este crecimiento puede afectar positiva o negativamente el desarrollo de aroma y sabor, o bien no tener ningún impacto significativo, lo cual depende en gran medida de la cepa, la concentración celular y las condiciones ambientales del queso (Fox y col., 1998; Hynes y col., 2001).

Dentro del género *Lactobacillus* existen cepas pertenecientes a numerosas especies que han sido propuestas como probióticos, siendo las más utilizadas *Lactobacillus acidophilus* y el grupo de *Lactobacillus casei*.

*Lactobacillus acidophilus* es la especie de lactobacilos más ampliamente estudiada y empleada como probiótico. Comprende principalmente cepas homofermentativas obligadas, siendo algunas pocas heterofermentativas facultativas, y poseen la capacidad de crecer a 45°C. El pH final y la temperatura de almacenamiento parecen ser elementos claves para determinar la estabilidad y supervivencia de *L. acidophilus* en el producto. La viabilidad es mayor a pH mas alto y a temperaturas bajas (5–9°C) que a temperatura ambiente (25°C) (Gopal, 2003).

El grupo de *Lactobacillus casei* comprende las especies *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, como resultado de una reclasificación taxonómica basada en homología de ADN y secuenciación del ARN ribosomal 16S, ya que las tres especies fueron originalmente denominadas *L. casei*. Todas las especies en el grupo *casei* son heterofermentativas facultativas, y bajo condiciones limitantes de glucosa producen etanol y ácidos fórmico y acético, además de ácido láctico. Dicho grupo es el más generalmente identificado como flora NSLAB durante la maduración de quesos (Curry y Crow, 2003b).

### **3.3.2. Bifidobacterias**

Las bifidobacterias son organismos Gram-positivos, no móviles, no formadores de esporos y catalasa negativos. Morfológicamente muestran formas bacilares más o menos ramificadas, con formas de V, Y, X, entre otras, polimorfismo que depende principalmente del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento (Shah y Lankaputra, 2003). Inicialmente las bifidobacterias fueron clasificadas como lactobacilos, y debido a sus características metabólicas, son frecuentemente incluidas dentro de las bacterias lácticas. Sin embargo, los lactobacilos poseen un contenido mol% C+G que es normalmente menor al 50%, mientras que en todos los miembros del género *Bifidobacterium* este porcentaje es superior al 50%, lo que los ubica taxonómicamente fuera de las bacterias lácticas, y junto a los géneros *Propionibacterium*, *Corynebacterium* y *Brevibacterium*, entre otros (Shah y Lankaputra, 2003).

La mayoría de las bifidobacterias son anaerobias e incapaces de formar colonias en placas sin la ayuda de un agente químico reductor del potencial redox. La cisteína, por ejemplo, parece ser esencial para su crecimiento; éste y otros compuestos conteniendo grupos sulfhidrilos contribuyen a bajar el potencial redox y de esta forma podrían mejorar la viabilidad de las bifidobacterias. (Meile y col., 1997; Nebra y col., 2002). Sin embargo, se han reportado bastantes diferencias en la tolerancia al oxígeno entre diferentes especies de bifidobacterias (Meile y col., 1997). Las bifidobacterias pueden crecer en un rango de temperaturas entre 25°C y 45°C, siendo la temperatura óptima para el crecimiento de bifidobacterias de origen humano de 36-38°C. El crecimiento no ocurre a temperaturas por debajo de 20°C o por encima de 46°C (Shah y Lankaputra, 2003). El pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 6,5 y 7,0, no registrándose crecimiento a pH por debajo de 4,5-5,0 o por encima de 8,0-8,5. Por debajo de pH 4,1 la mayoría de las especies mueren en menos de una semana aún a 4°C, y por debajo de pH 2,5 mueren en menos de 3 horas (Shah y Lankaputra, 2003).

El crecimiento de las bifidobacterias en leche es muy pobre, debido a que carecen de actividad proteolítica; la adición de péptidos y aminoácidos mejora la viabilidad, así como también la producción de ácido (Shah y Lankaputra, 2003). Por otro lado, se vio que el crecimiento de bifidobacterias es estimulado por la leche humana, pero no por la leche de vaca, lo cual se debe a la presencia de factores estimulantes en la primera, identificados como oligosacáridos conteniendo N-acetil-D-glucosamina. La lactulosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-fructosa) ha sido aislada de

leche humana y también estimula el crecimiento de bifidobacterias; esta puede ser una de las razones por la cual los lactantes tienen mayores poblaciones de bifidobacterias que niños alimentados con suplementos lácteos, si bien este efecto potencial no está aún comprobado y requiere de más estudios (Kunz y Rudloff, 2006).

El metabolismo de las hexosas en bifidobacterias se lleva a cabo casi exclusivamente por la vía de la fructosa-6-fosfato, mediante la cual la fermentación de 2 moles de glucosa produce 3 moles de acetato y 2 moles de lactato. Esta vía, característica de bifidobacterias, sirve para diferenciarlas de otras bacterias Gram-positivas morfológicamente similares, por ejemplo *Lactobacillus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* (Shah y Lankaputra, 2003). Las bifidobacterias producen también cantidades menores de ácido fórmico, etanol y ácido succínico. En general, no pueden utilizar ácidos grasos ni ácidos orgánicos (Shah y Lankaputra, 2003). Como fuente de carbono, todas las bifidobacterias de origen humano pueden utilizar glucosa, galactosa, lactosa y generalmente fructosa (Gomes y Malcata, 1999).

Las bifidobacterias constituyen una parte importante de la microbiota natural del intestino humano y, cuando se encuentran en número suficiente, estos organismos crean un equilibrio saludable entre microorganismos beneficiosos y potencialmente dañinos. En ancianos, debido a una menor secreción gástrica, las poblaciones de bifidobacterias decrecen, al mismo tiempo que aumentan las de coliformes, enterobacterias y clostridios. Como resultado, los ancianos sufren frecuentemente constipación, la cual puede ser aliviada con la incorporación de bifidobacterias (Shah y Lankaputra, 2003). Se ha reportado la existencia de más de 70 productos conteniendo bifidobacterias a nivel mundial; en leches fermentadas y yogur las especies encontradas más comúnmente son *B. bifidum*, *B. breve* y *B. longum* (Shah, 2003).

### 3.4. Prebióticos

Gibson y Roberfroid (1995) fueron los primeros en definir el término prebiótico como “*un ingrediente alimentario no digerible que afecta de manera beneficiosa al huésped por la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, mejorando de esta manera la salud del huésped*”. Dado que la dieta es uno de los factores principales que controla la microbiota intestinal, es posible modificar la composición de ésta a través de los alimentos. Un sustrato debe cumplir al menos tres requisitos para ser considerado prebiótico: 1) no debe ser hidrolizado o absorbido en el estómago o en el intestino; 2) debe ser selectivo

para bacterias beneficiosas del colon tales como las bifidobacterias y los lactobacilos, y no debe promover el crecimiento de potenciales patógenos, tales como clostridios productores de toxinas, *Bacteroides* proteolíticos y *Escherichia coli* toxigénica; y 3) la fermentación del mismo debe inducir efectos positivos en el lumen o a nivel sistémico en el huésped (Manning y Gibson, 2004).

Dentro de los prebióticos encontramos un amplio número de sustancias provenientes de la dieta o producidas por el huésped. El sustrato cuantitativamente más importante a partir de la dieta es el almidón resistente (RS). Los polisacáridos no derivados del almidón (NSP) forman el segundo grupo más importante, e incluyen sustancias vegetales tales como pectinas, celulosa, hemicelulosa y xilanos. Azúcares y oligosacáridos tales como la lactosa, lactulosa, rafinosa y fructo-oligosacáridos (FOS) tampoco son absorbidos por el intestino y son metabolizados por bacterias intestinales. Dentro de los prebióticos endógenos encontramos determinadas glicoproteínas (mucinas) y mucopolisacáridos (condroitin sulfato y heparina), y algunas secreciones pancreáticas. Finalmente, ciertos péptidos también cumplen esta función, pero en menor medida que los hidratos de carbono (Manning y Gibson, 2004). A pesar de esta larga lista de compuestos, el mayor interés en el desarrollo de prebióticos está centrado en los oligosacáridos no digeribles. Estos comprenden cadenas de entre dos y 20 monosacáridos, entre los cuales la lactulosa, fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, oligosacáridos de soja, la lactosacarosa, isomalto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos y xilo-oligosacáridos han sido reconocidos por su carácter prebiótico (Gibson y col., 2000). Muchas frutas y vegetales (cebolla, ajo, banana, puerros, espárragos, achicoria) contienen FOS, los cuales pueden ingerirse con su consumo. Sin embargo, es probable que en dichos alimentos las concentraciones sean despreciables como para producir un efecto significativo; de allí la importancia de la fortificación de los alimentos con prebióticos (Manning y Gibson, 2004).

Las propiedades prebióticas de un oligosacárido dependen fundamentalmente de su composición en monosacáridos, el tipo de enlace glicosídico entre ellos y el peso molecular (Manning y Gibson, 2004). Todos los prebióticos reconocidos hasta el momento están constituidos por glucosa, galactosa, xilosa y fructosa. El enlace glicosídico es crucial, ya que los FOS son fermentados selectivamente gracias a una  $\beta$ -fructofuranosidasa presente sólo en la pared celular de las bifidobacterias. Respecto del peso molecular, cuanto mayor sea este, mayor será el tiempo de fermentación, y la misma se realizará en regiones más distales del colon (Manning y Gibson, 2004). A



diferencia de los oligosacáridos, los polisacáridos no tienen efecto prebiótico (Wang y Gibson, 1993).

### **3.4.1. Simbióticos**

Muchas cepas bacterianas, principalmente bifidobacterias y lactobacilos (probióticos), han sido aisladas y cultivadas por ejercer efectos beneficiosos sobre la salud, de los cuales hablaremos en detalle más adelante. Por lo tanto, sería deseable desarrollar prebióticos que estimulen específicamente el crecimiento o la actividad de dichas cepas. Los productos que contienen tales combinaciones de probiótico-prebiótico son denominados simbióticos.

Se han realizado numerosos estudios *in vitro* (Palframan y col., 2003; Sanz y col., 2005a; Sanz y col., 2005b), con el desarrollo de ecuaciones para evaluar el efecto prebiótico de distintos oligosacáridos. En estos trabajos, los índices prebióticos se basaron principalmente en cambios en las poblaciones a nivel de géneros bacterianos específicos, debido a la dificultad en caracterizar a la microbiota intestinal al nivel de especie. Sin embargo, la fermentación de los prebióticos depende de la especie bacteriana y aún de cada cepa en particular (Huebner y col., 2007). La disponibilidad de prebióticos especialmente diseñados para cepas probióticas específicas (teniendo en cuenta cambios no solo a nivel de géneros), permitirían el desarrollo de productos simbióticos con características muy mejoradas. Al respecto, Huebner y col. (2007) evaluaron la combinación de diferentes prebióticos con cepas bacterianas probióticas particulares. Estos autores encontraron una variación considerable en los índices de actividad prebiótica de los diferentes oligosacáridos ensayados, cuando se emplearon distintas especies de *Lactobacillus* (y aún empleando diferentes cepas dentro de la misma especie), lo cual era esperable dada la diversidad metabólica de este género. En contraste, la variación encontrada entre bifidobacterias para la fermentación de distintos prebióticos fue, a excepción de *Bifidobacterium bifidum*, relativamente baja. Los resultados obtenidos en este trabajo son promisorios para el desarrollo y mejoramiento de futuros productos simbióticos.

### **3.5. Criterios de selección de bacterias probióticas**

A medida que los investigadores comenzaron a apreciar el potencial de la inclusión de microorganismos probióticos en alimentos, diferentes criterios fueron surgiendo para seleccionar las especies y cepas más convenientes, que a la vez que

cumplieran satisfactoriamente los beneficios esperados en el organismo, tuvieran aceptación por parte del consumidor. Dado que los criterios de selección son muchos y muy diversos, es difícil establecer un orden de importancia entre ellos (Farnworth, 2001). De todos modos, podemos clasificarlos en criterios generales y criterios específicos o probióticos. Los primeros deben ser cumplidos obligatoriamente por todas las cepas que vayan a ser utilizadas como probióticos en alimentos, y se dividen a su vez en propiedades de bioseguridad, tecnológicas y biológicas. Las propiedades tecnológicas y biológicas se refieren a la capacidad de las bacterias probióticas de sobrevivir en el producto en el que se encuentran hasta el momento de su consumo, y dentro del organismo tras su ingestión, respectivamente. Los criterios específicos se refieren a la acción probiótica propiamente dicha, y son muy numerosos y variados. No existe ninguna cepa que cumpla todos los criterios específicos conocidos; en cambio, encontramos microorganismos probióticos que satisfacen uno o unos pocos de ellos.

### **3.5.1. Propiedades de bioseguridad**

Las bacterias a ser utilizadas como probióticos deben ser, obviamente, probadamente no patógenas, sin efectos mutagénicos o carcinogénicos. Como se dijo al comienzo de esta sección, si bien existen excepciones, los probióticos son predominantemente bacterias lácticas. El principal punto a favor para el empleo de este tipo de bacterias como nutracéutico sin efectos dañinos, está dado por la larga historia y tradición de su uso de manera segura a lo largo de la historia (Salminen y Ouwehand, 2003). La mayoría de las cepas son consideradas microorganismos sin potencial patogénico. Entre ellas, los miembros del género *Lactobacillus* son los que más comúnmente poseen el carácter GRAS (generalmente reconocidas como seguras, del inglés Generally Recognized As Safe), mientras que algunas cepas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* son patógenos oportunistas. El número de infecciones causadas por bacterias lácticas es, sin embargo, extremadamente bajo (Salminen y Ouwehand, 2003). Numerosas cepas probióticas han sido probadas clínicamente en pacientes cuya mucosa intestinal había sido alterada por tratamiento con antibióticos, radioterapia o diarrea aguda de origen bacteriano o viral; en ningún caso hubo evidencia de infecciones oportunistas ni otros efectos adversos sobre la salud. Estudios en animales indicaron la ausencia de infectividad o efectos de toxicidad aún a dosis extremadamente elevadas (Salminen y Ouwehand, 2003).

En una revisión llevada a cabo recientemente, Furrie y col. (2006) establecen que, a pesar del uso universalmente difundido de *Lactobacillus* spp. como probióticos, existen sólo siete casos publicados de infecciones con un vínculo estrecho a la ingestión de probióticos: una endocarditis, un acceso hepático, dos sepsis y tres bacteriemias. Es importante aclarar que todos los casos se resolvieron luego de su tratamiento (Furrie y col., 2006). Cabe destacar la importancia de la correcta administración de los suplementos probióticos, ya que el caso de endocarditis por *Lactobacillus* mencionado anteriormente, se trataba de un hombre con prolapso de la válvula mitral que masticó una cápsula con *Lactobacillus* luego de un procedimiento odontológico (Mackay y col., 1999).

La situación es algo diferente en el caso de la levadura *Saccharomyces boulardii*. Esta levadura pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, considerada tradicionalmente como absolutamente segura, pudiendo colonizar los tractos gastrointestinal, genitourinario y respiratorio humanos de manera inocua. Sin embargo, un trabajo reciente reportó cuatro casos de infecciones fúngicas con *Saccharomyces boulardii*, dentro de los cuales se encontró con métodos moleculares la cepa probiótica terapéutica utilizada en alimentos (de Llanos y col., 2006).

### 3.5.2. Propiedades tecnológicas

Desde un punto de vista tecnológico, sería ventajoso que los probióticos fueran capaces de crecer en un producto lácteo y de sobrevivir durante todo el tiempo de vida útil del producto, a fin de poseer una concentración suficiente para ejercer los efectos deseados al momento de su consumo (Ross y col., 2005). Sin embargo, muchas cepas probióticas no crecen bien en leche. El agregado de glucosa, extracto de levadura o fracciones de proteínas de leche puede mejorar su crecimiento; *Lactobacillus* GG, por ejemplo, no es capaz de fermentar la lactosa, mientras que *Lactobacillus johnsonii* LA1 necesita la adición de aminoácidos, nucleótidos e hierro. Otro método más comúnmente utilizado consiste en el uso concomitante de otra cepa para acelerar la fermentación, usualmente *Streptococcus thermophilus* y/o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Salminen y Ouwehand, 2003). Para el uso a escala industrial de una cepa probiótica, el crecimiento y supervivencia durante el procesamiento a gran escala es esencial, por ejemplo en cuanto a la tolerancia a las fuerzas de corte y al oxígeno. Esto último es especialmente importante si se trata de bifidobacterias (Salminen y Ouwehand, 2003).

Debido a que la mayoría de los cultivos de bacterias probióticas se comercializan liofilizados o congelados, un método propuesto para mejorar la supervivencia es la estabilización mediante adición de sustancias protectoras o microencapsulación, previo al tratamiento de secado o congelación. Numerosas sustancias se han empleado con el fin de mejorar la viabilidad celular durante el secado, almacenamiento y/o tránsito gastrointestinal, entre las que encontramos termoprotectores como la trealosa (Conrad y col., 2000), sólidos de leche no grasos (Corcoran y col., 2004), factores de crecimiento tales como prebióticos (Corcoran y col., 2004) y gránulos de almidón (Crittenden y col., 2001). Otra metodología que se ha comprobado que mejora las propiedades tecnológicas de las cepas probióticas, es la recuperación de células sometidas a estrés. Recientemente, se ha prestado especial atención a este campo, con el objetivo de entender los mecanismos por los cuales se mejoran la supervivencia y las funciones de las bacterias bajo condiciones de producción industrial (Prasad y col., 2003).

Como cualquier microorganismo utilizado a escala industrial, las cepas deben ser genéticamente estables, manteniendo sus propiedades de un año a otro, a fin de que la calidad del producto que las contiene sea constante en el tiempo. Finalmente, pero no menos importante, los probióticos no deben afectar negativamente las características organolépticas y, en lo posible, deben contribuir a mejorar el aroma y el sabor del producto final (Salminen y Ouwehand, 2003).

### **3.5.3. Propiedades biológicas**

Las bacterias a ser utilizadas como probióticos deben retener una viabilidad significativa durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal. Uno de los primeros obstáculos encontrados por los probióticos una vez que ingresan en el organismo es la acidez del estómago, cuyo pH puede llegar a ser tan bajo como 1,5. Es por ello que la resistencia a la acidez es un criterio esencial para la selección de bacterias a ser incorporadas en alimentos funcionales. Se ha encontrado una gran variabilidad en la resistencia a la acidez entre distintas especies e incluso entre cepas de una misma especie (Ross y col., 2005). Hood y Zottola (1988) no recuperaron células de un cultivo de *Lactobacillus acidophilus* sometido a pH 2,0 durante 45 min, mientras que la exposición a pH 4,0 durante 2 h no redujo la población de manera significativa. En general, *Bifidobacterium* es menos ácido-tolerante que *Lactobacillus*, lo cual se refleja en su menor capacidad de resistir el jugo gástrico humano (Dunne y col., 1999).

Otra barrera que deben sortear los microorganismos dentro del cuerpo son las sales biliares, por lo que se buscan cepas que sean resistentes a la bilis. Por último, la capacidad de adhesión al epitelio intestinal es un factor clave, ya que favorece la supervivencia y la colonización del intestino por parte del probiótico (Charteris y col., 1998).

Existen muchos argumentos que cuestionan si las cepas probióticas permanecen viables durante el tracto gastrointestinal; sin embargo, este hecho se ha confirmado utilizando técnicas microbiológicas clásicas y otras más sofisticadas basadas en análisis de ADN. Luego de la ingestión de un alimento con bacterias probióticas, se observa en general un aumento en el recuento fecal de las mismas, y una disminución cuando cesa el consumo, lo cual indica que la colonización es transitoria (Salminen y Ouwehand, 2003).

#### **3.5.4. Propiedades probióticas**

El punto clave para la selección de microorganismos probióticos, además de cumplir los requisitos de bioseguridad, tecnológicos y biológicos previamente mencionados, es precisamente que tengan carácter probiótico, es decir, que posean un efecto positivo y bien documentado sobre la salud de quien las consume. Las bacterias probióticas utilizadas en humanos son generalmente de origen humano, ya que se ha observado que los efectos probióticos son en gran medida específicos de especie (Salminen y Ouwehand, 2003). Las acciones que debe cumplir una cepa probiótica determinada incluyen al menos una de las siguientes: capacidad de adhesión a la mucosa intestinal (mucus y enterocitos), producción de sustancias antimicrobianas, antagonismo contra patógenos, competición por nichos de adhesión en el intestino (exclusión competitiva), interacción con el tejido linfoide asociado al intestino (inmunomodulación), inactivación de componentes dañinos en el intestino (absorción de toxinas y regulación de la actividad metabólica de la microbiota intestinal), un efecto trófico sobre la mucosa intestinal (a través de la producción de butirato) y la normalización global de la composición y actividad de la microbiota intestinal (Salminen y Ouwehand, 2003). El cumplimiento de estas acciones dentro del organismo se traduce en diversos efectos positivos sobre la salud, que se detallan a continuación.

### 3.5.4.1. Mejora de la intolerancia a la lactosa

Los individuos con bajos niveles de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (o lactasa) en el intestino sufren normalmente de desórdenes intestinales o intolerancia a la lactosa; el origen de este problema radica principalmente en una carencia de la síntesis de la enzima endógena. De esta manera, la lactosa no puede desdoblarse en sus monosacáridos constituyentes (glucosa y galactosa) y no se absorbe en el intestino, reteniendo agua por presión osmótica, con la consiguiente aparición de dolores abdominales, diarrea y flatulencia. Se estima que el 75% de la población mundial adulta posee tales trastornos digestivos. Estas personas normalmente restringen su ingesta de productos lácteos, lo cual las pone en riesgo de carecer de ciertos nutrientes, especialmente calcio (Kopp-Hoolihan, 2001). Se ha demostrado perfectamente que *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (bacterias lácticas del yogur) (Guarner y col., 2005; Kopp-Hoolihan, 2001) y otras bacterias probióticas tales como *Bifidobacterium longum* (Jiang y col., 1996) pueden liberar  $\beta$ -galactosidasa en el estómago y en el intestino en cantidad suficiente para hidrolizar la lactosa y así aliviar los síntomas de la intolerancia a la misma.

### 3.5.4.2. Prevención y tratamiento de infecciones gastrointestinales

#### *Helicobacter pylori*

*H. pylori* es un bacilo microaerófilico capaz de colonizar la mucosa gástrica humana con el subsiguiente desarrollo de gastritis crónica, úlceras pépticas y cáncer. El tratamiento indicado para su erradicación, que involucra el empleo de inhibidores de la bomba de protones en combinación con uno o dos agentes antimicrobianos, produce disturbios en la ecología microbiana, con la supresión de la microbiota orofaríngea e intestinal, y la aparición de cepas microbianas resistentes (Adamsson y col., 2000). Diversos estudios *in vitro* utilizando cepas de lactobacilos, bifidobacterias y *Bacillus subtilis*, han demostrado que dichas cepas probióticas inhiben el crecimiento o la implantación de *H. pylori* (Midolo y col., 1995; Mukai y col., 2002; Pinchuk y col., 2001).

#### *Microorganismos enteropatógenicos*

Distintas cepas probióticas han sido estudiadas en cuanto a su habilidad para prevenir o tratar diarreas inducidas por microorganismos enteropatógenicos tales como *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*. Estos patógenos representan aproximadamente el 80% de los casos de diarrea del viajero aguda cuyo microorganismo responsable es

identificado (Adachi y col., 2000). En un estudio se utilizaron glicoproteínas intestinales aisladas de heces para estudiar el efecto de los probióticos en la adhesión intestinal de cepas patógenas de *E. coli* y *Salmonella* (Tuomola y col., 1999). Las cepas probióticas *Lactobacillus rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* LC-705 redujeron ligeramente la adhesión de *E. coli*, mientras que la adhesión de *Salmonella typhimurium* fue inhibida significativamente por los probióticos *L. johnsonii* LJ1 y *L. casei* Shirota. Sin embargo, los efectos clínicos de los agentes probióticos sobre la diarrea infecciosa son muy variables. En varios estudios no se encontró un efecto preventivo de la diarrea del viajero por parte de los probióticos, y en algunos otros, a pesar de las diferencias estadísticamente significativas entre grupos de tratamiento y grupos placebo, los efectos clínicos se consideraron secundarios (Lewis y Freedman, 1998).

### ***Rotavirus***

La infección por rotavirus es una causa principal de diarrea severa en niños de diferentes edades, tanto en países desarrollados como subdesarrollados (Ciarlet y Estes, 2001). Clínicamente, se encuentra alterada la microbiota gastrointestinal normal, dando lugar a una diarrea en dos fases, estando asociada la segunda fase a una sobrepoblación bacteriana (Isolauri y col., 1994). Varios estudios indican actualmente que la administración de microorganismos probióticos acorta la duración de la diarrea; en dos revisiones recientes, los autores concluyen que existe un beneficio clínicamente significativo, en particular para el uso de especies de *Lactobacillus* (Szajewska y Mrukowicz, 2001; Van Niel y col., 2002). Isolauri y col. (1991) encontraron que el 90% de los niños tratados con *Lactobacillus rhamnosus* GG tuvieron una respuesta de anticuerpos contra rotavirus, contra el 46% en el grupo placebo. El acortamiento de la duración de la diarrea y la disminución de la presencia de virus debida al uso de *Lactobacillus rhamnosus* GG, fue también descrita por Guarino y col. (1997), confirmando los resultados de Isolauri y col. (1991).

### ***Diarrea asociada a antibióticos y a Clostridium difficile***

El efecto colateral más frecuente en la terapia antimicrobiana es la aparición de diarrea asociada a antibióticos; se estima que la prevalencia es de entre el 5% y 25% (Bergogne-Bérézin, 2000). El tratamiento con antibióticos quiebra el balance ecológico normal de la microbiota, lo cual da lugar a la aparición de infecciones por patógenos emergentes como *Clostridium difficile*, cuyas manifestaciones clínicas varían entre una diarrea leve hasta la colitis pseudomembranosa, con riesgo para la vida (Barbut y Petit, 2001). Se han recopilado varias revisiones sobre ensayos clínicos usando

microorganismos vivos para el tratamiento y la prevención de la diarrea asociada a antibióticos (Lewis y Freedman, 1998; Bergogne-Bérézin, 2000), donde los autores establecen que determinadas formulaciones conteniendo *Saccharomyces boulardii* fueron efectivas en prevenir los efectos secundarios del tratamiento con antibióticos.

#### ***Síndrome del colon irritable***

El síndrome del colon irritable es una inflamación crónica y recurrente que afecta generalmente el colon o el intestino delgado e incluye la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn (Linskens y col., 2001). Como tratamiento del síndrome del colon irritable se ha propuesto la manipulación terapéutica de la microbiota intestinal mediante el uso de probióticos (Shanahan, 2002; Keshavarzian y col., 2002). *Lactobacillus rhamnosus* GG demostró en niños un efecto inmunoestimulador específico para la enfermedad de Crohn, lo cual podría ser de importancia en el tratamiento para promover la función de barrera de la mucosa intestinal (Malin y col., 1996).

#### **3.5.4.3. Reducción de los niveles de colesterol**

El colesterol, a pesar de ser un componente esencial de las membranas celulares, cuando se encuentra en niveles elevados en sangre es considerado un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades coronarias. Diferentes cultivos probióticos han sido evaluados para determinar sus efectos sobre los niveles de colesterol sanguíneos. Los estudios clínicos llevados a cabo no han sido concluyentes, pero sugieren que los niveles de colesterol sanguíneo pueden ser reducidos con el consumo de productos lácteos con determinadas bacterias probióticas (Sanders, 2004). Abd El-Gawad y col. (2005) determinaron una reducción del colesterol sanguíneo en ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol, luego de la ingesta de productos lácteos fermentados conteniendo bifidobacterias.

El mecanismo exacto por el cual los probióticos reducirían los niveles de colesterol sanguíneo no está claro. Se vio que algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* secretan enzimas que hidrolizan las sales de los ácidos biliares conjugadas con taurina o glicina, liberando el aminoácido y las sales de los ácidos biliares libres (Corzo y Gilliland, 1999). Estas sales de ácidos biliares libres, menos solubles que las conjugadas, se absorberían menos en el intestino. El mecanismo de reducción del colesterol estaría dado, de esta manera, por su utilización para la síntesis de nuevos ácidos biliares, necesarios para reemplazar aquellos que no pudieron ser reabsorbidos a



la circulación enterohepática (Reynier y col., 1981). Otro mecanismo propuesto por Noh y col. (1997), sugiere que *Lactobacillus acidophilus* incorpora una parte del colesterol removido del medio en su membrana celular durante el crecimiento. El colesterol incorporado o adherido a las células bacterianas estaría menos disponible para su absorción desde el intestino hacia la sangre.

#### **3.5.4.4. Prevención de cáncer**

Hay cierta evidencia, principalmente a partir de estudios *in vitro* y con animales, de que las bacterias probióticas pueden reducir el riesgo de cáncer, posiblemente contrarrestando efectos genotóxicos y mutagénicos. Se observó que el enriquecimiento de la dieta con una cepa de *Lactobacillus acidophilus* suprimió de manera significativa la totalidad de células cancerosas en ratas, dependiendo altamente el efecto de las dosis de probióticos empleadas (Rao y col., 1999). Otro estudio mostró que *Lactobacillus rhamnosus* GG redujo la incidencia y el número de tumores en animales con cáncer de colon inducido artificialmente (Goldin y col., 1996). *Bifidobacterium longum* también inhibió la incidencia de tumores de mama, hígado, intestino delgado y colon en ratas (Reddy y Rivenson, 1993). De los pocos estudios llevados a cabo en humanos, uno mostró que el consumo de *Lactobacillus casei* ( $10^{10}$  UFC tres veces por día durante un año) prolongó el período sin recurrencia en individuos con cáncer de vejiga (Aso y Akazan, 1992).

#### **3.5.4.5. Prevención y tratamiento de alergias**

Si bien los probióticos pueden aumentar la respuesta inmune (en el caso de enfermedad o vacunación oral) o no tener ningún efecto visible (en individuos sanos), también pueden producir una disminución en la respuesta, como es el caso de las alergias (Salminen y Ouwehand, 2003). Existe una alta correlación entre el desarrollo de la microflora en los primeros estadios de vida y el desarrollo de alergias (Kirjavainen y Gibson, 1999). Kalliomäki y col. (2001) demostraron que *Lactobacillus rhamnosus* GG administrado a embarazadas en forma prenatal y después del parto, era efectivo en la prevención de la enfermedad atópica temprana en los niños. Se documentó también una mejora en los síntomas de la rinitis alérgica en adultos (Ishida y col., 2005) y de alergias alimentarias en niños pequeños (Kirjavainen y Gibson, 1999) tras una terapia oral con bacterias lácticas. En un estudio reciente aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, la cepa probiótica *Bifidobacterium longum* BB536 administrada en un yogur,

demostró ser efectiva en el tratamiento de la polinosis por cedro japonés, una alergia mediada por IgE muy común en Japón y con una elevada incidencias las últimas décadas (Xiao y col., 2006).

#### **3.5.4.6. Otros efectos**

Además de los detallados anteriormente, se han atribuido otros efectos a diferentes microorganismos probióticos. Estos efectos han recibido una menor atención por parte de la comunidad científica, no existiendo gran cantidad de estudios al respecto. Dado que las infecciones de los tractos urinario y genital están frecuentemente asociadas con bacterias del colon, se propuso una acción positiva de los probióticos en la salud urogenital en mujeres, mediante la modulación de la microbiota intestinal. Se ha correlacionado la salud vaginal con la presencia de lactobacilos, probablemente debido a la generación de un ambiente ácido inhibitorio de bacterias patógenas (McLean y Rosenstein, 2000). Por otro lado, se encontró una moderada reducción de la presión arterial en ancianos hipertensos que consumieron una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* durante ocho semanas (Hata y col., 1996); sin embargo, no se pudo comprobar que tales microorganismos hayan sido los responsables de los resultados positivos en la experiencia. Ambos efectos, postulados en base a resultados preliminares, necesitan ser confirmados con ensayos clínicos a largo plazo bien diseñados y controlados (Kopp-Hoolihan, 2001).

### **3.6. Eficacia de los probióticos**

El cumplimiento real de los efectos positivos atribuidos a una cepa probiótica determinada, debe ser perfectamente documentado con experimentos en humanos bien diseñados, los cuales pueden ser soportados por estudios *in vitro* o con animales. La cepa probiótica estudiada debe ser definida con exactitud antes de comenzar los ensayos clínicos. Esto, como dijimos al principio de esta sección, representó un problema durante muchos años de estudio, principalmente por la falta de una caracterización detallada de las cepas estudiadas y el mal diseño de las experiencias. Recientemente, un grupo de científicos atribuyó inequívocamente ciertos efectos sobre la salud a cepas probióticas específicas, teniendo como criterio que el efecto fue probado en al menos dos estudios bien diseñados en humanos, en forma independiente (Salminen y Ouwehand, 2003). La Tabla 1 muestra efectos científicamente comprobados de probióticos comercialmente disponibles en el mercado.

**Tabla 1.** Estudios reportados y efectos científicamente establecidos de algunas cepas probióticas disponibles comercialmente.

<b>Cepa</b>	<b>Efectos establecidos científicamente<sup>a</sup></b>
<i>Lactobacillus johnsonii</i> LJ1	Adhesión a la mucosa, vacunación oral mejorada.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFB 1748	Disminución en la mutagenicidad. Mejoramiento de los movimientos peristálticos durante la constipación.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Alivio de los síntomas de la intolerancia a la lactosa.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53013)	Acortamiento de la duración de la diarrea por rotavirus, adhesión a la mucosa. Incremento de las bifidobacterias. Prevención y tratamiento de la diarrea asociada a antibióticos, alivio de síntomas de alergia alimentaria, reducción del riesgo de enfermedad atópica en niños.
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Reducción en la recurrencia de cáncer de vejiga superficial. Normalización de la microbiota intestinal.
<i>Streptococcus thermophilus</i> ; <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Alivio de los síntomas de la intolerancia a la lactosa.
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12	Acortamiento de la duración de la diarrea por rotavirus, reducción en el riesgo de diarrea por rotavirus.
<i>Lactobacillus gasseri</i> (ADH)	Alteración de la actividad metabólica intestinal.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Acortamiento de la duración de la diarrea por rotavirus.
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Prevención de la diarrea asociada a antibióticos, tratamiento de colitis causada por <i>Clostridium difficile</i> .

<sup>a</sup>Probados por al menos dos estudios clínicos en humanos, publicados y realizados en forma independiente (Adaptado de Salminen y Ouwehand, 2003).

### 3.7. Productos probióticos en el mercado

Los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran disponibles comercialmente a través de laboratorios o industrias alimentarias a nivel internacional, así como en colecciones de cultivos (ATCC, DSM, CRL [CERELA-CONICET]). Algunos ejemplos de estos microorganismos son los siguientes: *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Rhone-Poulenc, Estados Unidos), *Lactobacillus reuteri* 106 (BioGaia, Estados Unidos), *Bifidobacterium longum* bb536 (Morinaga Milk Ind., Japón), *Lactobacillus plantarum* 299 (ProViva, Finlandia), *Lactobacillus casei* YIT9018, Shirota, (Yakult, Japón), *Lactobacillus johnsonii* LJ-1 (Nestlé, Suiza), *Lactobacillus casei* CRL 431, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (CERELA, Argentina) y *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 (CERELA, Argentina), entre otros (Taranto y col., 2005). Estas cepas comerciales son normalmente incluidas en diversos productos lácteos actualmente en el mercado, como los denominados “bio-yogurts” (**LC1**: *Lactobacillus johnsonii* LC-1; **Shape**: *Lactobacillus acidophilus*; **Symbalance**: *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*; **Vifit**: *Lactobacillus rhamnosus* GG) y leches fermentadas (**Actimel**: *Lactobacillus casei* defensis; **Yakult**: *Lactobacillus casei* Shirota; **LC1Go**: *Lactobacillus johnsonii*). Más recientemente se impulsó el desarrollo de quesos probióticos (**Bioqueso Iloay Vita**: *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei*), debido a que serían vehículos más ventajosos para este tipo de bacterias, por razones que se expondrán más adelante en la sección correspondiente.

Las bacterias probióticas también pueden ser incorporadas en el organismo a través de formulaciones farmacéuticas, por ejemplo en forma de polvos o píldoras que incluyen un solo microorganismo o una mezcla de ellos. Estos preparados son efectivos ya que, si bien las bacterias no se encuentran protegidas por la matriz del alimento durante su pasaje a través del tracto gastrointestinal, las concentraciones de microorganismos son normalmente mucho mayores. Así encontramos productos comerciales tales como **Multibionta** (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum*; <http://www.multibionta.co.uk>) y **Protexin** (*Streptococcus*, dos cepas de bifidobacterias y cuatro de lactobacilos; <http://www.protexin.com/health-care>; Gibson y Fuller, 2000). También dentro de este grupo es destacable la comercialización de **Bioflora**, un producto desarrollado en Argentina por la empresa Biosidus S.A. (<http://www.sidus.com.ar>) e indicado para pacientes con síndromes dispépticos, que contiene cuatro microorganismos probióticos

activos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecalis* y *Bifidobacterium brevis*), del cual se proclama que previene y reduce la duración de la diarrea infecciosa, y se recomienda como adyuvante en la terapia antibiótica.

### **3.7.1. Productos probióticos no lácteos**

Si bien el mercado internacional de alimentos probióticos se centra en el desarrollo de productos lácteos fermentados, existen otros alimentos aptos para la incorporación de microorganismos probióticos, y entre ellos los derivados de la soja parecen ser los más apropiados. La leche de soja es una bebida popular en Asia y su consumo se está incrementando en Estados Unidos. Algunas bacterias probióticas, en especial las bifidobacterias, asimilan azúcares que pueden causar flatulencia, de modo que su adición en leche de soja permitiría reducir este efecto indeseable, logrando a la vez una mejor preservación del producto y mejorando por otro lado la salud (Champagne y col., 2005).

Otros productos fermentados potencialmente útiles para la incorporación de probióticos incluyen mayonesa, carne, alimentos para bebés, extractos de semillas vegetales tales como sorgo y maní, jugo de pepino y salsas de pescado, entre otros (Champagne y col., 2005). Los alimentos probióticos novedosos son particularmente numerosos en Japón, e incluyen leches malteadas, leche en polvo, caramelos, chicles, tortas, varias preparaciones de fibras y aún cerveza (Champagne y col., 2005).

## **3.8. Incorporación en alimentos: factores a tener en cuenta.**

### **3.8.1. Concentración mínima requerida**

Existe una dosis mínima requerida para asegurar la eficacia de la acción probiótica; dicha dosis depende de la concentración del microorganismo en el alimento y de la cantidad de alimento consumida. En este sentido, Charteris y col. (1998) sugirieron la adición de entre  $10^9$  y  $10^{10}$  UFC/100 g de producto. En general, la industria alimentaria apunta a mantener la presencia de  $10^6$  UFC/g o más de bifidobacterias en el alimento donde fueron adicionadas, en el momento de su consumo. La adopción de este estándar, sin embargo, parece tener en cuenta las concentraciones bacterianas más factibles de alcanzar con una relación costo/beneficio óptima, antes que las necesarias para cumplir un efecto sobre la salud en forma satisfactoria (Sanders y col., 1996). Por otro lado, a pesar de que existen pocos estudios de dosis-respuesta, la acumulación de datos científicos parece indicar que las dosis mínimas requeridas están altamente

influenciadas por la cepa en particular y el efecto fisiológico deseado, por lo que resulta difícil determinar el número exacto de células necesarias (Champagne y col., 2005). Lo ideal sería basarse en resultados científicos previos obtenidos para un determinado alimento inoculado con una cantidad establecida de una cepa probiótica definida. Como esto resulta imposible desde un punto de vista práctico, la decisión debería basarse en legislaciones o recomendaciones de organismos internacionales con una alta credibilidad. Como ejemplo, la Federación Internacional de la Lechería (IDF) recomienda que productos lácteos tales como la leche acidófila, contengan al menos  $10^7$  UFC/mL del cultivo probiótico (IDF, 1992). En el caso de las bifidobacterias, sin embargo, la IDF sugiere que el producto contenga  $10^7$  UFC/mL o más de bacterias lácticas, de las cuales por lo menos  $10^6$  UFC/mL sean bifidobacterias.

### **3.8.2. Estabilidad durante el almacenamiento del producto**

Existen numerosos estudios referidos a la estabilidad de los probióticos durante el almacenamiento, y se han desarrollado diferentes estrategias para mejorarla. Micanel y col., (1997) observaron que el pH, el oxígeno y las condiciones de preparación del inóculo inicial afectan la estabilidad de los probióticos durante el almacenamiento; dichos factores se analizan a continuación.

#### **3.8.2.1. pH**

Si bien todos los productos lácteos fermentados son de naturaleza ácida, existen grandes variaciones entre los mismos; así encontramos un pH normal de 4,2 para yogur, 5,2 para queso Cheddar, 6,0 o más para queso Camembert maduro, y alrededor de 6,5 para leche y helados (Champagne y col., 2005). Asimismo, existen variaciones significativas en la supervivencia de cepas probióticas distintas en medios con diferentes grados de acidez. *Lactobacillus casei* parece ser más ácido-tolerante que *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus acidophilus* (Garro y col., 1999; Valdez y Giori, 1993), el cual es a su vez, en general, más resistente que las bifidobacterias (Hughes y Hoover, 1995). Por otro lado, se encontró que el ácido acético, producido por el metabolismo de las bifidobacterias, resulta antagonista de la supervivencia de las mismas. No obstante, se observaron niveles elevados de bifidobacterias ( $>10^6$  UFC/g) en yogures comerciales con pH tan bajo como 4,0, sugiriendo la utilización de cepas seleccionadas muy ácido-tolerantes (Champagne y col., 2005).

Dado que el desarrollo de acidez en yogur y otras leches fermentadas durante el almacenamiento (post-acidificación) puede inhibir a los cultivos probióticos, una estrategia preventiva consiste en el empleo de lactobacilos con capacidad acidificante autolimitada, o aún la exclusión de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* del fermento primario (Champagne y col., 2005). Otro método promisorio parece ser el microentrampamiento en geles, si bien el beneficio de este tratamiento parece estar más relacionado a la protección de las células contra el oxígeno que contra las condiciones ácidas del ambiente (Talwalkar y Kailasapathy, 2003).

### 3.8.2.2. Oxígeno

El oxígeno afecta la viabilidad de los probióticos de dos formas. La primera es un efecto tóxico directo; ciertas cepas son muy sensibles y mueren rápidamente en presencia de oxígeno (Dave y Shah, 1997), debido probablemente a la producción intracelular de peróxido de hidrógeno. La segunda vía es indirecta; algunos cultivos, particularmente *Lactobacillus delbrueckii*, cuando hay oxígeno presente excretan peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de ácido tiene un efecto inhibitorio demostrado sobre las bifidobacterias (Lankaputhra y col., 1996). Esto sugiere que las cepas probióticas pueden ser afectadas por el metabolismo de otras bacterias presentes en el medio, y explicaría en parte la mayor supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* en leches fermentadas donde se excluyó *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* del fermento primario (Champagne y col., 2005).

Algunas estrategias para prevenir los efectos perjudiciales del oxígeno son la adición de antioxidantes, tales como el ácido ascórbico, y la eliminación de cepas productoras de peróxido (Champagne y col., 2005). También debe ser tenido en cuenta el envase del producto, que debe ser lo más impermeable posible al oxígeno. Por otra parte, Hull y col. (1984) observaron que la adición de catalasa reduce la muerte de *Lactobacillus acidophilus* durante la fabricación del yogur, bloqueando el efecto nocivo del oxígeno.

### 3.8.2.3. Preparación previa del inóculo

El modo de propagación y preparación de la cepa probiótica, así como el momento en el cual se realiza su adición al alimento durante el proceso de manufactura, pueden tener un efecto significativo en su viabilidad y su actividad metabólica en el producto final. Se observó que la composición del medio utilizado para propagar células

de *Lactobacillus acidophilus* influye en su supervivencia subsiguiente en leche acidófila durante el almacenamiento; reduciendo el contenido de sólidos de suero pepsinizados de 5% a 2,5% se logró una disminución en la pérdida de viabilidad de 2,8 a 1,5 órdenes logarítmicos, tras la conservación por 21 días a 5°C (Mitchell y Gilliland, 1983).

Otro factor a tener en cuenta es el pH. Si bien existen variaciones entre cepas de la misma especie, por lo general las células de *Bifidobacterium longum* propagadas a pH entre 6,0 y 6,5 son más estables que aquéllas propagadas a pH 5,5 ó 7,0 (Reilly y Gilliland, 1999).

Un factor importante y poco tenido en cuenta por los fabricantes de productos lácteos es la fase de crecimiento en que se encuentra el inóculo en el momento de su adición al producto, algunos cultivos de *Lactobacillus acidophilus* muestran una mejor estabilidad durante el almacenamiento de leche acidófila a 7°C, cuando las células del inóculo son cosechadas durante la fase de crecimiento logarítmica en vez de al comienzo de la fase estacionaria (Brashears y Gilliland, 1995).

Existe, por otra parte, una evidencia creciente que sugiere que el microentrapamiento o la microencapsulación protegerían a los probióticos destinados a su adición a alimentos durante el almacenamiento de los mismos (Krasaekoopt y col., 2003; Hussein y Kebary, 1999). El microentrapamiento en esferas de alginato incrementa notoriamente la supervivencia de cultivos probióticos en productos lácteos helados, y su efectividad se relaciona con la adición de glicerol o manitol, que crean un microambiente protector. El efecto positivo de la microencapsulación se limita, por otro lado, a la etapa de congelamiento, sin beneficios aparentes durante el almacenamiento.

Finalmente, se sabe que las bacterias lácticas sintetizan proteínas de estrés en respuesta a la acidificación, altas temperaturas y estrés osmótico. De esta manera, variaciones en las técnicas de producción del inóculo que sometan a las células a condiciones de estrés, podrían mejorar la posterior supervivencia de las mismas durante la conservación del producto (Champagne y col., 2005). En este contexto, Hull y col. (1984) encontraron una mayor viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* en yogur conservado a 5°C, cuando su adición se realizó no sobre el producto final inmediatamente antes del almacenamiento, sino antes de la etapa de fermentación, sugiriendo que las bacterias se adaptan al peróxido de hidrógeno durante dicha etapa.



### **3.8.3. Métodos de identificación y recuento en la matriz alimentaria**

La importancia de una dosis mínima requerida, discutida previamente, hace esencial disponer de un método de cuantificación confiable de probióticos en alimentos. En los productos que contienen sólo cultivos probióticos, su enumeración es bastante simple. En yogur, sin embargo, no sólo debe distinguirse entre bifidobacterias y *Lactobacillus acidophilus*, sino también entre varios lactobacilos. Por consiguiente, existe la necesidad de disponer de métodos rápidos y confiables para la enumeración de cultivos mixtos, que permitan determinar el inóculo inicial y las concentraciones durante el almacenamiento en forma rutinaria (Champagne y col., 2005).

Se han desarrollado numerosas metodologías para la enumeración selectiva de bacterias probióticas, ya sean de recuento en placas, mediante técnicas de genética molecular o métodos enzimáticos, siendo las primeras aún las preferidas para el control de calidad de productos alimenticios. La elección de un medio de cultivo selectivo para probióticos debe tener en cuenta la adición de sustancias promotoras del crecimiento, un bajo potencial de óxido-reducción, el pH y la capacidad reguladora de pH del medio durante el crecimiento bacteriano. Las condiciones anaeróbicas de incubación son un factor importante en el caso de las bifidobacterias (Champagne y col., 2005).

Si bien se han propuesto numerosas alternativas (Vinderola y Reinheimer, 1999 y 2000; Shah, 2000), la elevada variabilidad en los microorganismos presentes en distintos productos requiere métodos de recuento diferentes, que se adapten a cada caso en particular, no existiendo hasta el momento un consenso sobre una metodología estándar de recuento.

### **3.8.4. Propiedades sensoriales del producto**

Cuando se prevé la incorporación de bacterias probióticas en un alimento, además de los factores previamente analizados, no se debe pasar por alto la posible alteración de las propiedades sensoriales. Por suerte, esto no parece ser un problema cuando los probióticos se agregan como un cultivo secundario, no apreciándose en general diferencias con el producto original. Sin embargo, cuando su empleo reemplaza el cultivo tradicional, frecuentemente se producen cambios en la composición química y la textura, los cuales sin embargo raramente afectan el aroma o el sabor. Obviamente, el efecto depende del crecimiento y la proporción de probióticos en el producto; cuando esta proporción es menor al 10% de la población, las propiedades sensoriales prácticamente no resultan afectadas (Champagne y col., 2005).

Aquí también resulta importante la especie o cepa utilizada, ya que helados elaborados con 10% de *Lactobacillus reuteri* resultaron con sabor más agrio que los mismos productos con adición de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* o *Bifidobacterium bifidum* (Hagen y Narvhus, 1999). En productos elaborados con soja, la fermentación por parte de bacterias probióticas puede incluso mejorar el aroma mediante la metabolización de compuestos indeseables tales como el pentanal y el n-hexanal (Champagne y col., 2005). En un estudio reciente, Ong y col. (2007b) elaboraron quesos Cheddar con adición de seis cepas probióticas (solas y en 2 combinaciones de tres cepas juntas). Los panelistas sensoriales encontraron todos los quesos probióticos excepto uno (elaborado con *Lactobacillus acidophilus* 4962), significativamente diferentes de los quesos control sin probióticos. En un caso particular (elaborado con *Lactobacillus casei* 279), la aceptabilidad fue muy baja, siendo el amargor y los sabores ácido y agrio los principales defectos descriptos.

## **4. Quesos**

### **4.1. Características y clasificación**

Queso es el nombre genérico con el que se conoce un amplio grupo de productos lácteos fermentados, producidos en todo el mundo bajo una amplia variedad de formas y sabores. Aunque el objetivo primario de la elaboración de quesos fue conservar los componentes principales de la leche, el queso ha evolucionado hasta convertirse en un producto de alta cocina, a la vez que es muy nutritivo. Si bien existen muchos criterios de clasificación, y ninguno es completamente satisfactorio, el más común es aquel que tiene en cuenta la textura, relacionada principalmente con la humedad del queso; de esta manera encontramos quesos duros, semiduros y blandos. Otros criterios tienen en cuenta la especie animal de la cual se obtiene la leche, el método de coagulación empleado, la temperatura de cocción o flora microbiana predominante durante la maduración (Fox y McSweeney, 2004).

La producción de quesos involucra dos etapas mayoritarias: la manufactura y maduración. La manufactura es esencialmente un proceso de deshidratación en el cual la grasa y la caseína de la leche son concentradas entre 6 y 12 veces, dependiendo de la variedad (Fox y McSweeney, 2004). Si bien los protocolos difieren ligeramente entre distintas variedades, existe una serie de pasos básicos comunes a los quesos coagulados

de manera enzimática; estos son acidificación, coagulación, deshidratación del coágulo, moldeo y prensado, y salado (Fox y McSweeney, 2004).

A pesar de que las cualidades organolépticas de un queso están determinadas principalmente por la manufactura, las mismas se desarrollan durante la etapa de maduración. Esto se debe a una serie orquestada de eventos bioquímicos consecutivos y concomitantes la cual, si está correctamente balanceada, da lugar a productos con aromas y sabores altamente deseables, mientras que cualquier desequilibrio resulta en olores y sabores desagradables. Los factores responsables de estos cambios son el coagulante utilizado en la elaboración (principalmente quimosina y/o pepsina), enzimas presentes naturalmente en la leche (plasmina, lipasa natural de la leche y otras), bacterias lácticas del fermento primario y sus enzimas, y microbiota secundaria y sus enzimas (Fox y McSweeney, 2004). La microbiota secundaria puede provenir de microorganismos que sobreviven la pasteurización o contaminan la leche luego de esta etapa (principalmente *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Micrococcus*), o se inoculan como fermentos secundarios o adjuntos (*Penicillium roqueforti* en quesos azules o bifidobacterias y ciertos lactobacilos en quesos probióticos); también puede provenir del ambiente y desarrollar en superficie durante la maduración. Muchas veces, la actividad metabólica de esta microbiota domina las características finales del queso (Fox y McSweeney, 2004).

## **4.2. Maduración**

Las reacciones bioquímicas que ocurren durante la maduración del queso se agrupan usualmente en cuatro categorías principales: (1) hidrólisis de la lactosa residual y catabolismo del lactato, (2) catabolismo del citrato (importante en ciertas variedades), (3) proteólisis y catabolismo de aminoácidos, y (4) lipólisis y catabolismo de los ácidos grasos libres (AGL).

### **4.2.1. Hidrólisis de la lactosa y catabolismo del lactato**

Durante la elaboración, la mayor parte de la lactosa es desdoblada a glucosa y galactosa, y una fermentación posterior (ya sea de ambos monosacáridos o sólo de la glucosa, dependiendo del tipo de fermento primario utilizado) produce ácido láctico, principalmente el isómero L, aunque esto también depende del fermento utilizado. La producción de ácido láctico disminuye el pH a valores entre 5,0 y 5,3 a las 12 h del comienzo de la elaboración (McSweeney y Fox, 2004). Este pH, si bien es bajo respecto

al de la leche, es sustancialmente mayor que el de la mayoría de las leches fermentadas, lo cual, como veremos más adelante, representa una ventaja para la supervivencia de las bacterias probióticas. La producción de ácido inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos, productores de toxinas o productores de gas. Por otro lado, tiene un gran impacto en la textura, a través de la desmineralización de las micelas de caseína (Fox y col., 1990). Además, incrementa la proteólisis por alteración de la susceptibilidad de las micelas de caseína al ataque enzimático y una mayor retención de quimosina en la cuajada a bajo pH (McSweeney y Fox, 2004).

Un metabolismo de la lactosa incompleto o retardado, podría dar lugar al desarrollo de una microbiota secundaria indeseable (Fox y col., 1990). Típicamente, luego de la hidrólisis de la lactosa, sólo la glucosa es metabolizada por la mayoría de las cepas de *Streptococcus thermophilus*. En quesos donde se utiliza sólo *Streptococcus thermophilus* como cultivo iniciador, la acumulación de galactosa puede producir coloraciones pardas indeseables cuando el producto es sometido a un calentamiento, por lo que el uso de cepas galactosa-positivas podría ser muy beneficioso (Mukherjee y Hutkins, 1994). Los lactobacilos, que desarrollan normalmente como flora NSLAB en todos los quesos de larga maduración, metabolizan tanto la lactosa como la galactosa residual a una mezcla racémica de D- y L-lactato (Thomas y Crow, 1983). La utilización de cultivos puros de lactobacilos probióticos, como adjuntos a un fermento primario constituido sólo por *Streptococcus thermophilus*, podría ser otra alternativa posible para evitar la acumulación de galactosa en el queso.

Además de su racemización por parte de la flora NSLAB, el lactato puede sufrir otros cambios durante la maduración de quesos. Entre ellos, su catabolismo por *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* en quesos suizos resulta importante para el desarrollo de ojos característicos (Piveteau, 1999). En quesos madurados en superficie, tales como Camembert y Brie, su catabolismo por *Penicillium camemberti* a dióxido de carbono y agua es esencial para el desarrollo de textura (Karahadian y Lindsay, 1987). En presencia de oxígeno, algunos miembros de la flora NSLAB, en particular pediococos, pueden oxidar el lactato con formación de ácidos fórmico y acético (Thomas y col., 1985). Finalmente, *Clostridium tyrobutyricum* puede fermentar el lactato en anaerobiosis con producción de gas, dando lugar al defecto denominado “hinchazón tardía” (Fox y col., 1995).

#### **4.2.2. Catabolismo del citrato**

Si bien la concentración de citrato en leche es muy baja, su metabolismo es importante en muchos quesos elaborados con fermentos mesófilos. De las bacterias lácticas comúnmente utilizadas en quesería, el citrato es catabolizado sólo por cepas de lactococos citrato-positivas, *Leuconostoc mesenteriodes* subsp. *cremoris* y *Leuconostoc lactis*, con producción de diacetilo, acetoína y dióxido de carbono. El diacetilo es el principal responsable del desarrollo de aroma y sabor en quesos Cottage, Quarg y muchas leches fermentadas. Por otra parte, contribuye de manera secundaria al aroma de otras variedades de queso donde está presente en menores cantidades, como por ejemplo el Cheddar (McSweeney y Fox, 2004).

#### **4.2.3. Proteólisis y catabolismo de los aminoácidos**

La proteólisis es el evento bioquímico más complejo y, en la mayoría de las variedades, el más importante llevado a cabo durante la maduración. La quimosina es la enzima proteolítica mayoritaria (88-94%) en los coagulantes tradicionales, y la pepsina constituye el resto. En general, la hidrólisis primaria de las caseínas es llevada a cabo por el coagulante y, en menor medida, por la plasmina (la principal proteasa nativa de la leche) y proteasas de células somáticas presentes en la leche (principalmente cathepsina D). Esta hidrólisis resulta en la formación de péptidos grandes (insolubles) e intermedios (solubles), y da lugar a la liberación de grupos amino y carboxilo terminales, los cuales tienen la capacidad de ligar agua y de esta manera producir un cambio en la textura. La textura puede verse afectada también de manera indirecta, a través de la producción de amoníaco y el incremento de pH en ciertas variedades donde la proteólisis es muy intensa, por ejemplo en quesos madurados por hongos en superficie como el Camembert (McSweeney, 2004). Los péptidos generados por la hidrólisis primaria tienen una influencia directa en el sabor; este impacto es muchas veces positivo, pero sin embargo algunos péptidos liberados son hidrofóbicos y confieren un gusto amargo indeseable a los quesos. Una hidrólisis posterior, llevada a cabo por proteasas y peptidasas microbianas, da lugar a la aparición de péptidos pequeños y aminoácidos, respectivamente (McSweeney, 2004). De acuerdo a las investigaciones más recientes, parece ser que el papel principal de la proteólisis en el desarrollo de características sensoriales, está dado justamente por la producción de aminoácidos y su posterior catabolismo a diversos compuestos de aroma y sabor, entre ellos  $\alpha$ -cetoácidos, aminas, aldehídos, ácidos carboxílicos, alcoholes y amoníaco (Yvon

y Rijnen, 2001). De esta manera encontramos aminoácidos que confieren al queso sabor dulce (glicina, serina, treonina, alanina, prolina), ácido (histidina, ácido glutámico, ácido aspártico) o amargo (arginina, metionina, valina, leucina, fenilalanina, tirosina, isoleucina, triptofano) (McSweeney, 2004).

#### **4.2.4. Lipólisis**

##### ***Importancia en la maduración de quesos***

Los lípidos en sí mismos juegan un rol principal en la calidad de los quesos, ya sea afectando su textura y reología, como precursores de compuestos de aroma y sabor, o actuando como solvente de compuestos de aroma y sabor producidos a partir de lípidos o de otros precursores (Collins y col., 2004). Si bien los lípidos presentes en alimentos pueden sufrir una degradación hidrolítica (lipólisis) u oxidativa, la oxidación no ocurre de manera significativa en quesos, debido probablemente a su bajo potencial redox (-250 mV) (McSweeney y Sousa, 2000). La lipólisis de los triglicéridos, con liberación de ácidos grasos y glicerol, mono- y diglicéridos, se considera esencial para el desarrollo de aroma y sabor en quesos. Los ácidos grasos libres (AGL) de cadena larga (12 o más átomos de carbono) tienen un umbral de percepción elevado, por lo que no se considera que contribuyan al aroma y sabor (Molimard y Spinnler, 1996). Por su parte, los AGL de cadena corta y media tienen umbrales de percepción menores y brindan notas sensoriales características. Así, se ha considerado que el ácido butírico (C<sub>4:0</sub>) produce aromas rancios, el ácido caproico (C<sub>6:0</sub>) sabor y aroma picantes y el ácido caprílico (C<sub>8:0</sub>) gusto a cera, a cabra, a jabón y frutado, entre otras descripciones (Collins y col., 2004). Dependiendo de sus concentraciones y umbrales de percepción, los AGL volátiles pueden tener un impacto positivo o negativo en el aroma y sabor de los quesos. Los AGL son, además, importantes precursores de varios compuestos volátiles que contribuyen al aroma (McSweeney y Sousa, 2000; Collins y col., 2004).

El nivel de lipólisis en quesos varía considerablemente entre distintas variedades. En quesos madurados internamente por bacterias (Cheddar, Gouda, Pategrás Argentino) este nivel es bajo (<2000 mg/Kg de queso), y una lipólisis excesiva es indeseable; aún quesos con niveles moderados de AGL pueden ser considerados rancios por algunos consumidores (Collins y col., 2004). El empleo de determinadas cepas de propionibacterias en quesos suizos (Gruyere, Emmental), y de coagulantes en pasta en ciertas variedades italianas (Provolone, Pecorino), produce una lipólisis moderada (2000-7000 mg/Kg de queso) (Collins y col., 2004). Una lipólisis mas elevada es

característica de quesos madurados por bacterias en superficie (Limburger), principalmente debido a enzimas lipolíticas muy activas de la microbiota superficial (Collins y col., 2004). Finalmente, los mayores niveles de lipólisis se observan en quesos madurados por hongos debido al metabolismo de éstos; el porcentaje del total de triglicéridos hidrolizados alcanza el 5-10% en Camembert y hasta el 25% en quesos azules. Sin embargo, la neutralización de los AGL por la elevación del pH durante la maduración evita el fenómeno de rancidez (Collins y col., 2004).

### ***Agentes responsables***

Las enzimas lipolíticas pueden clasificarse en esterases y lipasas, las cuales se distinguen de acuerdo a tres características: longitud de la cadena del ácido graso hidrolizado, naturaleza fisicoquímica del sustrato (emulsificado o no) y cinética enzimática (las esterases siguen cinéticas de Michaelis Menten clásicas, mientras que las lipasas, activas sólo en una interfase, obedecen cinéticas de Michaelis Menten interfaciales) (Deeth y Touch, 2000). Desafortunadamente, los términos “esterasas” y “lipasas” son frecuentemente intercambiados en la literatura científica.

En general, las enzimas lipolíticas son específicas para ácidos grasos esterificados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de los triglicéridos. Los triglicéridos se hidrolizan inicialmente a 1,2- y 2,3-diglicéridos y posteriormente a 2-monoglicéridos; el butirato, así como otros ácidos grasos de cadena corta y media, se localizan principalmente en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 en los lípidos de la leche, y de esta manera son liberados de manera preferencial por las enzimas lipolíticas (Deeth y Touch, 2000).

Las lipasas en el queso se originan de seis fuentes posibles (McSweeney y Sousa, 2000; Collins y col., 2004):

- leche
- coagulantes en pasta
- bacterias del fermento primario
- microorganismos del fermento secundario o adjunto
- bacterias lácticas no pertenecientes al fermento (NSLAB)
- preparaciones de lipasas exógenas

La leche contiene una lipasa natural muy potente de origen sanguíneo (LPL) que, en condiciones óptimas, podría causar una rancidez perceptible en leche en sólo 10 segundos. Esto no ocurre normalmente porque los triglicéridos de la leche se encuentran protegidos dentro de glóbulos rodeados de una membrana lipoproteica (MFGM). Si esta membrana se daña, principalmente por efectos mecánicos, se produce una lipólisis

significativa, con generación de aromas desagradables en el queso y otros productos lácteos (Collins y col., 2004). La especificidad de la LPL no está determinada por el tipo de ácido graso, sino por la hidrólisis preferencial de aquéllos ubicados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 en los mono-, di- y triglicéridos (Olivecrona y col., 1992), liberándose principalmente ácidos grasos de cadena corta y media en leche. En quesos elaborados con leche cruda, la contribución de esta enzima a la maduración es importante. La pasteurización HTST (72°C por 15 s) inactiva en cierta medida la enzima, pero su inactivación completa se alcanza a 78°C durante 10 s (Collins y col., 2004), por lo que también puede contribuir en cierta medida a la lipólisis en quesos elaborados con leche pasteurizada.

Los extractos de coagulante comerciales están libres de actividad lipolítica, pero los coagulantes en pasta utilizados en la manufactura de quesos duros italianos de lipólisis media-alta, contienen una esterasa pregástrica (PGE) muy activa y altamente específica para ácidos grasos ubicados en la posición *sn*-3 (Nelson y col., 1977). Debido a la falta de higiene inherente al proceso de obtención de los coagulantes en pasta, se han buscado lipasas exógenas para sustituir su uso, pero la mayoría no son de utilidad para su uso en quesos italianos debido a su incorrecta especificidad (Collins y col., 2004).

En quesos tipo Holanda y Cheddar elaborados con leche pasteurizada, los principales agentes lipolíticos parecen ser las bacterias lácticas; quesos de este tipo elaborados en condiciones asépticas y sin adición de fermentos mostraron una lipólisis muy limitada durante la maduración (Collins y col., 2004). A pesar de que las bacterias lácticas poseen enzimas esterolíticas y lipolíticas capaces de hidrolizar tri-, di- y monoglicéridos, son muy débilmente lipolíticas (especialmente *Lactococcus* y *Lactobacillus* spp.) en relación a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium* (Chich y col., 1997). Sin embargo, su presencia en altas concentraciones durante períodos prolongados de maduración produce una lipólisis detectable en variedades sin una microbiota secundaria altamente lipolítica. Numerosas lipasas y esterases de bacterias lácticas se han aislado y caracterizado (Chich y col., 1997; Castillo y col., 1999; Liu y col., 2001). La presencia de lipasas y esterases se demostró en nueve cepas de lactococos (Piatkiewicz, 1987), entre ellas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, lactococos citrato-positivos y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, siendo mayor la actividad esterasa en todas las cepas. Kamaly y col. (1990) reportaron la presencia de lipasas en el extracto libre de células para cepas de *Lactococcus lactis*



subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. El-Soda y col. (1986) encontraron una actividad esterolítica intracelular en *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus acidophilus*. Khalid y Marth (1990) cuantificaron la actividad lipolítica de *Lactobacillus casei* L-7, *Lactobacillus casei* L-14, *Lactobacillus plantarum* L-34 y *Lactobacillus helveticus* L-53 en emulsiones de grasa de leche, aceite de oliva y tributirina; los tres sustratos fueron hidrolizados por todos los lactobacilos, a excepción de *Lactobacillus casei* L-7, el cual no hidrolizó el aceite de oliva. Lee y Lee (1990) encontraron que la lisis de células de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* produce la liberación de enzimas lipolíticas y esterolíticas. *Lactobacillus fermentum* contiene una esterasa asociada a la superficie celular, cuya actividad es óptima para la liberación de ácido butírico, pero puede hidrolizar  $\beta$ -naftil-ésteres de ácidos grasos desde C<sub>2:0</sub> hasta C<sub>10:0</sub> (Gobbetti y col., 1997). Gobbetti y col. (1996) purificaron una lipasa intracelular relativamente estable hasta 65°C, a partir de una cepa de *Lactobacillus plantarum* aislada de queso Cheddar. Liu y col. (2001) identificaron tres esterases intracelulares en *Streptococcus thermophilus*., dos de las cuales se purificaron y caracterizaron en cuanto a su actividad, especificidad y estabilidad. Dado que aparentemente las esterases y lipasas de bacterias lácticas son intracelulares, las mismas deben ser liberadas en la matriz del queso a través de la lisis celular para una eficiencia máxima. En este sentido, Collins y col. (2003) encontraron niveles mayores de caprilato (C<sub>8:0</sub>), miristato (C<sub>14:0</sub>) y palmitato (C<sub>16:0</sub>) en quesos Cheddar elaborados con un fermento primario altamente autolítico (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2) que en aquellos elaborados con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP, menos autolítico, a pesar de que los extractos libres de ambas cepas tuvieron niveles de actividad similares sobre emulsiones de trioleína (lipasa) y p-NP butirato (esterasa). Sin embargo, hasta la fecha existen pocos estudios referidos a la relación entre la autólisis del fermento y la lipólisis durante la maduración. Freitas y col. (1999) determinaron la actividad lipolítica de *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* y tres especies de levaduras aisladas de queso Picante, encontrando una actividad considerable sólo para una de las levaduras.

*Brevibacterium linens*, una bacteria presente en quesos madurados en superficie tales como el Limburguer, posee una considerable actividad lipolítica que ha sido demostrada utilizando como sustratos tanto tributirina como aceite de oliva (San Clemente y Vadehra, 1967). En quesos madurados por hongos tales como Brie,

Camembert y Roquefort, *Penicillium* spp. produce una lipólisis muy extensa. *Penicillium roqueforti* posee una lipasa con un pH óptimo de 7,5-8,0 y otra con pH óptimo más alcalino (9,0-9,5), mientras que *Penicillium camemberti* produce una lipasa extracelular, cuya actividad óptima se alcanza a pH 9 y 35°C (Collins y col., 2004).

Las bacterias propiónicas son entre 10 y 100 veces más lipolíticas que las bacterias lácticas (Deborde, 2003). Usando tributirina como sustrato, Oterholm y col. (1970) demostraron que *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* posee una lipasa intracelular, con una actividad hidrolítica máxima para tripropionina (C<sub>3:0</sub>), seguida en orden de importancia por tributirina (C<sub>4:0</sub>), tricaproína (C<sub>6:0</sub>) y tricaprilina (C<sub>8:0</sub>).

### ***Catabolismo de ácidos grasos y otras reacciones***

Una vez liberados de los triglicéridos, los AGL son precursores importantes de muchos compuestos de aroma y sabor, tales como metilcetonas, lactonas, ésteres, alcanos y alcoholes secundarios. Las metilcetonas (2-alcanonas) son los compuestos de sabor más importantes en quesos azules, donde están presentes en concentraciones muy elevadas, siendo las más comunes en queso azul la 2-heptanona y la 2-nonanona. Las 2-octanona, 2-nonanona, 2-decanona, 2-undecanona y 2-tridecanona poseen aromas frutales y florales, mientras que la 2-heptanona posee el aroma característico de los quesos azules (Collins y col., 2004). Las metilcetonas se sintetizan por oxidación de los AGL a  $\alpha$ -cetoácidos y posterior decarboxilación a 2-alcanonas, de un átomo de carbono menos que el ácido graso precursor. El principal responsable de su producción es *Penicillium roqueforti* (Urbach, 1997), aunque *Penicillium camemberti* y *Geotrichum candidum* pueden también sintetizarlas (Molimard y Spinnler, 1996). A su vez, las metilcetonas pueden sufrir una reducción enzimática para formar alcoholes secundarios en queso. En quesos no madurados por hongos, estos compuestos también pueden aparecer durante la maduración, pero en concentraciones muy bajas, por lo que no son importantes en su contribución al sabor y aroma (Collins y col., 2004).

Las lactonas son compuestos cíclicos formados por la esterificación intramolecular con pérdida de agua de distintos hidroxíácidos. De ellas, sólo las  $\gamma$ - y  $\delta$ -lactonas (con anillos de 5 y 6 átomos de carbono, respectivamente) son estables y han sido aisladas de queso (Collins y col., 2004). Las lactonas tienen umbrales de percepción mucho menores que otros compuestos volátiles, y se caracterizan por tener aromas frutales muy pronunciados, por ejemplo a durazno, damasco o coco, que si bien

no son característicos de queso, contribuyen al aroma en forma global (Dufossé y col., 1994).

Los aldehídos pueden formarse por el catabolismo de aminoácidos. Sin embargo, algunos aldehídos de cadena lineal tales como butanal, heptanal y nonanal pueden formarse por la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos insaturados. Los quesos Gruyere y Parmesano tienen niveles elevados de AGL y de aldehídos de cadena lineal, lo cual les confiere un aroma a “pasto” característico (Moio y col., 1993).

#### **4.3. Incorporación de bacterias probióticas: ventajas con respecto a las leches fermentadas**

Si bien las leches fermentadas fueron los primeros (y aún son los principales) productos lácteos utilizados como vehículos de bacterias probióticas, su bajo pH puede resultar inadecuado para la supervivencia de algunas cepas probióticas. Vinderola y Reinheimer (2000), por ejemplo, encontraron que en muchas leches fermentadas conteniendo bacterias probióticas en Argentina, las mismas se encontraban en niveles menores a los requeridos por la legislación. Más recientemente, se sugirió que los quesos son más adecuados que las leches fermentadas para la incorporación de bacterias probióticas, por varias razones; el mayor pH y contenido de materia grasa, y la matriz sólida del queso, protegerían a las bacterias de manera más efectiva que un medio fluido, durante su pasaje a través del tracto gastrointestinal (Stanton y col., 1998). Además, el potencial redox del queso es mucho menor que el de las leches fermentadas, lo cual sería ventajoso debido a los efectos nocivos previamente detallados del oxígeno sobre los cultivos probióticos (ver sección 3.8.2.2). Vinderola y col., (2000) encontraron una mayor viabilidad para *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* en una pasta de queso que en una solución de ácido clorhídrico, cuando ambos fueron incubados a pH 3. Por otro lado, Gardiner y col., (1999) encontraron, para un cultivo probiótico de *Enterococcus faecium*, un mejor efecto protector del queso con respecto al yogur.

#### **4.4. Antecedentes de quesos probióticos**

En los últimos años se ha reportado un creciente interés en la incorporación de diferentes bacterias probióticas en quesos, en general utilizando variedades comercialmente conocidas y elaboradas con leche de vaca. Dentro de los probióticos ensayados, las bifidobacterias fueron en general las preferidas, ya sea en forma

individual, en combinaciones de dos o más de ellas, o bien en forma conjunta con lactobacilos, principalmente *Lactobacillus acidophilus*.

El Cheddar, un tipo de queso duro cuyo consumo es muy elevado en los países más desarrollados (Europa, Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda), ha sido la variedad más estudiada en este sentido, existiendo un gran número de trabajos científicos publicados al respecto (Dinakar y Mistry, 1994; Stanton y col., 1998; Gardiner y col., 1998, 1999 y 2002; Daigle y col., 1999; Lynch y col., 1999; Mc Brearty y col., 2001; Darukaradhy y col., 2006; Phillips y col., 2006; Ong y col., 2006 y 2007a y b), lo que prueba de manera inequívoca su utilidad como vehículo de bacterias probióticas. En dichos estudios se observó, en general, una elevada supervivencia de las bacterias probióticas incorporadas en el queso, luego de períodos de maduración de uno y aún dos años. Los probióticos ensayados incluyeron diversas cepas de bifidobacterias, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Enterococcus faecium*. Cabe destacar que salvo pocas excepciones, las cepas se mantuvieron en concentraciones mayores a  $10^6$  UFC/g hacia el final de la maduración. Philips y col. (2006) encontraron elevadas concentraciones bacterianas ( $>10^7$  UFC/g) para *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* y tres cepas de bifidobacterias, en quesos Cheddar elaborados con cada una de ellas, luego de 32 semanas de maduración. Sin embargo, en las mismas condiciones, los autores encontraron una supervivencia muy pobre para las dos cepas de *Lactobacillus acidophilus* que probaron. Ong y col. (2006 y 2007a) elaboraron quesos Cheddar utilizando seis cepas probióticas comerciales (dos de *Lactobacillus acidophilus*, una de *Lactobacillus casei*, una de *Lactobacillus paracasei* y dos bifidobacterias) en forma individual y en dos combinaciones de tres cepas por experiencia. Cabe destacar que estos autores encontraron una excelente supervivencia para todos los probióticos al final de la maduración, aún para una de las cepas de *Lactobacillus acidophilus* que fue la misma utilizada por Philips y col. (2006). Este contraste de resultados obtenidos utilizando la misma cepa en el mismo tipo de queso, destaca la importancia de otros factores en la supervivencia, tales como el tiempo y la temperatura de maduración (ambos fueron menores en el trabajo donde la supervivencia fue mejor).

Los quesos blandos, dentro de los cuales se destaca a nivel mundial el desarrollo de quesos Cottage y Crescenza con probióticos (Blanchette y col., 1996; O'Riordan y Fitzgerald, 1998; Gobbetti y col., 1998), son considerados, en líneas generales, el mejor

vehículo para mantener la supervivencia de dichos cultivos, debido a su alto contenido de humedad y corto tiempo de maduración. Sin embargo, se encontraron resultados dispares en la determinación de la viabilidad de diferentes bifidobacterias en tales variedades de queso, debido probablemente a una elevada dependencia de las cepas utilizadas, sus combinaciones y el tipo de queso empleado. Así, la supervivencia en queso Crescenza madurado durante 14 días fue de  $1,1 \times 10^8$ ,  $1,7 \times 10^5$  y  $1,3 \times 10^7$  UFC/g para cepas de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium longum*, respectivamente, cuando las mismas se agregaron por separado, mientras que su adición en forma conjunta sólo alcanzó un recuento total de bifidobacterias de  $10^5$  UFC/g (Gobbetti y col., 1998). En otro estudio, en cambio, la población de *Bifidobacterium infantis* en queso Cottage fue siempre menor a  $10^3$  UFC/g a los 15 días de maduración, e indetectable a los 22 días (Blanchette y col., 1996). Roy y col. (1998) determinaron la supervivencia de diferentes cepas de bifidobacterias en un queso fresco en niveles superiores a  $10^6$  UFC/g durante al menos 15 días, y la muerte celular fue mayor en el producto conservado a 4° C que cuando se almacenó a 12° C. Buriti y col. (2005) incorporaron *Lactobacillus acidophilus* en queso Minas (un queso blando) en combinación con dos cultivos primarios diferentes, y en ambos casos la población de lactobacilos probióticos fue de aproximadamente  $10^6$  UFC/g a los 21 días de maduración. En este estudio, a diferencia de la mayoría de los relacionados a la incorporación de probióticos en queso, se evaluó también la textura, encontrándose diferencias entre quesos, las cuales no obstante fueron atribuidas al fermento primario y no a la adición de probióticos.

Por otro lado, en un desarrollo muy importante llevado a cabo en nuestro país, en donde se ensayó la incorporación de diferentes combinaciones de cepas probióticas (dos cepas de *Bifidobacterium bifidum*, dos cepas de *Bifidobacterium longum*, una cepa de *Bifidobacterium* sp., dos cepas de *Lactobacillus acidophilus* y dos cepas de *Lactobacillus casei*) en queso Fresco Argentino, se observó (luego de 60 días de maduración) una pérdida de viabilidad menor de un orden logarítmico para nueve combinaciones de bifidobacterias y *Lactobacillus acidophilus*. Además, las tres combinaciones ensayadas de bifidobacterias, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* se adaptaron bien al ambiente del queso Fresco Argentino, sin pérdida significativa de viabilidad (Vinderola y col., 2000). Lamentablemente, a pesar de los excelentes resultados obtenidos en este trabajo, que dieron paso a la producción a escala industrial y comercialización del único queso probiótico actualmente en el mercado

nacional (BioQueso Ilolay Vita), y con un alto valor agregado al queso tradicional, no se realizaron análisis sensoriales del producto para determinar sus características sensoriales y la aceptabilidad por parte del público consumidor.

El alto tenor de humedad en quesos blandos está determinado por una menor expulsión de suero durante y luego de la manufactura, lo que se traduce en un mayor contenido de lactosa. Tanto en queso Cottage (Blanchette y col., 1996) como Crescenza (Gobbetti y col., 1998), se observó una mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa y una menor concentración de lactosa en aquellos con incorporación de bifidobacterias que en los mismos quesos sin probióticos. Este efecto fue independiente de la pérdida de viabilidad de las bifidobacterias, lo que sugiere que la actividad enzimática se mantiene en el queso a pesar de la muerte celular bacteriana (Blanchette y col., 1996).

Dentro de los quesos semiduros, podemos citar trabajos referidos a queso Gouda (Gomes y col., 1995; Gomes y col., 1998) y otras variedades (Songisepp y col., 2004; Kasimoğlu y col., 2004) con incorporación de bacterias probióticas. Gomes y col. (1998) encontraron una lenta disminución en las poblaciones de *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* en queso Gouda durante las primeras tres semanas de maduración, y un descenso marcado durante las seis semanas posteriores. Gomes y col. (1995) emplearon una cepa de *Bifidobacterium* sp. y una de *Lactobacillus acidophilus* (en forma individual) como fermento primario para la elaboración de queso Gouda y, si bien la supervivencia de ambas fue buena a lo largo de la maduración, se tuvieron que emplear inóculos muy elevados para lograr una buena acidificación. Además, cuando se usó la cepa de *Bifidobacterium*, la producción de ácido acético y la necesidad de suplementar la leche de elaboración con hidrolizados de leche (como factor de crecimiento) afectó negativamente las características organolépticas del producto. Kasimoğlu y col. (2004) encontraron una supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* en niveles superiores a  $10^7$  UFC/g en un queso semiduro de origen turco (queso blanco) a los 90 días de maduración, y mejores propiedades organolépticas que el mismo queso sin probióticos. Un hecho interesante resulta la elevada supervivencia (aproximadamente  $5 \times 10^7$  UFC/g) de una cepa de *Lactobacillus fermentum* con marcadas propiedades antimicrobianas y antioxidativas, durante la maduración del queso Pikantne (una variedad de queso semiduro), sin modificar significativamente el aroma y el sabor del producto original (Songisepp y col., 2004).

Aunque en menor medida, la incorporación de cultivos probióticos también se ha llevado a cabo en quesos elaborados con leches de otras especies. Corbo y col.

(2001), por ejemplo, estudiaron la incorporación de bifidobacterias en quesos elaborados con leche de oveja (Canestrato Pugliese), mientras que Gomes y Malcata (1998) desarrollaron un queso probiótico utilizando leche de cabra. El queso Canestrato Pugliese elaborado con la incorporación de dos cepas de bifidobacterias distintas, no resultó significativamente diferente de la variedad tradicional, tanto en lo referente a sus características sensoriales como a su composición (incluyendo los contenidos de aminoácidos libres y de AGL), excepto por el contenido de lactosa, la cual fue completamente metabolizada en los quesos con bifidobacterias. A pesar de ser una variedad de pasta dura, la viabilidad de las cepas probióticas fue buena para una de ellas ( $10^6$  UFC/g) y moderada para la otra ( $10^5$  UFC/g) luego de 56 días de maduración (Corbo y col., 2001). Por su parte, Gomes y Malcata (1998) elaboraron un queso semiduro con leche de cabra y con adición de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*. En este caso, las concentraciones de probióticos en queso fueron más elevadas ( $3 \times 10^8$  y  $6 \times 10^7$  UFC/g para *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus*, respectivamente), debido probablemente a una mejor supervivencia bacteriana en un queso de mayor humedad, aunque como dijimos anteriormente este no es el único factor importante, sino también cada combinación cepa-queso en particular. En este caso, ambas cepas contribuyeron a la maduración mediante la producción de aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular, pero al igual que en el queso Canestrato Pugliese, las concentraciones de AGL no sufrieron modificaciones.

#### **4.5. Producción, consumo y exportación de quesos: situación actual en Argentina**

Argentina es un país mundialmente destacado por la producción de leche y elaboración de productos lácteos. Es interesante el aumento originado durante la década del '90, pasando de una producción láctea total de menos de 6 mil millones de litros en el año 1991 hasta más de 10 mil millones de litros en el año 1999. A partir de allí, y debido a grandes cambios producidos en la economía del país, esta elevada producción sufrió altibajos; no obstante se detectó nuevamente una tendencia creciente en los últimos años, alcanzando los 9 mil millones y medio de litros en 2005 (Centro de la Industria Lechera Argentina, 2007). Probablemente sea más importante destacar el perfil de importación-exportación que la producción total, ya que las exportaciones crecieron de manera sostenida desde 57 millones de litros en el año 1992 (0,86% de la producción total) hasta 2163 millones en 2004 (23,59% de la producción total), verificándose un notable descenso en las importaciones durante el transcurso de dicho

período, desde 857 hasta 29 millones de litros (Centro de la Industria Lechera Argentina, 2007).

Consecuentemente, el país cuenta con una amplia variedad y diversidad en la producción quesera, la cual se consolida con el transcurso del tiempo. Actualmente, del volumen total de leche producida, aproximadamente el 39% se destina a la elaboración de quesos, y a su vez el 37% de este porcentaje (alrededor del 14% de la producción total) se ocupa en la elaboración de quesos semiduros. Esto se traduce en una producción total que en el año 2005 alcanzó las 408000 toneladas de queso, correspondiendo el 30% de este total (aproximadamente 128000 toneladas) a la manufactura de quesos semiduros (Centro de la Industria Lechera Argentina, 2007). Estas cifras colocan a nuestro país entre los principales productores a nivel mundial. Además, el consumo de queso per cápita en nuestro país es considerable (8,6 Kg/año/habitante), situándose dentro de los 30 países de mayor consumo (Centro de la Industria Lechera Argentina, 2007). Es destacable el hecho de que dentro del sector de quesos semiduros en Argentina, el Pategrás Argentino es indudablemente la variedad más importante (Zalazar y col., 1999).

## **5. El queso Pategrás Argentino**

### **5.1. Características tecnológicas y bioquímicas**

Las reglamentaciones vigentes en nuestro país describen al queso Pategrás Argentino como un queso de masa semicocida, elaborado con leche de vaca, con presencia o no de algunos ojos pequeños y bien distribuidos. El período de maduración normal para esta variedad es de entre 30 y 60 días, dependiendo del tamaño del queso (Código Alimentario Argentino, 2006).

Inicialmente, la fabricación de esta variedad se llevó a cabo de manera tradicional, utilizando fermentos de leche naturales (Zalazar y col., 1999). Como regla general, estos fermentos eran obtenidos a partir de leche cruda de calidad excelente en lo referente a sus características fisicoquímicas y microbiológicas. La leche era inoculada con el fermento iniciador obtenido de la elaboración del día anterior, en proporciones de entre el 1% y el 2%, tras lo cual se termizaba e incubaba a 45°C, temperatura que favorecía el predominio de estreptococos termófilos. Los fermentos naturales de leche contenían, al igual que los fermentos naturales de suero, una microflora secundaria no láctica en adición a las bacterias lácticas predominantes. Esta



compleja biodiversidad permitía, de manera similar a lo que ocurre en quesos elaborados con leche cruda, la obtención de productos con características típicas, y sabor y aroma acentuados (Albenzio y col., 2001). Sin embargo, los fermentos naturales tanto de leche como de suero, han sido reemplazados progresivamente por cultivos de adición directa en tina. Dichos cultivos se adquieren comercialmente y su uso está ampliamente distribuido actualmente. Están constituidos por cepas puras de bacterias mesófilas o termófilas en forma liofilizada y/o congelada.

La evolución de esta tecnología supone ventajas considerables; en primer lugar, los cultivos de adición directa poseen una actividad acidificante constante y bien conocida. Adicionalmente, su composición microbiológica invariable minimiza el riesgo de contaminaciones peligrosas y no controladas. Desde el punto de vista económico es favorable debido a la eliminación de etapas de propagación del cultivo en el laboratorio, demandantes de tiempo y dinero. Finalmente, su empleo asegura una mayor homogeneidad del producto final obtenido a través del tiempo. Sin embargo, existen también potenciales desventajas; una de ellas es la posible pérdida de características típicas debido a la reducción de la biodiversidad microbiana, responsable en gran parte del desarrollo de aroma y sabor durante la maduración. Por otro lado, pueden surgir problemas de falta de acidificación durante la fermentación, asociados con la muerte del cultivo iniciador debida al desarrollo de bacteriófagos (Candioti y col., 2000).

El uso de pasteurización alta o pasteurización HTST (72°C durante 15 segundos) ha disminuido en algunos casos el desarrollo de ojos, que era considerable debido a la presencia de bacterias heterofermentativas ya sea en la leche cruda o en los fermentos naturales. Con el propósito de contrarrestar este efecto, actualmente se ha vuelto común la adición de bacterias propiónicas como cultivos adjuntos durante el proceso de elaboración del queso. Las especies utilizadas pertenecen al género *Propionibacterium*, el cual es bien conocido por su metabolismo característico del lactato, con generación de ácido propiónico y dióxido de carbono. La producción de ácido propiónico contribuye al gusto picante de los quesos, mientras que el dióxido de carbono es el responsable de la formación de ojos. Además, las propionibacterias poseen una actividad lipolítica que, si bien es moderada, es considerablemente mayor que la de las bacterias lácticas (Deborde, 2003).

## **6. Justificación del tema elegido para el desarrollo de la Tesis**

Por todo lo expuesto anteriormente en esta sección, la calidad de los quesos es muy importante para la economía nacional, especialmente teniendo en cuenta los estándares cada vez más elevados, una mayor información por parte del consumidor, y el hecho de que la mayor producción quesera a nivel mundial esté notablemente concentrada en los países más desarrollados, ya que a excepción de Israel y las Antillas Holandesas, no existen países africanos, asiáticos o sudamericanos listados entre los 23 países con mayor consumo de queso (Fox y McSweeney, 2004). Comparativamente, la investigación llevada a cabo en diferentes variedades de quesos argentinos es muy escasa. Es por ello que se necesitan estudios que permitan obtener un mejor control de los procesos de elaboración y maduración, sobre todo si está involucrado un cambio en la tecnología tal como la incorporación de un nuevo cultivo adjunto. Por otro lado, y en forma paralela a la introducción de cambios en el protocolo de manufactura de un queso, es muy importante realizar estudios para verificar no sólo que no se alteren las características fisicoquímicas del producto original, sino que propiedades sensoriales tales como aroma, sabor, color, aspecto y textura se conserven o, de existir cambios, que los mismos sean favorables.

Específicamente tratándose de cultivos adjuntos probióticos, el desarrollo de quesos en Argentina es prácticamente nulo y casi no existen legislaciones sobre este tipo de producto. Actualmente sólo existe una variedad en el mercado nacional: un queso Fresco Argentino elaborado con leche ultrafiltrada y con la incorporación de tres cepas probióticas diferentes (BioQueso Ilolay Vita, Sucesores de Alfredo Williner S.A., Argentina). Si bien en este caso se comprobó una alta viabilidad de las bacterias probióticas a lo largo de la vida útil del queso (Vinderola y col., 2000), no se ha determinado la influencia del cambio tecnológico introducido sobre las características fisicoquímicas del queso y, lo que es más importante, sobre sus propiedades organolépticas y el grado de aceptación final por parte del público consumidor.

Hasta el momento, en queso Pategrás Argentino no se han incorporado cultivos probióticos, a pesar de que los antecedentes a nivel mundial de quesos semiduros con bacterias probióticas permitirían suponer que esta variedad es un vehículo adecuado para las mismas. En este sentido, Rogelj y col. (2002) determinaron que la población de una cepa probiótica de *Lactobacillus acidophilus* en un queso semiduro fue mayor a  $10^7$  UFC/g luego de seis meses de maduración, y concluyeron que estos tipos de quesos resultan vehículos aptos para la incorporación de bacterias probióticas. En este punto es

importante aclarar que la extrapolación a otras cepas probióticas o a otras matrices alimentarias no siempre es correcta. Esto se debe a la introducción de factores de variabilidad tales como la resistencia a la sal y al estrés ácido y oxidativo (cepa-dependientes), y las variaciones en las condiciones de elaboración y maduración (modifican el medio ambiente del queso) (Ross y col., 2002). Además, se ha demostrado que los cultivos probióticos y el fermento primario pueden interactuar positiva o negativamente entre sí (Vinderola y col., 2002b), aunque a nivel mundial la mayoría de los estudios realizados se centró en el análisis de quesos elaborados con fermentos mesófilos y sólo se encuentran tres trabajos referidos a fermentos termófilos (Vinderola y col., 2000; Corbo y col., 2001; Gobbetti y col., 1998), los cuales son los más utilizados en nuestro país, incluyendo el protocolo de elaboración del queso Pategrás Argentino.

De acuerdo a la discusión realizada hasta aquí, en el presente trabajo de Tesis se decidió estudiar la viabilidad de diferentes cepas comerciales de bacterias probióticas en queso Pategrás Argentino a lo largo de un período de maduración mayor al normal. Además, y teniendo en cuenta que la lipólisis durante la maduración de quesos con bacterias probióticas no ha sido extensivamente estudiada, se trataron de detectar posibles cambios fisicoquímicos relacionados a las transformaciones de la materia grasa (liberación de ácidos grasos y cambios en el contenido de colesterol) y los azúcares durante la maduración del queso Pategrás Argentino, debidos a la presencia de las cepas probióticas, así como también de verificar posibles cambios en las características sensoriales debidas a la presencia de tales cultivos adjuntos.

## 2. Objetivos del Trabajo

## **1. Objetivo general**

En este trabajo, que se complementa con otros realizados en forma paralela, se plantea el estudio de la influencia de la adición de bacterias probióticas comerciales sobre la maduración y las características sensoriales de quesos semiduros argentinos. Estos conocimientos serán aplicados para desarrollar un queso con el agregado de bacterias probióticas como fermento adjunto que, sumando los beneficios de un producto probiótico, conserve o mejore el perfil organoléptico del queso original.

## **2. Objetivos específicos**

- Elaborar quesos semiduros tipo Pategrás Argentino a escala planta piloto, con la adición de diversas bacterias probióticas comerciales como iniciadores secundarios o adjuntos.
- Verificar la viabilidad de las cepas probióticas ensayadas durante la maduración de los quesos.
- Analizar la influencia de la adición del fermento probiótico sobre los perfiles de lipólisis, el contenido de colesterol y la metabolización de la galactosa durante la maduración de los quesos.
- Estudiar las características sensoriales de los quesos con bacterias probióticas, y determinar si existen diferencias con el queso Pategrás Argentino elaborado de forma tradicional.

### **3. Materiales y Métodos**

## 1. Cepas probióticas utilizadas

Las bacterias probióticas empleadas para realizar los ensayos de adición a quesos semiduros fueron cepas seleccionadas entre las que actualmente se ofrecen en el mercado por proveedores conocidos, teniendo en cuenta la utilización de al menos una cepa de cada grupo principal de bacterias probióticas (bifidobacterias, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus* del grupo casei). También se realizaron ensayos con una cepa aislada y caracterizada en el INLAIN.

Las características de cada cepa ensayada se describen a continuación.

### 1.1. Cepas comerciales

1) *Lactobacillus acidophilus* A: esta cepa fue suministrada por un proveedor local, el cual asegura que la misma cuenta con diversas propiedades probióticas que han sido comprobadas mediante estudios *in vitro* e *in vivo*. En la actualidad, esta cepa se utiliza industrialmente para el desarrollo de numerosos productos probióticos en el ámbito local.

2) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*: esta cepa es de origen intestinal humano y crece bien a temperaturas entre 35°C y 45°C. Es estable luego de su incorporación en diversos alimentos (yogur, jugos de fruta, carne procesada) y también durante el pasaje a través del tracto digestivo. Posee un efecto inhibitorio estudiado contra *Escherichia coli* O111 y *Listeria monocytogenes* (Pidcock y col., 2002) y ha demostrado *in vivo* un efecto protectorio contra la infección por *Salmonella typhimurium* (Henriksson y col., 2002).

3) *Lactobacillus acidophilus* B: esta cepa es de origen lácteo y crece bien a temperaturas entre 35°C y 45°C. Es estable luego de su incorporación en yogur, helados y carne procesada, y resiste las condiciones acídicas del estómago. Dentro de las características probióticas podemos mencionar (de acuerdo a información suministrada por el proveedor) que esta cepa es capaz de colonizar el colon humano, inhibir *Listeria monocytogenes* tanto en la matriz alimentaria como *in vivo* (Henriksson y col., 2002; Mahoney y Henriksson, 2003), inhibir *Escherichia coli* O111 y tener un efecto antitumoral en ratas (Pidcock y col., 2002).

4) *Bifidobacterium lactis*: de origen humano, esta cepa ha demostrado una buena supervivencia en yogur y carne procesada (Crittenden y col., 2001; Henriksson y col., 2002; Pidcock y col., 2002) y también una elevada resistencia a las condiciones del tracto digestivo humano (Su y col., 2005). Entre sus características probióticas podemos

mencionar una inhibición contra *Escherichia coli* O111 y *Listeria monocytogenes* (Pidcock y col., 2002), y una protección contra la infección por *Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens* (Playne y col., 2003).

5) *Lactobacillus acidophilus* C: se han atribuido muchos y muy diversos efectos probióticos a esta cepa, que van desde la prevención de trastornos intestinales (diarreas de diferente origen y constipación) y disminución de la intolerancia a la lactosa, hasta efectos sobre el sistema inmune y supresión de tumores, además de una reducción de los niveles de colesterol (Möller y de Vrese, 2004). No obstante, todos los efectos anteriores están cuestionados, dado que en la mayoría de los casos ha sido administrada en forma concomitante con una cepa de *Bifidobacterium* de la misma empresa.

6) *Lactobacillus casei*: numerosas cepas de esta especie han sido incorporadas exitosamente en productos comerciales conocidos tanto en el ámbito nacional (Leche Bio con una cepa aislada en el CERELA) como internacional (Actimel con *Lactobacillus casei* Inmunitas, Yakult con *Lactobacillus casei* Shirota) (Sanders y Huis int't Veld, 1999; Taranto y col., 2005). La cepa ensayada en nuestro trabajo es comercializada por una firma de renombre a nivel internacional y se ha incluido en el producto lácteo fluido Symbalance (Sanders y Huis int't Veld, 1999), entre otros.

## **1.2. Cepa aislada en el INLAIN**

7) *Lactobacillus rhamnosus* F16: si bien no se trata de una cepa comercial con una larga trayectoria de estudios a nivel internacional e incorporación a diversos productos alimenticios, se ha demostrado que la misma presenta buenas propiedades tanto tecnológicas como probióticas. Esta cepa fue aislada en el laboratorio de microbiología del INLAIN durante el desarrollo de una Tesis de Maestría y se sometió a diversos estudios *in vitro*. De esta manera se comprobó buen crecimiento de la misma en medios de cultivo a pH 5,0-5,5, resistencia a NaCl y KCl hasta una concentración del 3% (p/v), excelente viabilidad durante un período de 30 días a 5°C en leche acidificada a pH 4 y 5, resistencia a una solución gástrica simulada *in vitro* y resistencia a bilis. Además, produjo la inhibición *in vitro* de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Villarreal, 2002). De acuerdo con los resultados mencionados, se decidió incluir la cepa en el presente estudio con el objetivo de continuar así su caracterización tecnológica.



## 2. Diseño experimental

La incorporación de cada una de las siete cepas en queso Pategrás Argentino fue ensayada en forma independiente, y finalmente se realizó un ensayo empleando tres de ellas, de acuerdo al siguiente esquema:

**Tabla 2.** Cepas probióticas incorporadas en quesos (ensayos en orden cronológico).

<b>Ensayo</b>	<b>Cepa utilizada</b>
<i>1</i>	<i>Lactobacillus acidophilus A</i>
<i>2</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
<i>3</i>	<i>Lactobacillus acidophilus B</i>
<i>4</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>
<i>5</i>	<i>Lactobacillus acidophilus C</i>
<i>6</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>7</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (cepa no comercial)
<i>8</i>	mezcla { <i>Lactobacillus acidophilus C</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>

Cuando se determinó qué cepas utilizar en el ensayo 8, se tuvieron en cuenta tanto los resultados obtenidos hasta ese momento en los ensayos individuales, como el empleo de una cepa de cada especie/grupo.

Para cada ensayo (1 al 8) se elaboraron tres tipos de queso: un queso testigo (T) sin bacterias probióticas, y dos quesos experimentales con adición de probióticos mediante metodologías diferentes; en la primera de ellas (quesos E1) se utilizó directamente el cultivo probiótico comercial liofilizado y congelado, mientras que en la segunda (quesos E2) las bacterias se incubaron en un sustrato lácteo con alto contenido graso previo a la elaboración. La metodología de preparación del sustrato lácteo graso y las dos formas de adición de los probióticos al queso se tratarán en detalle en las secciones 3 y 4 de *Materiales y Métodos*, respectivamente.

El diseño incluyó la elaboración de un queso de cada tipo (T, E1, E2) por día. Para los análisis fisicoquímicos se realizaron tres elaboraciones (réplicas) para cada

cepa y mezcla de cepas ensayada, resultando un total de 9 quesos por experiencia (72 quesos en total).

Por otro lado, se realizaron elaboraciones adicionales para los análisis sensoriales exclusivamente. Las mismas se llevaron a cabo una vez completado el esquema de elaboraciones programado para el análisis fisicoquímico, y comprendieron la repetición del esquema anterior de un queso de cada tipo (T, E1, E2) por día, sólo que en este caso se realizó una sola elaboración por ensayo, y no se ensayaron todas las cepas sino sólo las correspondientes a los ensayos 1, 2, 4, 5 y 8 (ver Tabla 2), teniendo en cuenta utilizar por lo menos una cepa de cada grupo probiótico (dos *Lactobacillus acidophilus*, un *Lactobacillus* del grupo casei y una bifidobacteria).

### **3. Preparación del sustrato lácteo graso**

Como se mencionó previamente, en una variante de los quesos experimentales (E2) el agregado de las bacterias probióticas se realizó luego de la incubación de las mismas en un sustrato lácteo con elevado contenido de materia grasa. El fundamento de esta elección se basó en que, como se explicó en la introducción, existen factores relacionados con la preparación previa del inóculo probiótico que pueden tener un efecto significativo en su viabilidad y su actividad metabólica en el producto final. Entre ellos podemos nombrar la composición y el pH del medio utilizado para la propagación, la fase de crecimiento en que se encuentra el cultivo en el momento de su incorporación al alimento, y el estrés térmico, ácido u osmótico que pueda haber sufrido el cultivo durante la etapa de crecimiento. La metodología de propagación elegida en nuestro caso en particular constituye la adaptación de otra utilizada anteriormente por Daigle y col. (1999) y se basa en una fermentación en dos pasos, la cual supone una mejor supervivencia del cultivo probiótico durante el período de vida útil del producto final (Shah, 2000).

El sustrato lácteo graso (SLG) se preparó el día previo a cada elaboración de quesos, y 1 L del mismo se utilizó para propagar el cultivo probiótico antes de su agregado a la leche de elaboración de los quesos E2 (45 L). La composición final del SLG fue adoptada de Daigle y col. (1999), siendo del 14% (p/v) de materia grasa y 5,2% (p/v) de proteínas. La preparación del SLG se llevó a cabo utilizando leche descremada en polvo (35,3% p/p de proteínas y 1,2% p/p de materia grasa) (Molico, Nestlé Argentina, Buenos Aires, Argentina) y crema de leche cruda suministrada por

una industria láctea local (Milkaut Coop. Ltda., Franck, Santa Fe, Argentina). La crema de leche se transportó refrigerada al laboratorio cada día que fue necesario preparar el SLG, y una vez allí se determinó su contenido de materia grasa (FIL-IDF, 1997).

La cantidad de leche en polvo utilizada fue la necesaria para obtener 1 L de SLG con una concentración de proteínas del 5,2% (p/v), es decir la cantidad de leche en polvo que contenía 52 g de proteínas. Sabiendo que la concentración de proteínas en la leche en polvo era de 35,3% (p/p), la masa de leche en polvo a pesar se determinó de acuerdo a la ecuación:

$$\text{Leche en polvo} = 52 \text{ g proteínas} / (0,353 \text{ g proteína/g leche en polvo}) = 147,3 \text{ g}$$

Para la preparación de 1 L de SLG se necesitaban 140 g de materia grasa, de los cuales 1,8 eran aportados por la leche en polvo ( $147,3 \text{ g} \times 0,012 \text{ g grasa/g} = 1,77 \text{ g}$  grasa), por lo que se requería una cantidad de crema que aportase 138,2 g de grasa, de acuerdo a:

$$\text{Crema de leche} = 138,2 \text{ g materia grasa} / (\% \text{ materia grasa}/100 \text{ g crema leche})$$

Como ejemplo, para un contenido de materia grasa del 40% en la crema de leche, la cantidad de crema necesaria hubiese sido igual a  $138,2 / (40/100) = 345,5 \text{ g}$  de crema de leche.

Una vez calculada la cantidad de crema de leche necesaria, ésta se introdujo en un erlenmeyer de 2 L de capacidad. La masa de leche en polvo fue pesada exactamente, disuelta completamente en agua destilada y agregada a la crema. Luego de agregar agua destilada en cantidad suficiente para completar el volumen final de 1 L y homogeneizar la mezcla, se realizó una pasteurización en baño maría a 80°C durante 5 minutos, tras lo cual el SLG se enfrió rápidamente a 37°C.

Por otro lado, y trabajando en esterilidad, se pesó la cantidad necesaria de fermento probiótico liofilizado para lograr una concentración final de  $5 \times 10^7$  UFC/mL en el SLG. Esta cantidad fue la misma utilizada directamente en forma liofilizada, para su agregado a los 45 L de la leche de la misma elaboración en los quesos E1. Esta metodología se aplicó a todos los fermentos probióticos comerciales ensayados. Una vez pesado, el fermento liofilizado se agregó al SLG recién pasteurizado y enfriado, incubándose durante 5 h en baño a 37°C. Terminado el período de fermentación del SLG, se mantuvo en heladera a 4°C hasta el día siguiente, cuando se utilizó para la elaboración de quesos. La supervivencia de las bacterias probióticas en el SLG y el pH del mismo fueron monitoreados durante la incubación y luego del almacenamiento a 4°C, para cada cepa probiótica ensayada.

En el caso de *Lactobacillus rhamnosus*, al tratarse de un cultivo que se encontraba congelado a -20°C con caldo MRS y glicerol (15% v/v), la preparación de los inóculos fue diferente, tanto para quesos E1 como E2. En primer lugar, se realizó la reactivación de la cepa mediante un repique del cultivo congelado en caldo MRS e incubación a 37°C durante 24 h. Luego de comprobar un buen crecimiento celular, se observó la morfología de las células al microscopio (1000x, Microscope Jenamed 2, CARL ZEISS) y se constató la pureza mediante análisis macro y microscópico de las colonias crecidas posteriormente en estrías, en placas incubadas en microaerofilia a 37°C durante 24 h. En forma simultánea, se verificó la capacidad de la cepa para crecer en leche y su capacidad de coagular la misma. Una vez comprobada la pureza de la cepa se obtuvo un cultivo concentrado mediante dos repiques sucesivos y, una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO) de 0,8, se determinó su concentración con la finalidad de establecer la cantidad necesaria para inocular la leche de elaboración. Los recuentos se hicieron a partir de diluciones decimales del cultivo concentrado, en placas con MRS-agar incubadas en microaerofilia a 37°C durante 48 h.

Considerando, al igual que para las cepas probióticas comerciales ensayadas, un inóculo inicial de *Lactobacillus rhamnosus* en la leche de elaboración de  $10^6$  UFC/mL, calculamos que para un volumen de leche de elaboración de 45 L serían necesarias  $10^6$  UFC/mL x 45000 mL =  $4.5 \times 10^{10}$  UFC. Por consiguiente, el volumen requerido del cultivo concentrado de *Lactobacillus rhamnosus* sería:

$$\text{Vol. cultivo conc. (mL)} = 4.5 \times 10^{10} \text{ UFC} / (X \text{ UFC/ml de cultivo concentrado})$$

El día previo a la elaboración se inoculó por duplicado el volumen de caldo MRS calculado con un cultivo over night de *Lactobacillus rhamnosus*, y se incubó a 37°C hasta alcanzar una DO de 0,8 (en las mismas condiciones en las que se determinó la concentración del cultivo concentrado, para que la cantidad de células sea equivalente). Luego se centrifugó a 3000 g durante 10 min en tubos Falcon de 50 mL estériles, y se descartó el sobrenadante. Se obtuvieron dos pellets equivalentes, uno de ellos se incorporó al SLG pasteurizado (para la elaboración del queso E2) y el otro se resuspendió en 50 mL de leche descremada reconstituida al 10% (p/v), previamente esterilizada y se inoculó en la leche de elaboración (E1).

#### **4. Elaboraciones de quesos**

Los quesos fueron elaborados en la planta piloto del Instituto de Lactología Industrial, de acuerdo con el proceso estándar correspondiente al queso Pategrás Argentino (Zalazar y col., 1999). Cada día de elaboración se utilizaron 135 L de leche cruda de vaca ( $3,5 \pm 0,3\%$  p/v de materia grasa,  $3,0 \pm 0,3\%$  p/v de proteínas, pH  $6,70 \pm 0,05$ , acidez Dornic  $18 \pm 1$  °D (1 °D = 100 mg de ácido láctico /L)), recolectada en el mismo día y provista por Milkaut Coop. Ltda. (Franck, Santa Fe, Argentina). La leche se utilizó inmediatamente luego de su recepción. En primer lugar se realizó una pasteurización en tina del volumen total de leche mediante calentamiento a 65 °C durante 20 minutos, tras lo cual se enfrió a 37 °C y se adicionó cloruro de calcio (Merck, Germany) en cantidad suficiente para alcanzar una concentración del 0,02% (p/v). Esta adición es recomendable para reponer el calcio iónico que precipita parcialmente durante el calentamiento, hecho que produce una desmineralización de las micelas de caseína y afecta negativamente el proceso de coagulación. Posteriormente, la leche se dividió en tres alícuotas de 45 L cada una, para elaborar un queso de cada tipo (T, E1 y E2). Dado que sólo se contaba con dos tinajas queseras, dos alícuotas de leche se utilizaron para la manufactura simultánea de dos tipos de queso, mientras que la tercera se almacenó para realizar la elaboración del queso restante inmediatamente luego de finalizadas las primeras. El orden cronológico de elaboración y las tinajas utilizadas para cada tipo de queso, fueron intercambiados para las tres réplicas (en días distintos) de cada ensayo, con el propósito de minimizar diferencias en los resultados asociadas con el proceso de elaboración.

Debido a que en una variedad de queso experimental (E2) el agregado de las bacterias probióticas se realizó previa incubación en un sustrato con alto contenido de materia grasa, y a las dificultades para estandarizar el contenido graso a un nivel menor al naturalmente presente en la leche cruda, dicha estandarización se realizó a una concentración significativamente mayor ( $3,8\%$  p/v) al mínimo requerido por el Código Alimentario Argentino (2006) ( $3,0\%$  p/v), lo cual está justificado por tratarse de un producto que, si bien se basa en una variedad de quesos definida, es novedoso en nuestro país. Para llevar a cabo la estandarización del contenido graso se utilizó crema de leche provista por Milkaut Coop. Ltda. (Franck, Santa Fe, Argentina), que fue pasteurizada a 80 °C durante 5 minutos y cuyo contenido de materia grasa se determinó por el método butirométrico (FIL-IDF, 1997). En la leche destinada a la elaboración de los quesos T y E1, donde los fermentos se agregaron en forma liofilizada

exclusivamente, se adicionó crema de leche con una cantidad de materia grasa equivalente a la que aportaba el SLG utilizado para la elaboración de un queso E2 y, cuando fue necesario debido a un bajo contenido de materia grasa en la leche cruda, se agregó crema de leche en forma adicional hasta alcanzar el 3,8% (p/v) en la leche de elaboración de los tres quesos. A su vez, si bien el contenido de proteínas no fue estandarizado a una concentración prefijada, se tuvo en cuenta que sea el mismo en la leche de elaboración de todos los quesos, para lo cual la misma se suplementó en los quesos T y E1, con igual cantidad de leche en polvo que la empleada en la preparación del SLG.

Una vez a 37 °C, se procedió a agregar los fermentos. El fermento primario, constituido por un cultivo liofilizado comercial de *Streptococcus thermophilus* (Diagramma S.A., Santa Fe, Argentina), fue pesado en un erlenmeyer estéril, resuspendido en 100 mL de la leche de elaboración (ya pasteurizada), mantenido a 37 °C durante 15 minutos con el objetivo de lograr una correcta homogeneización del cultivo en polvo, y agregado en la tina de elaboración. La cantidad de fermento liofilizado pesada fue la necesaria para lograr una concentración en leche de  $10^6$  UFC/mL, excepto en los ensayos 3, 5 y 8, donde se utilizó una cantidad menor debido a problemas de acidificación excesiva en el SLG, y se agregó de la misma manera en los tres quesos. El agregado de las cepas probióticas en forma liofilizada en los quesos E1 se realizó en forma concomitante con el agregado del fermento primario, pesando el polvo liofilizado en el mismo erlenmeyer de manera de alcanzar, también en este caso, una concentración de probióticos en leche de  $10^6$  UFC/mL. En el queso E2 el agregado de las bacterias probióticas se realizó en el SLG, inmediatamente luego de la adición del fermento primario; en este caso el SLG preincubado el día anterior, fue retirado de la heladera y calentado hasta 37 °C antes de su adición a la leche de elaboración.

Transcurridos 15 minutos desde el agregado de los fermentos, 1 g de quimosina pura (MAXIREN-150, Gist Brocades, France; fuerza coagulante: 150.000 IMCU/g) se dispersó en aproximadamente 25 mL de agua destilada y se agregó en la tina para efectuar la coagulación; el pH de la leche en el momento de su adición fue de alrededor de 6,5. Cuando el coágulo alcanzo la firmeza adecuada, lo cual fue determinado empíricamente mediante el uso de una espátula, se realizó el corte del mismo empleando una lira de acero inoxidable con cuerdas tensadas paralelas. Luego del primer corte se dejó reposar aproximadamente 5 minutos y se realizaron cortes sucesivos, con agitación intermedia, hasta obtener trozos de cuajada del tamaño de

granos de maíz. A partir de ese momento se comenzó un calentamiento a una velocidad de 1 °C/minuto hasta alcanzar los 45 °C, temperatura que se mantuvo constante durante 10-15 minutos más, con agitación continua en todo momento, con el propósito de permitir el drenaje del suero y reducir el contenido de humedad en los granos de cuajada. Cuando los mismos alcanzaron la humedad adecuada para la elaboración del queso Pategrás Argentino, la cuajada fue extraída de la tina y colocada en moldes cilíndricos. Los moldes fueron prensados a temperatura ambiente (22-25 °C) durante 18 h (0,2-0,3 Kg/cm<sup>2</sup>). Se obtuvieron quesos de aproximadamente 4 Kg cada uno, que fueron colocados en salmuera (20% p/v, pH 5,4) a 12 °C durante 24 h, teniendo en cuenta (dado que se trata de un queso semiduro) un tiempo de salado de 6 h/Kg de queso. La maduración se realizó en cámara a 12 °C y 80% de humedad relativa, sin envasado de los quesos, durante 60 días. Si bien para este tamaño de queso el Código Alimentario Argentino (2006) establece un período mínimo de maduración de 45 días, el mayor tiempo definido para este trabajo se debe a que, en este caso en particular, es importante verificar y asegurar una alta concentración de bacterias probióticas aún más allá del punto óptimo de maduración.

## **5. Determinaciones fisicoquímicas**

### **5.1. Leche y crema de leche**

La muestra de leche destinada a análisis fisicoquímicos se extrajo de la tina de elaboración durante el calentamiento bajo agitación previo a la etapa de pasteurización, cuando la temperatura alcanzó los 40°C, dado que a dicha temperatura se asegura la homogeneidad de la materia grasa y no hay aún cambios en la estructura de los componentes de la leche.

La crema de leche cruda fue analizada inmediatamente tras su recepción en el laboratorio, luego de una agitación suave, que permitió la homogeneización de la materia grasa sin provocar daños en los glóbulos grasos.

#### **5.1.1. pH**

El pH se determinó en leche de acuerdo al método propuesto por la American Public Health Association (APHA) (Bradley y col., 1993). Para tal fin se utilizó un peachímetro Orion (Orion Research Incorporated, Estados Unidos), provisto de un

electrodo combinado (vidrio y calomel). Luego de calibrar el instrumento con soluciones tamponadas de pH 4,00 y 7,00, se realizó la lectura de pH en forma directa por inmersión del electrodo en una alícuota de leche recién obtenida. Se consideró como valor final de pH al promedio de dos lecturas sobre la misma muestra.

### **5.1.2. Materia grasa**

La materia grasa tanto de la leche como de la crema de leche fue determinada por duplicado utilizando métodos butirométricos (FIL-IDF, 1997).

Para la determinación en leche se introdujeron 10 mL de ácido sulfúrico (1,82 g/mL; aproximadamente 90% v/v) en un butirómetro específico; luego se adicionaron exactamente 11 mL de leche (medidos con una pipeta volumétrica de doble aforo diseñada específicamente para este análisis) lentamente y por las paredes del butirómetro, y finalmente se agregó 1 mL de alcohol isoamílico. Se cerró el butirómetro y se agitó hasta la disgregación total de la muestra. La muestra se termostató a 65 °C en baño maría, se centrifugó en una centrifuga para butirómetros durante 10 minutos y se llevó nuevamente a 65 °C hasta estabilización de la temperatura. La lectura se realizó leyendo directamente el porcentaje de grasa en la escala graduada del butirómetro, la cual se encuentra calibrada para el volumen de leche empleado.

La determinación en crema de leche se realizó empleando un butirómetro específico, en el cual se pesaron exactamente, en balanza analítica, entre 4 y 5 g de muestra. Luego de cerrar el butirómetro en su extremo inferior, se adicionaron en forma sucesiva 10 mL de agua destilada, 10 mL de ácido sulfúrico (1,82 g/mL; aproximadamente 90% v/v) y 1 mL de alcohol isoamílico. El butirómetro se cerró y se continuó el análisis de la misma forma que para la determinación en leche, excepto que en este caso, debido a que la escala del butirómetro se encuentra calibrada para la lectura directa a partir de 5 g de muestra, se efectuó la corrección del porcentaje de materia grasa leído ( $L$ ) teniendo en cuenta la masa exacta (en gramos) de crema de leche utilizada ( $mcl$ ), resultando la lectura final:

$$\text{Materia grasa (\% p/p)} = (L \times 5)/mcl$$

### **5.2. Quesos**

Las muestras de queso destinadas a determinaciones fisicoquímicas fueron tomadas en base a la norma 50A de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF, 1980), a 3, 30 y 60 días de maduración. Los análisis de extracto seco, proteínas y



materia grasa se realizaron a los 3 días de maduración. El contenido de cloruro de sodio se analizó a los 30 días, para asegurar una mejor distribución de la sal en toda la masa del queso. El pH, por su parte, se midió a los 3, 30 y 60 días.

El muestreo se llevó a cabo mediante extracción de cilindros de queso desde la corteza hasta el centro del mismo, utilizando un calador de acero inoxidable. Se descartó 1 cm de la corteza de cada cilindro y el remanente (aproximadamente 10 g) se trituró utilizando una prensa manual, se homogeneizó mecánicamente, y se separó en diferentes recipientes (de acuerdo al tipo de análisis a realizar) que se mantuvieron a -18°C hasta su procesamiento, a excepción de las determinaciones de extracto seco, pH y materia grasa que se realizaron en el mismo día de muestreo. Para cada queso a un tiempo de maduración determinado, se obtuvieron al menos 50 g de muestra.

### **5.2.1. pH**

El pH de los quesos se midió de acuerdo al método de la APHA (Bradley y col., 1993), al igual que para leche, y utilizando el mismo aparato. En este caso, la muestra se colocó en un colector adecuado y se compactó de tal manera de permitir un buen contacto con el electrodo. Tras poner en contacto el electrodo con el queso, se midió el pH en forma directa, una vez que la lectura se estabilizó en un valor constante. El pH de cada muestra se determinó por duplicado.

### **5.2.2. Materia grasa**

La determinación de materia grasa en los quesos se realizó por duplicado, empleando el método butirométrico (FIL-IDF, 1997).

El butirómetro utilizado fue uno específico para queso. En la parte inferior del mismo se pesó exactamente, en balanza analítica, una masa de alrededor de 1,5 g de muestra. Se cerró la parte inferior del butirómetro y por la parte superior se agregaron, lentamente y por las paredes, 10 mL de ácido sulfúrico (1,82 g/mL; aproximadamente 90% v/v), 8 mL de agua destilada y 1 mL de alcohol isoamílico, en ese orden. Se continuó el análisis de la misma forma detallada para leche; luego de centrifugar se llevó a 65°C en baño maría y se leyó el porcentaje de grasa en la escala graduada en la parte superior del butirómetro. Como esta escala se corresponde con la utilización de 3 g de queso, el porcentaje de grasa final de la muestra se determinó según:

$$\text{Materia grasa (\% p/p)} = (L \times 3)/mq, \text{ donde}$$

*mq*: masa exacta (g) pesada para cada muestra de queso analizada

*L*: porcentaje de materia grasa leído en la escala del butirómetro.

### 5.2.3. Extracto seco

El extracto seco de los quesos se determinó por duplicado, empleando el método oficial de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF, 1982). Para ello, se utilizó un sistema de cristizador y varilla de vidrio, al cual se agregaron aproximadamente 30 g de arena, previamente tratada con ácido clorhídrico concentrado. Posteriormente, este conjunto se llevó a sequedad en estufa a  $102 \pm 1^\circ\text{C}$ . Una vez seco y enfriado en desecador, se determinó exactamente, en balanza analítica, el peso del sistema de cristizador, arena y varilla, antes ( $m_1$ ) y después ( $m_2$ ) de la adición de aproximadamente 3 g de la muestra de queso a analizar. La muestra se homogeneizó con la arena utilizando la varilla de vidrio, para aumentar la superficie de evaporación de la muestra, y se llevó a estufa a  $102 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 5 h (se verificó previamente que este tiempo era mayor al necesario para lograr un peso constante). Luego se enfrió en desecador y se pesó nuevamente el sistema ( $m_3$ ). El extracto seco de la muestra se calculó según:

$$\text{Extracto seco (\% p/p)} = [(m_3 - m_1) / (m_2 - m_1)] \times 100$$

### 5.2.4. Proteínas totales

El contenido de proteínas se determinó por duplicado empleando el método de Kjeldahl, que es la técnica de referencia de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF, 1993). Para ello, se tomaron aproximadamente 0,3 g de queso y se determinó su peso exacto utilizando para tal fin una balanza analítica. Luego, la muestra se colocó en un tubo de vidrio adecuado, y se realizó la mineralización química de la misma mediante el agregado de 3,5 g de sulfato de potasio, 100 mg de dióxido de titanio, y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, y la incubación a  $400^\circ\text{C}$  bajo campana en un equipo digestor especial (Digestion System 6, 1007 Digester, Tekator, Suecia). El tiempo de incubación fue el necesario para lograr que la muestra quede totalmente translúcida (usualmente unas 4 ó 5 h). En la misma, todo el nitrógeno proveniente de las proteínas, péptidos y aminoácidos se encontraba en la forma de ión amonio. La muestra completamente mineralizada se enfrió hasta temperatura ambiente, se adicionó con gotas de una solución de fenolftaleína (1% p/v en alcohol etílico) y se colocó en una unidad de destilación (BÜCHI Distillation Unit B-324, Suiza). Dicho equipo fue programado para realizar la adición automática de 70 mL de hidróxido de sodio (50%

p/v) con el objetivo de transformar el amonio en amoníaco, el cual fue posteriormente destilado mediante arrastre con vapor de agua. El líquido destilado se recogió en un erlenmeyer conteniendo 60 mL de ácido bórico (2% p/v) y gotas de un indicador de pH constituido por azul de metileno (0,1% p/v) y rojo de metilo (0,15% p/v) en solución alcohólica al 96%. El amoníaco destilado fue de esta manera capturado en forma de ión amonio en la solución recolectora. Luego se realizó la titulación del borato de amonio con una solución previamente valorada de ácido sulfúrico (aproximadamente 0,1 N), empleando una microbureta de 5 mL de capacidad.

El contenido de nitrógeno total (NT) en las muestras, expresado como porcentaje en la masa del queso, se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{Nitrógeno total (\% p/p)} = (V_a \times C_a \times 0,014 \times 100\%) / m_q, \text{ donde:}$$

$V_a$ : volumen (mL) de la solución de ácido sulfúrico gastado en la titulación,

$C_a$ : concentración (miliequivalentes por mL) de la solución de ácido sulfúrico utilizada en la titulación,

$0,014$ : masa equivalente del nitrógeno (g por miliequivalente),

$m_q$ : masa de muestra exacta (g) utilizada para el análisis.

Para expresar el resultado como contenido de proteínas, el valor obtenido como nitrógeno total se multiplica por un factor, el cual varía dependiendo del tipo de proteína que se trate, según su composición en aminoácidos. Para el caso de los productos lácteos, este factor es igual a 6,38.

#### **5.2.5. Cloruro de sodio**

El contenido de sal en las muestras de queso se determinó a través de la cuantificación de sodio, mediante espectrofotometría de absorción atómica (AOAC, 1990). Una masa aproximada de 1 g de muestra de queso fue pesada exactamente en un crisol de porcelana, utilizando una balanza analítica, y deshidratada en estufa a 100°C durante una noche. Al día siguiente, la muestra seca se introdujo en una mufla y se comenzó un calentamiento gradual (aproximadamente 100°C/h) hasta llegar a 500°C, evitando la ignición. Una vez alcanzada dicha temperatura, la misma se mantuvo constante durante 5 h y luego se enfrió a temperatura ambiente. Como en todos los casos las cenizas obtenidas presentaron un color gris, debido a la presencia de partículas de carbono, se agregaron cuidadosamente gotas de ácido nítrico 1:1 y se realizó un nuevo calentamiento en mufla a 100°C, luego 300°C y finalmente 500°C, con una hora en cada etapa. Las cenizas así tratadas presentaron un color blanco, se disolvieron en

HCl 1 N y se trasvasaron a un matraz, completando con agua destilada hasta un volumen final de 50 mL.

El contenido de sodio de esta solución se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica, y el resultado se obtuvo como ppm (mg/L) de sodio. A partir de dicho valor se calculó la concentración de sal (como cloruro de sodio) en la humedad del queso, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Sal en la humedad (\% p/p)} = ([Na] \times 2,543 \times V_m \times 100\%) / (mq \times (H/100))$$

$[Na]$ : concentración de sodio (mg/L) en la solución analizada por espectrofotometría,

2,543: Peso molecular NaCl / Peso molecular Na,

$V_m$ : volumen del matraz (L),

$mq$ : masa (mg) de muestra utilizada para el análisis,

$H$ : porcentaje de humedad del queso.

## **6. Recuentos microbiológicos**

Las muestras de suero y cuajada para análisis microbiológicos (aproximadamente 30 g para cada una) se extrajeron con la mayor asepsia posible dentro de erlenmeyers estériles durante la elaboración de quesos, inmediatamente antes del moldeo, y se conservaron a 4°C hasta su análisis, realizado el mismo día. El muestreo de quesos para análisis microbiológicos se llevó a cabo a los 3, 15, 30, 45 y 60 días de maduración, de manera similar al realizado para análisis fisicoquímicos, sólo que en este caso la extracción se realizó entre mecheros, y previo a la misma se esterilizó el calador y se limpió y desinfectó con alcohol la superficie del queso. Cada muestra obtenida (aproximadamente 10 g) se colocó en un erlenmeyer estéril y se mantuvo a 4°C hasta su posterior procesamiento dentro del mismo día.

En las muestras de suero y cuajada se realizaron recuentos del fermento probiótico para determinar si había pérdidas significativas durante la elaboración, mientras que la evolución de ambos fermentos primario y probiótico se estudió en quesos a los 0 (cuajada), 3, 15, 30, 45 y 60 días de maduración.

Para llevar a cabo los recuentos microbiológicos en suero, se prepararon diluciones decimales sucesivas de los mismos en agua de peptona de caseína estéril (0,1% p/v) (Microquim, Santa Fe, Argentina), y se sembraron en superficie 0,1 mL de cada dilución en el medio de cultivo correspondiente a cada fermento analizado. En el

caso de los análisis en quesos, 10 g de muestra se emulsionaron con citrato de sodio estéril (2% p/v) en una licuadora previamente esterilizada, se realizaron diluciones decimales sucesivas de esta suspensión en agua de peptona de caseína estéril (0,1% p/v), y se sembraron en superficie 0,1 mL de cada una en el medio de cultivo correspondiente al fermento analizado.

El recuento del fermento primario de *Streptococcus thermophilus* se realizó en el medio de cultivo APC-Leche con incubación a 37°C durante 48 h (Frank y col., 1993). Los lactobacilos probióticos, cuando se utilizaron en forma individual, se determinaron utilizando MRS-agar con incubación a 37°C durante 48 h (Vinderola y Reinheimer, 2000). Para el recuento de bifidobacterias, ya sean adicionadas en forma individual o junto con lactobacilos probióticos, se empleó MRS-agar suplementado con cloruro de litio (0,2% p/v) y propionato de sodio (0,3% p/v) (Vinderola y Reinheimer, 1999), incubándose a 37°C en anaerobiosis durante 72 h. Cuando se emplearon tres cepas probióticas en forma simultánea (ensayo 8), el medio de cultivo utilizado para el recuento de lactobacilos (MRS-agar) se adicionó al 1,5% (v/v) con bilis 10%, de manera de lograr una diferenciación entre *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei* (Vinderola y Reinheimer, 2000). Por otra parte, se realizó el recuento en MRS-agar de la flora NSLAB, en quesos a los 3, 15, 30, 45 y 60 días de maduración, para determinar el crecimiento de este grupo microbiano y compararlo con el de los fermentos probióticos adicionados en los quesos experimentales.

## **7. Determinación del perfil de ácidos grasos libres en quesos**

El perfil de ácidos grasos libres (AGL), desde el ácido caproico (C<sub>6:0</sub>) hasta el ácido linoleico (C<sub>18:2</sub>), se determinó en todos los quesos a los 3 y 60 días de maduración, de acuerdo al protocolo propuesto por Perotti y col. (2005). El mismo involucra una etapa de extracción y aislamiento de los AGL a partir de la matriz del queso, una derivatización posterior empleando como reactivos alcohol etílico y ácido sulfúrico, y la ulterior cuantificación de los ésteres etílicos formados mediante cromatografía gaseosa. Los ácidos butírico (C<sub>4:0</sub>), propiónico (C<sub>3:0</sub>) y acético (C<sub>2:0</sub>) no fueron cuantificados debido a que, dada su relativamente elevada polaridad, el método de extracción utilizado no recupera el 100% de los mismos a partir de la muestra de queso.

Dado que el método empleado no permite determinar la concentración de los AGL en forma absoluta, su cuantificación se realizó de manera indirecta, utilizando ácidos enántico (C<sub>7:0</sub>) y margárico (C<sub>17:0</sub>) como estándares internos. Dichos ácidos son compuestos químicamente similares a los que se desea cuantificar, que no se encuentran presentes en la muestra en cantidades detectables por el método utilizado, y se adicionan a la misma antes de su procesamiento en una concentración perfectamente conocida. Luego, los mismos son extraídos y analizados de la misma manera que los AGL presentes en el queso, por lo que la cuantificación de estos últimos se realiza relacionando las señales obtenidas con las correspondientes a los estándares internos.

### **7.1. Extracción y aislamiento de los ácidos grasos libres**

El aislamiento de los AGL a partir del queso se realizó en dos etapas; la primera involucró la extracción de los lípidos totales de la muestra de queso, y la segunda la separación de los AGL del resto de los lípidos.

En primer lugar, se colocaron 400 µL de una solución de ácido enántico (1 mg/mL en isopropanol) y 2 mL de una solución de ácido margárico (1 mg/mL en isopropanol) en un cristizador de vidrio limpio y seco. Luego se adicionaron aproximadamente 0,5 mL de una solución de NaOH 0,1 N y gotas de una solución de fenolftaleína (1% p/v en alcohol etílico) para asegurar que los estándares internos se encuentren en forma de sales (pH>8). Posteriormente, las sales se llevaron a sequedad por evaporación en estufa a 100°C. Por otro lado, las muestras de queso trituradas, y mantenidas a -18°C fueron descongeladas y homogeneizadas con la ayuda de una espátula de acero inoxidable. A continuación, se agregó aproximadamente 4 g de cada muestra de queso por cristizador, y su peso se determinó exactamente utilizando una balanza analítica. La muestra de queso se frotó contra las paredes y el fondo del cristizador utilizando una varilla de vidrio, con el objetivo de incorporar las sales de los estándares internos a la muestra. Una vez hecho esto, se adicionaron 2 gotas de rojo congo (indicador de pH) y 0,5 mL de ácido sulfúrico (50% v/v) para asegurar un pH menor a 2. La muestra se homogeneizó nuevamente y se deshidrató con el agregado de aproximadamente 25 g de sulfato de sodio anhidro.

Una vez seca, la muestra se cargó en un cartucho cilíndrico hecho con papel de filtro y se colocó en un extractor Twisselmann. La materia grasa total de la muestra se extrajo en un erlenmeyer, a través de la condensación y goteo a velocidad constante (3 mL/minuto) de 100 mL de n-hexano (calidad cromatográfica) a 60°C durante 2 h.

Finalizada la etapa de extracción, la materia grasa disuelta en n-hexano se concentró hasta un volumen de aproximadamente 20 mL, tras lo cual se enfrió y se agregaron 16 mL de agua, 20 mL de alcohol isopropílico y gotas de fenolftaleína. Inmediatamente se realizó una titulación en dos fases con NaOH acuoso 0,1 N, bajo agitación muy suave para evitar la formación de una emulsión. El primer exceso de NaOH se verificó por el viraje del indicador en la fase acuosa-alcohólica, y significó la migración completa de los AGL (en forma de sales) hacia la misma. La fase acuosa-alcohólica se separó en un nuevo cristizador de vidrio, con la ayuda de una ampolla de decantación. Se realizaron dos lavados de la fase orgánica en la misma ampolla de decantación, con 20 mL de agua destilada cada uno, que se agregaron al cristizador. Finalmente, el cristizador se mantuvo en estufa a 100°C hasta sequedad.

## **7.2. Derivatización**

Las sales secas de los AGL fueron raspadas de las paredes del cristizador utilizando una espátula, y se colocaron en un tubo de vidrio con tapa a rosca. En el mismo tubo se agregó 8 mL de ácido sulfúrico (5% v/v en alcohol etílico) y se llevó a estufa a 70-72°C durante 1 h, etapa durante la cual se produce la reacción de derivatización de los AGL, con la consiguiente obtención de los ésteres etílicos correspondientes. Luego de enfriar la mezcla de reacción, se agregaron 6 mL de agua destilada para facilitar la posterior separación de fases, y se adicionó 1 mL de n-hexano para extraer los ésteres etílicos. Los tubos se agitaron y se mantuvieron a 4°C durante 30 minutos. Una vez separada la fase superior de n-hexano conteniendo los ésteres etílicos de los AGL, se extrajo parte de su volumen utilizando una pipeta automática y se colocó en recipientes de vidrio herméticos hasta su análisis por cromatografía gaseosa.

## **7.3. Cromatografía gaseosa**

Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer modelo 9000, utilizando inyección manual mediante una jeringa Hamilton de 1 µL de capacidad y empleando para el análisis de los datos obtenidos el software Turbochrom v. 4.0. El equipo se encontraba equipado con un inyector split/splitless, un detector de ionización de llama (FID) y una columna cromatográfica capilar de sílica fundida modelo PE-Wax (Perkin Elmer Corp., USA; polietilenglicol, 30m x 0.25 mm x 0.25 µm).

La temperatura del horno fue programada de la siguiente manera: 50°C (4 minutos); una rampa de temperatura hasta 150°C a 10°C/minuto; 150°C (3 minutos), una segunda rampa de temperatura hasta 230°C a 10°C/minuto y una temperatura final de 230°C (5 minutos). El inyector fue termostatzado a 220°C en modo split (relación de split: 1/52) y el detector se mantuvo a una temperatura constante de 275°C. La presión a la entrada de la columna fue de 22 psig, y como gas transportador se empleó nitrógeno a una velocidad de flujo constante de 3,3 mL/minuto.

Un  $\mu\text{L}$  de la solución de n-hexano que contenía los ésteres etílicos de los AGL se inyectó en el cromatógrafo de gases. Cada muestra de queso se analizó por triplicado. Las concentraciones de los AGL se calcularon a partir de las relaciones de áreas de los picos obtenidos en la corrida cromatográfica. El ácido enántico ( $\text{C}_{7:0}$ ) se utilizó para la cuantificación de los AGL de cadena corta (desde  $\text{C}_{6:0}$  hasta  $\text{C}_{12:0}$ ) y el ácido margárico ( $\text{C}_{17:0}$ ) para los ácidos grasos de cadena más larga (desde  $\text{C}_{14:0}$  hasta  $\text{C}_{18:2}$ ). La cuantificación se realizó mediante el empleo de curvas de calibración hechas anteriormente al presente trabajo, combinando concentraciones crecientes de una mezcla de los ácidos grasos  $\text{C}_{6:0}$ ,  $\text{C}_{8:0}$ ,  $\text{C}_{10:0}$ ,  $\text{C}_{12:0}$ ,  $\text{C}_{14:0}$ ,  $\text{C}_{16:0}$ ,  $\text{C}_{18:0}$ ,  $\text{C}_{18:1}$  y  $\text{C}_{18:2}$ , con concentraciones fijas de los ácidos grasos utilizados como estándares internos ( $\text{C}_{7:0}$  y  $\text{C}_{17:0}$ ).

## **8. Determinación del contenido de colesterol en quesos**

El colesterol se determinó utilizando un protocolo de saponificación y extracción directa a partir de la muestra de queso, seguido de una etapa de cuantificación por cromatografía gaseosa, de acuerdo a una adaptación de la metodología empleada por Fletouris y col. (1998).

Al igual que para la determinación de los AGL, la cuantificación del colesterol se realizó de manera indirecta, utilizando escualano como estándar interno.

### **8.1. Extracción del colesterol**

La extracción del colesterol se realizó a partir de muestras de queso de aproximadamente 400 mg. Las mismas se pesaron exactamente empleando una balanza analítica y se introdujeron en tubos de vidrio con tapa a rosca de 30 mL de capacidad. Luego se agregaron 5 mL de una solución de hidróxido de sodio 5M, preparada en alcohol etílico absoluto. Los tubos se taparon, se agitaron y se incubaron a 80°C durante



15 minutos en baño maría. Transcurrido este período, las muestras se enfriaron y se adicionaron en primer lugar con 3 mL de agua destilada, y luego con 5 mL de una solución recién preparada de escualano (50 µg/mL en n-hexano). Los tubos se taparon y se agitaron vigorosamente durante 1 minuto utilizando un agitador mecánico. Una alícuota de la fase superior de n-hexano, conteniendo el colesterol extraído del queso y el estándar interno adicionado (escualano), se analizó mediante cromatografía gaseosa.

## **8.2. Cromatografía gaseosa**

El cromatógrafo gaseoso y el método de inyección utilizados para la cuantificación de colesterol fueron los mismos empleados para la determinación de AGL, descrita previamente en detalle. En este caso se utilizó una columna SE-30 (Perkin Elmer Corp., USA, 12m x 0.32 mm x 0.25 µm), y la temperatura del horno se programó de la siguiente manera: 50°C (1 min); una rampa de temperatura hasta 280°C a 30°C/min y una temperatura final de 280°C (5 min). El inyector fue termostatzado a 280°C en modo split (relación de split: 1/6) y el detector se mantuvo a una temperatura constante de 300°C. Como gas transportador se utilizó nitrógeno a una velocidad de flujo constante de 5 mL/minuto.

Un µL de la solución de n-hexano que contenía el colesterol extraído de las muestras de queso se inyectó en el cromatógrafo de gases. Cada muestra de queso se analizó por triplicado. La concentración de colesterol se calculó a partir de la relación entre las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a dicho compuesto y al escualano. Para el cálculo se utilizaron curvas de calibrado, preparadas a partir de soluciones con concentraciones variables de colesterol (25-100 µg/mL) y una concentración fija (50 µg/mL) de escualano. Estas soluciones fueron sometidas a la misma metodología que las muestras previo a su análisis por cromatografía.

## **9. Determinación de azúcares en quesos**

### **9.1. Determinación del contenido de galactosa**

El contenido de galactosa se determinó a través de una reacción enzimática, empleando galactosa deshidrogenasa. La misma produce la oxidación de la D-galactosa presente en la muestra incógnita a ácido D-galactónico, a 20-25°C, pH 8,6 y en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>), que actúa como cofactor,

reduciéndose durante la reacción. La reducción del  $\text{NAD}^+$  genera cantidades de NADH estequiométricas a la cantidad de galactosa oxidada, que son cuantificadas mediante espectroscopia UV.

Dado que el análisis requería contar con muestras libres de proteínas, se realizó la precipitación y eliminación de las mismas como paso previo. Para ello, una muestra de 5 g de queso se disgregó utilizando una varilla de vidrio y luego se agregaron lentamente 50 mL de agua destilada tibia (aproximadamente a 50°C). Se mezcló la suspensión hasta obtener una pasta homogénea, tras lo cual se adicionaron 2,5 mL de una solución de  $\text{ZnSO}_4$  al 12% (p/v), se agitó y se dejó en reposo por 15 minutos a temperatura ambiente para lograr la precipitación de las proteínas presentes. Luego, se realizó la neutralización por adición de 6 mL de una solución de NaOH al 1,25% (p/v). Se midió el pH de la solución y, cuando fue necesario, se ajustó a un valor cercano a 8 mediante la adición de gotas de NaOH al 1,25% (p/v). Posteriormente, se completó el volumen a 100 mL con agua destilada y se dejó en reposo nuevamente por 15 minutos a temperatura ambiente. La muestra se filtró a través de un embudo de vidrio, utilizando un papel de filtro, y el filtrado obtenido fue utilizado directamente para la reacción enzimática.

La reacción enzimática se llevó a cabo utilizando un kit comercial (Boehringer Mannheim) y siguiendo las instrucciones del mismo. La incubación con la enzima galactosa deshidrogenasa se realizó a temperatura ambiente (20-25°C) hasta completar la reacción (mínimo 30 minutos), en un volumen final de 3,3 mL. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro UV-visible a 340 nm, en cubetas de cuarzo con un paso de luz de 1 cm, y se calculó la diferencia de absorbancia contra agua destilada. Por cada serie de muestras analizadas se realizaron un blanco de reactivos, reemplazando el volumen del filtrado (muestra) utilizado por agua destilada.

## **9.2. Determinación del contenido de azúcares reductores totales**

El contenido de azúcares reductores totales se determinó empleando el método de Fehling, adaptado para la determinación de cantidades muy bajas de azúcares reductores, como las presentes normalmente en quesos. La metodología involucra una titulación por óxido-reducción en medio alcalino y en caliente, durante la cual el ión cúprico(II) presente en la solución de Fehling, de color azul oscuro, se reduce formando un precipitado anaranjado rojizo de óxido cuproso(I), en forma paralela a la oxidación de los grupos aldehidos de azúcares reductores tales como lactosa, glucosa y galactosa.

Para la reacción se utilizaron los reactivos de Fehling I (preparado disolviendo 7 g de sulfato de cobre(II) hidratado en 100 mL de agua destilada) y II (preparado disolviendo 35 g de tartrato de sodio y potasio y 10 g de NaOH en 100 mL de agua destilada), los cuales se mezclaron en partes iguales inmediatamente antes de la reacción. En un erlenmeyer se colocaron 0,5 mL de esta mezcla, 3,5 mL de NaOH al 50% y 25 mL de agua destilada. Por otro lado, en una bureta de 10 mL se colocó el filtrado obtenido luego de realizar una desproteinización a partir de una muestra de 5 g de queso (siguiendo el mismo protocolo utilizado para la determinación de galactosa; sección 9.1). Se comenzó el calentamiento de la mezcla en el erlenmeyer y, una vez que entró en ebullición, se adicionó 1 gota de azul de metileno y se comenzó inmediatamente con la titulación, adicionando gotas del filtrado con los azúcares reductores de la muestra, hasta alcanzar el punto de equivalencia. El mismo se detectó por la decoloración del azul de metileno, provocada por el primer exceso de azúcares reductores luego de la reducción total del ión cúprico.

Los cálculos para la cuantificación de los azúcares reductores totales se realizaron a partir de la valoración, utilizando una solución patrón de galactosa, de la misma solución de Fehling empleada para la titulación de las muestras incógnitas.

## **10. Análisis sensoriales en quesos**

Se realizaron dos tipos de análisis sensoriales. En primer lugar, un análisis sensorial descriptivo, llevado a cabo por un panel de personas entrenadas en degustación de quesos, con el objetivo de evaluar diferentes atributos tanto visuales y de aroma y sabor, como de textura. Por otro lado, en algunas de las muestras analizadas de esta manera, se realizó además una encuesta sensorial de preferencia, de manera de determinar la aceptabilidad por parte del público en general, tanto de quesos Pategrás elaborados con como sin adición de bacterias probióticas.

### **10.1. Evaluación sensorial descriptiva**

Para realizar el análisis sensorial descriptivo, las muestras de aproximadamente 10 g de queso fueron presentadas a un panel de 12 evaluadores entrenados, mediante una identificación con números aleatorios. A cada integrante del panel se le pidió que evalúe cuidadosamente diferentes atributos, indicados en una planilla, y que marque la intensidad percibida mediante una cruz en una escala en papel. La escala estaba

representada con números del 1 al 9. En la Tabla 3 se detallan los descriptores utilizados para la realización del análisis sensorial, así como las referencias correspondientes a cada extremo de la escala.

**Tabla 3.** Descriptores utilizados para el análisis sensorial descriptivo de quesos Pategrás.

<b>Descriptor</b>	<b>Referencia para el mínimo (1) en la escala en papel</b>	<b>Referencia para el máximo (9) en la escala en papel</b>
Aroma (genuino)	Suave	Intenso
Color (característico)	Neutro	Amarillo
Aspecto de la masa (presencia de ojos)	Muchos	Nada
Cohesividad (masa ligada)	Nada	Mucha
Elasticidad (recuperación de la forma cuando cesa la presión de los dedos)	Nada	Mucha
Corte (superficie irregular)	Liso	Irregular
Gusto ácido	Suave (imperceptible)	Intenso (agresivo)
Gusto a crema	Suave (imperceptible)	Intenso
Gusto residual (puede ser agradable o desagradable)	Volátil	Persistente
Aspereza	Mucha	Nada

### **10.2. Evaluación sensorial de aceptabilidad**

El análisis sensorial de aceptabilidad se llevó a cabo mediante una encuesta realizada en un grupo de 114 personas no entrenadas en degustación de quesos. La composición del plantel de personas utilizado no varió entre distintos análisis.

Las muestras de queso de aproximadamente 10 g fueron presentadas a cada persona mediante una identificación con números aleatorios. A cada evaluador se le pidió que de su opinión acerca del sabor del quesos, dentro de una lista de nueve opciones posibles, siendo las opciones extremas “me gusta muchísimo” y “me disgusta muchísimo”. Para realizar el análisis de los datos obtenidos, se asignó a cada posible respuesta un número entre 1 y 9, utilizando una escala hedónica. Las referencias utilizadas para dicha escala se muestran en la Tabla 4.

Se obtuvo también un promedio ponderado para cada muestra analizada. El mismo se calculó como la sumatoria del puntaje asignado a cada opinión por el número de personas que eligió dicha opinión, sobre el total de personas encuestadas.

**Tabla 4.** Escala hedónica utilizada para la evaluación sensorial de aceptabilidad en quesos Pategrás.

<b>Resultado de la evaluación</b>	<b>Puntaje asignado</b>
Me gusta muchísimo	9
Me gusta mucho	8
Me gusta moderadamente	7
Me gusta poco	6
Me resulta indiferente	5
Me disgusta poco	4
Me disgusta moderadamente	3
Me disgusta mucho	2
Me disgusta muchísimo	1

### **11. Análisis estadísticos**

Los datos correspondientes a recuentos microbiológicos, humedad, materia grasa, proteína total, pH, cloruro de sodio, AGL totales, contenido de colesterol y los resultados de los análisis sensoriales se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus v 3.0 (Statistical Graphics Corp.). Cuando existieron diferencias significativas entre las medias, se aplicó el test de la mínima diferencia significativa (LSD) (Pérez López, 2001).

Los perfiles de AGL son más complejos de analizar por el gran número de variables que entran en juego, por lo que es conveniente aplicar herramientas estadísticas que permitan reducir la multidimensionalidad del sistema y trabajar con menos variables para comparar diferentes muestras (Pripp y col., 2000). Para tal fin se

utilizaron técnicas de análisis multivariante. Los perfiles de AGL se analizaron aplicando un “análisis por componentes principales” (ACP). El ACP se aplicó tomando como variables originales las concentraciones de los nueve AGL determinados en forma independiente en cada muestra, y se obtuvieron nueve nuevas variables, ortogonales entre sí, denominadas componentes principales (CP), que son combinaciones lineales de las variables originales, de la forma:

$$CP_i = a_{i1} x_1 + a_{i2} x_2 + \dots + a_{ip} x_p,$$

donde  $CP_i$  representa cada componente principal y los coeficientes  $a_{ij}$  se denominan *loading* o carga factorial y expresan la contribución de cada variable original ( $x_1, x_2, \dots, x_p$ ) al componente principal. La suma algebraica de cada componente principal para una muestra, es llamada el *score* o puntaje de la muestra para ese componente principal. Una característica de las nuevas funciones CP es que, usualmente, sólo 2 ó 3 de ellas explican casi toda la variancia total del sistema, logrando reducir la multidimensionalidad sin perder información significativa, y simplifican notablemente el análisis de los resultados. Luego de aplicar el ACP, otra herramienta estadística denominada “análisis de cluster” (AC) permitió formar grupos diferentes, siendo los elementos pertenecientes a un grupo similares entre sí y diferentes a los pertenecientes a otro grupo. Ambos procedimientos estadísticos ACP y AC fueron llevados a cabo utilizando el programa estadístico SPSS v. 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

## **4. Resultados**

## 1. Características fisicoquímicas de los quesos

Todas las elaboraciones de quesos se llevaron a cabo de acuerdo al plan experimental detallado en la sección Materiales y Métodos. Se realizaron determinaciones de materia grasa, proteína, extracto seco y cloruro de sodio, y las medias de cada parámetro se contrastaron entre quesos testigo y experimentales dentro de cada ensayo. Esto permitió asegurar que, de encontrarse luego diferencias en los perfiles de lipólisis y características organolépticas, las mismas se deban exclusivamente a la presencia y actividad enzimática de las bacterias probióticas adicionadas como fermento adjunto, y no a diferencias en la composición, inherentes al proceso de manufactura de los quesos, que podrían alterar la actividad de enzimas presentes en el queso provenientes de diversas fuentes (enzimas nativas de la leche, coagulante, fermento primario, flora adventicia). Asimismo, se determinó el pH a lo largo de la maduración para todos los quesos testigo y experimentales, con el objetivo de detectar una posible actividad acidificante en los quesos con bacterias probióticas, tanto durante la elaboración como a lo largo de la maduración.

Los valores medios de cada parámetro se compararon mediante ANOVA de una vía, y las diferencias encontradas se consideraron significativas teniendo en cuenta un valor  $P < 0,05$ . Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla 5.

No se encontraron diferencias significativas en lo referente a materia grasa, extracto seco, proteínas totales y cloruro de sodio entre los distintos tipos de quesos, para cada uno de los 8 ensayos. Los valores medios del total de quesos fueron 28,9% de materia grasa, 55,4% de extracto seco, 21,7% de proteínas totales y 3,26% de cloruro de sodio en la humedad. Los mayores rangos detectados dentro de un mismo ensayo para el contenido de materia grasa, extracto seco, contenido total de proteínas y concentración de cloruro de sodio en la fase acuosa del queso, fueron 1,8% (ensayo 1), 1,16% (ensayo 5), 0,91% (ensayo 4) y 0,63% (ensayo 3) respectivamente, no existiendo en ningún caso, como ya dijimos, diferencias significativas desde el punto de vista estadístico.



Tabla 5. Composición de los quesos testigo (T), experimental 1 (E1) y experimental 2 (E2) en los 8 ensayos.

Ensayo Cepa	Tipo de queso	pH 3 días	pH 30 días	pH 60 días	Materia grasa (%p/p)	Extracto seco (% p/p)	Proteínas totales (% p/p)	NaCl en la humedad (% p/p)
1 <i>L. acidophilus</i> A	T	5,25 <sup>a</sup> ± 0,05	5,15 ± 0,14	5,15 ± 0,14	28,7 ± 2,2	55,7 ± 1,4	22,01 ± 1,14	3,34 ± 0,46
	E1	5,08 <sup>a,b</sup> ± 0,08	4,98 ± 0,18	5,00 ± 0,14	29,0 ± 3,0	55,0 ± 2,4	22,25 ± 0,49	3,85 ± 0,13
	E2	4,92 <sup>b</sup> ± 0,16	4,85 ± 0,01	4,90 ± 0,07	29,5 ± 2,2	55,2 ± 0,8	21,71 ± 0,61	3,61 ± 0,19
2 <i>L. paracasei</i>	T	5,20 ± 0,07	4,98 ± 0,04	5,15 ± 0,07	27,0 ± 1,4	54,6 ± 1,1	21,63 ± 1,89	3,69 ± 0,17
	E1	5,15 ± 0,18	4,98 ± 0,06	5,17 ± 0,08	28,0 ± 1,1	54,6 ± 0,4	21,50 ± 1,08	3,42 ± 0,53
	E2	5,05 ± 0,10	4,98 ± 0,06	5,07 ± 0,03	28,5 ± 1,3	55,2 ± 1,4	21,47 ± 0,50	3,16 ± 0,28
3 <i>L. acidophilus</i> B	T	5,35 ± 0,01	5,41 ± 0,01	5,59 <sup>a</sup> ± 0,19	29,0 ± 0,1	54,6 ± 2,1	21,62 ± 0,86	3,64 ± 0,16
	E1	5,30 ± 0,01	5,08 ± 0,32	5,23 <sup>b</sup> ± 0,04	28,3 ± 0,4	54,2 ± 0,2	21,37 ± 0,29	3,76 ± 0,22
	E2	5,17 ± 0,21	5,03 ± 0,20	5,22 <sup>b</sup> ± 0,05	27,3 ± 1,0	54,3 ± 0,9	21,48 ± 0,13	3,13 ± 0,30
4 <i>B. lactis</i>	T	5,33 ± 0,06	5,58 ± 0,13	5,43 ± 0,37	28,7 ± 1,2	55,3 ± 1,9	22,31 ± 1,05	3,36 ± 0,07
	E1	5,42 ± 0,12	5,67 ± 0,11	5,37 ± 0,33	28,8 ± 0,3	56,0 ± 0,7	22,57 ± 1,07	3,53 ± 0,15
	E2	5,42 ± 0,08	5,47 ± 0,10	5,38 ± 0,15	28,3 ± 2,5	55,3 ± 2,3	21,66 ± 0,29	3,65 ± 0,13
5 <i>L. acidophilus</i> C	T	5,27 ± 0,24	5,33 ± 0,19	5,09 ± 0,15	30,0 ± 1,0	55,8 ± 1,5	21,31 ± 0,80	3,28 ± 0,21
	E1	5,33 ± 0,24	5,14 ± 0,21	5,02 ± 0,05	30,3 ± 0,6	56,8 ± 0,4	22,17 ± 0,62	2,73 ± 0,24
	E2	5,28 ± 0,31	5,03 ± 0,03	4,99 ± 0,04	30,3 ± 0,6	57,0 ± 0,8	21,58 ± 0,32	3,18 ± 0,29

Ensayo	Tipo de queso	pH 3 días	pH 30 días	pH 60 días	Materia grasa (%p/p)	Extracto seco (% p/p)	Proteínas totales (%p/p)	NaCl en la humedad (% p/p)
<b>6</b> <i>L. casei</i>	<b>T</b>	5,37 ± 0,08	5,14 ± 0,13	5,08 ± 0,07	29,5 ± 1,3	56,0 ± 0,7	21,77 ± 0,35	3,15 ± 0,57
	<b>E1</b>	5,31 ± 0,02	4,93 ± 0,05	5,09 ± 0,11	28,3 ± 0,6	55,2 ± 1,1	21,95 ± 0,10	3,03 ± 0,32
	<b>E2</b>	5,24 ± 0,23	4,90 ± 0,11	5,05 ± 0,02	28,5 ± 1,3	55,2 ± 0,5	21,08 ± 0,23	2,75 ± 0,13
<b>7</b> <i>L. rhamnosus</i>	<b>T</b>	5,19 ± 0,07	5,28 ± 0,05	5,03 ± 0,04	29,0 ± 0,1	55,4 ± 0,1	21,25 ± 0,42	3,05 ± 0,78
	<b>E1</b>	5,16 ± 0,01	4,95 ± 0,04	4,93 ± 0,03	28,8 ± 0,4	55,8 ± 0,4	22,05 ± 0,61	3,05 ± 0,38
	<b>E2</b>	5,05 ± 0,01	4,95 ± 0,14	4,94 ± 0,04	29,8 ± 0,4	56,1 ± 0,3	21,18 ± 0,10	2,79 ± 0,01
<b>8</b> Tres cepas	<b>T</b>	5,20 <sup>a</sup> ± 0,03	4,99 ± 0,20	4,86 ± 0,04	29,0 ± 2,3	55,0 ± 1,8	21,84 ± 0,66	3,03 ± 0,19
	<b>E1</b>	5,09 <sup>a</sup> ± 0,12	4,79 ± 0,11	4,85 ± 0,10	29,2 ± 0,8	56,2 ± 0,3	22,04 ± 0,68	3,22 ± 0,44
	<b>E2</b>	4,84 <sup>b</sup> ± 0,14	4,81 ± 0,10	4,85 ± 0,05	28,8 ± 1,6	55,2 ± 1,6	21,67 ± 0,38	2,86 ± 0,21

Se informan los valores medios ± desviación estándar de tres quesos (réplicas). Los análisis se realizaron por duplicado.

Diferentes superíndices para un parámetro determinado entre quesos de un mismo ensayo, indica la presencia de diferencias significativas ( $\alpha < 0,05$ ).

Por otro lado, sí se encontraron diferencias significativas en el valor de pH en algunos ensayos. En todos los ensayos puede observarse, en general, un menor pH en todos los quesos experimentales, especialmente los quesos E2, con respecto a los quesos testigo. Estas diferencias, no obstante, sólo fueron estadísticamente significativas en tres ensayos, y sólo a un tiempo de maduración para cada uno. En primer lugar, *Lactobacillus acidophilus* A (ensayo 1) produjo un descenso en el pH de los quesos E2 con respecto a los quesos T, a los 3 días de maduración. Asimismo, los quesos E2 elaborados con el fermento probiótico mixto presentaron a los 3 días un pH significativamente menor que los quesos E1 y T. Estas diferencias, sin embargo, no se observaron en ninguno de dichos ensayos ni a los 30 ni a los 60 días de maduración. Por otro lado, en el ensayo 3, donde se empleó *Lactobacillus acidophilus* B como fermento probiótico, el pH resultó menor en los quesos E1 y E2 con respecto al queso T, pero esto fue evidente recién al final de la maduración (60 días), no existiendo dichas diferencias hasta los 30 días.

Con respecto al cambio de pH a lo largo del período de maduración de los quesos, la evolución fue variable. Como regla general, hubo un descenso en la mayoría de los quesos, tanto testigo como experimentales, de modo que los quesos maduros (60 días) presentaron valores menores que a los 3 días.

Una excepción estuvo constituida por los quesos testigo correspondientes al ensayo 3, donde se empleó la cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* B. En este caso, se observó un aumento sostenido del pH durante la maduración. En este punto, es necesario destacar que esta cepa probiótica había demostrado una actividad acidificante bastante elevada, en experiencias preliminares realizadas en el SLG. Por tal motivo, y para evitar una sobreacidificación en los quesos experimentales, para todos los quesos del ensayo 3 se utilizó la mitad de la dosis de fermento primario empleada en el resto de los ensayos.

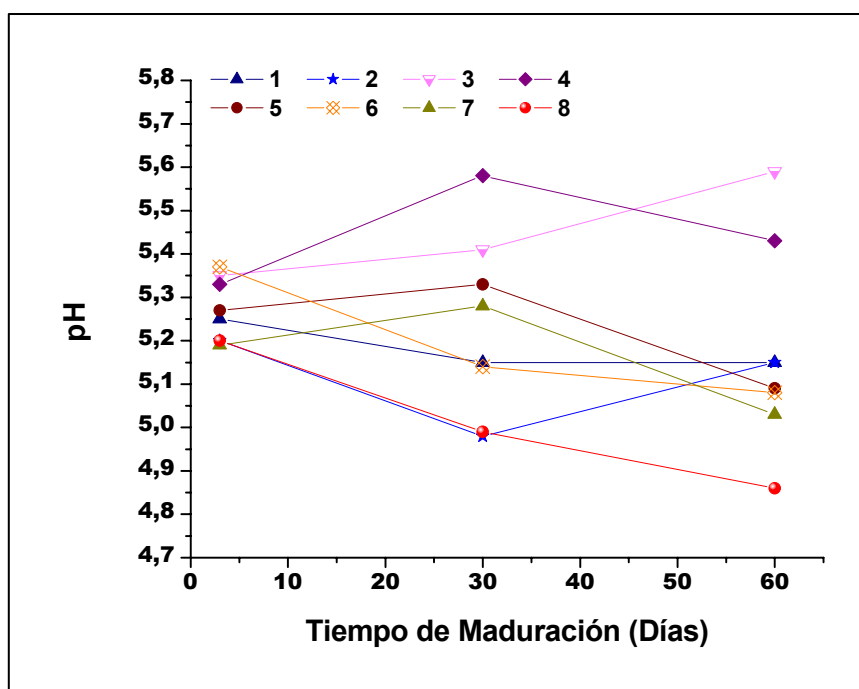
La evolución del pH a lo largo de la maduración se analizó, además, mediante una comparación de los quesos del mismo tipo entre los diferentes ensayos, mostrándose los resultados correspondientes a los quesos T, E1 y E2, en las Figuras 2, 3 y 4, respectivamente. Del análisis de dichas figuras podemos notar, a grandes rasgos, que los quesos experimentales (Figuras 3 y 4) tuvieron menores variaciones entre los diferentes ensayos, con rangos de valores mas estrechos que los correspondientes a quesos T (Figura 2).

Los quesos T mostraron comportamientos muy variables en los cambios de pH a lo largo de la maduración, entre ensayos diferentes (Figura 2). De este modo, no pudieron establecerse patrones evolutivos durante la maduración.

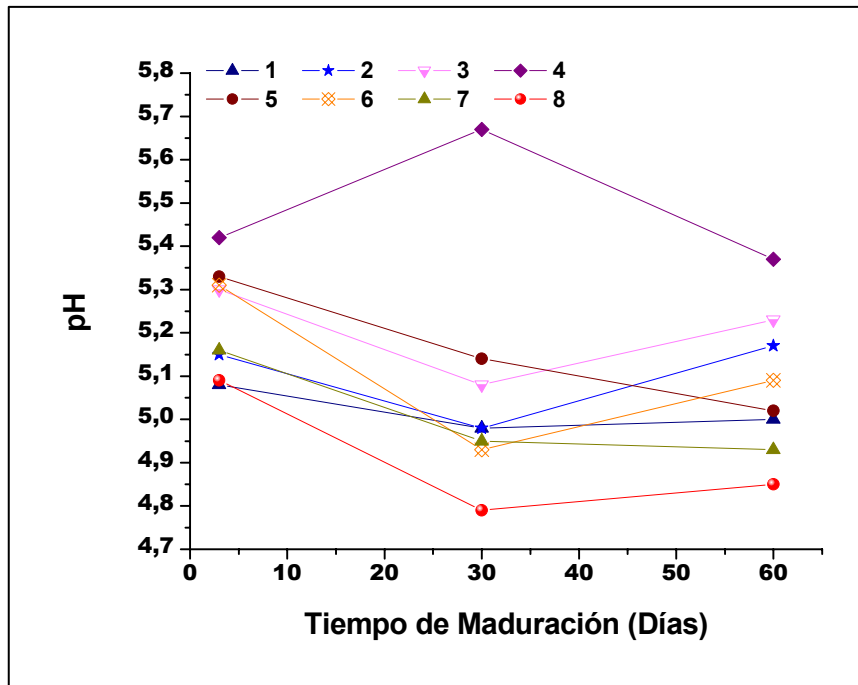
En ambos tipos de quesos experimentales, en cambio, la tendencia fue descendente durante la maduración (Figuras 3 y 4), con una disminución más marcada durante los primeros 30 días.

El ensayo 4, donde se utilizó *Bifidobacterium lactis*, constituyó una excepción. En dicho ensayo, se encontraron los únicos quesos probióticos que sufrieron un aumento de pH entre los 3 y 30 días (en ambos tipos de quesos experimentales). Sin embargo, a los 60 días tuvieron una disminución, de manera tal que alcanzaron valores finales inferiores al pH a los 3 días (Figura 3 y 4).

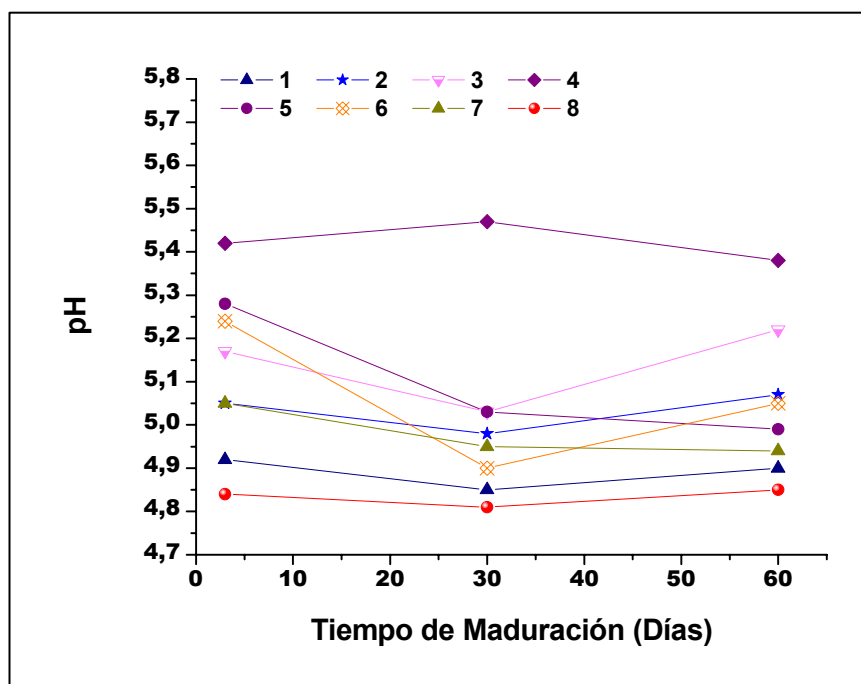
**Figura 2.** Evolución del pH en los quesos T de todos los ensayos: promedios de tres quesos (réplicas). El número indica el ensayo. Cepas en cada ensayo: 1-*L. acidophilus* A, 2- *L. paracasei*, 3- *L. acidophilus* B, 4- *B. lactis*, 5- *L. acidophilus* C, 6- *L. casei*, 7- *L. rhamnosus*, 8- Tres cepas.



**Figura 3.** Evolución del pH en los quesos tipo E1 de todos los ensayos: promedios de tres quesos (réplicas). El número indica el ensayo. Cepas en cada ensayo: 1-*L. acidophilus* A, 2- *L. paracasei*, 3- *L. acidophilus* B, 4- *B. lactis*, 5- *L. acidophilus* C, 6- *L. casei*, 7- *L. rhamnosus*, 8- Tres cepas.



**Figura 4.** Evolución del pH en los quesos tipo E2 de todos los ensayos: promedios de tres quesos (réplicas). El número indica el ensayo. Cepas en cada ensayo: 1-*L. acidophilus* A, 2- *L. paracasei*, 3- *L. acidophilus* B, 4- *B. lactis*, 5- *L. acidophilus* C, 6- *L. casei*, 7- *L. rhamnosus*, 8- Tres cepas.



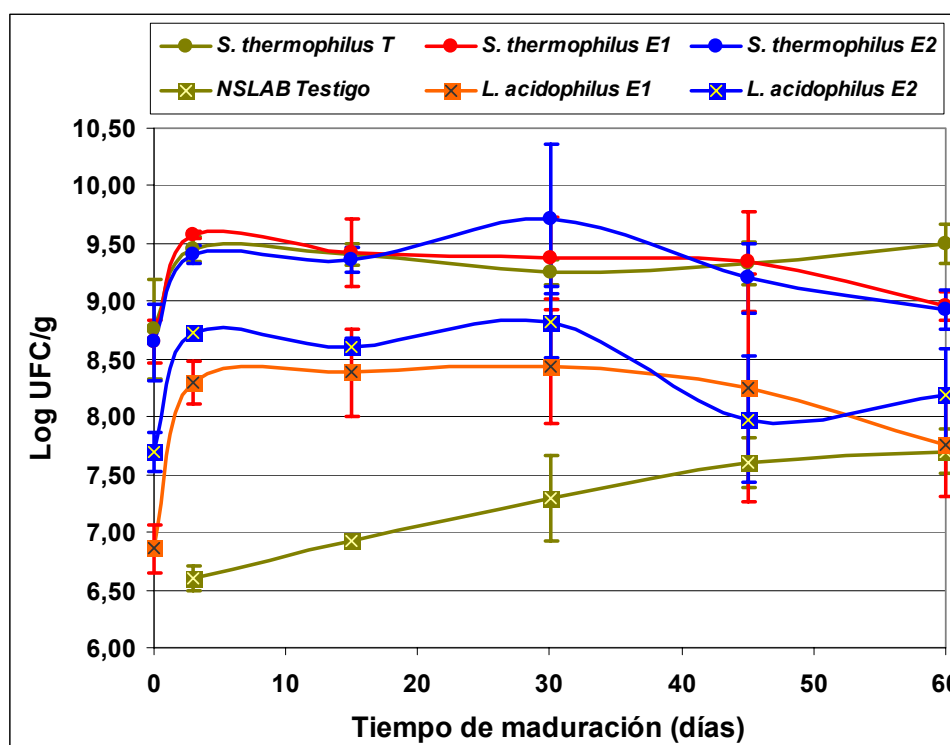
## 2. Análisis microbiológicos

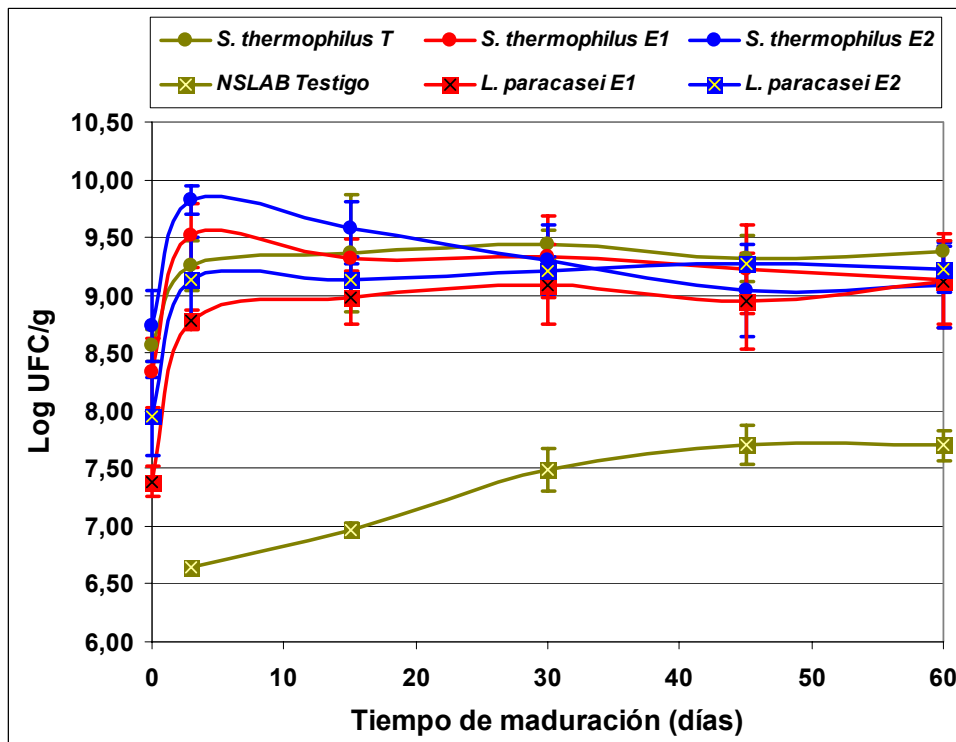
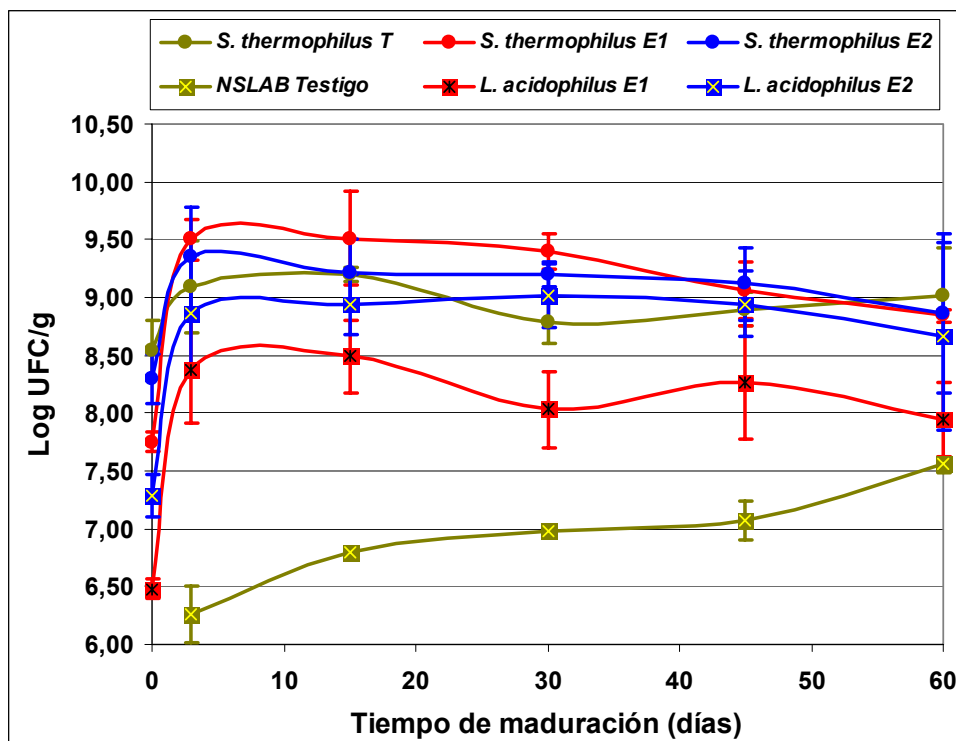
Se realizaron recuentos microbianos de bacterias probióticas en el suero obtenido de las elaboraciones, encontrándose dichas bacterias en concentraciones de alrededor de  $10^5$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ . Dado que las mismas se habían adicionado en una cantidad suficiente para alcanzar  $10^6$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  en la leche de elaboración, resultó una pérdida de aproximadamente el 10%, lo cual asegura una buena retención de células probióticas en el coágulo durante el proceso de manufactura, al menos cuando se utiliza la tecnología de elaboración de quesos semiduros correspondiente al queso Pategrás Argentino.

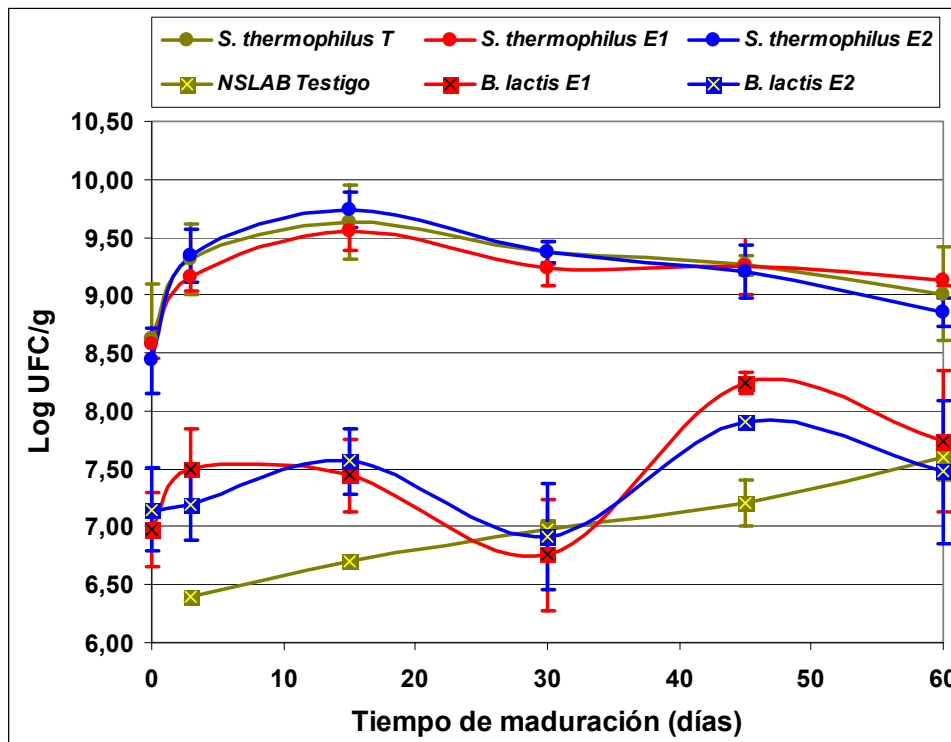
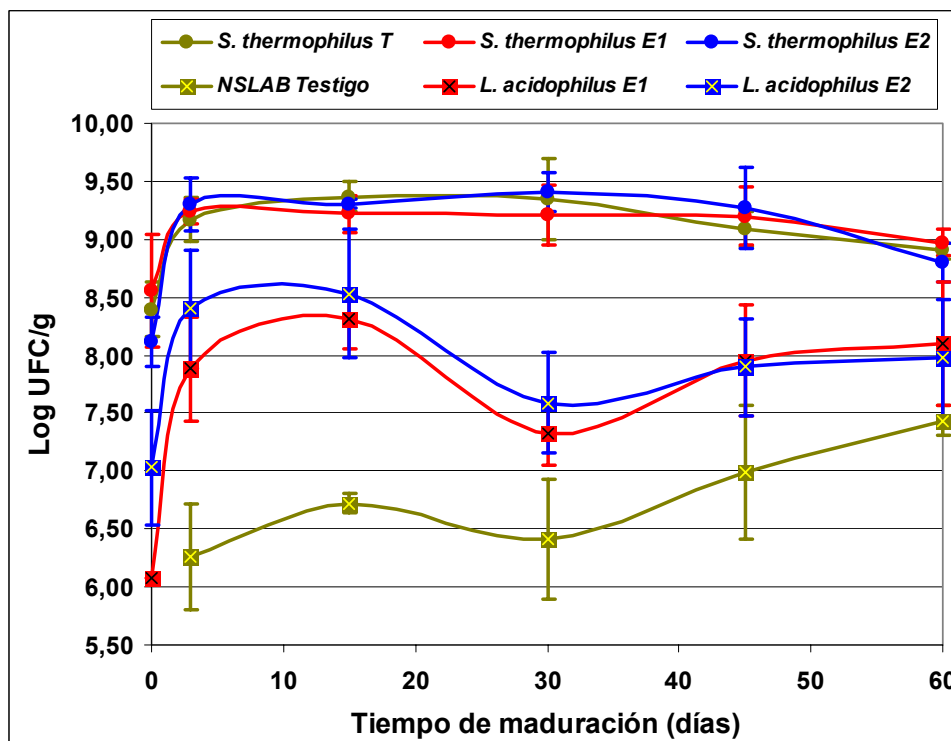
La Figura 5 presenta, para cada ensayo en forma individual, la evolución de las poblaciones del fermento primario y probiótico, además de la flora NSLAB, a lo largo de la maduración de los quesos.

**Figura 5.** Recuentos microbiológicos de los fermentos primario (quesos testigo y experimentales) y probióticos (quesos experimentales) a lo largo de la maduración de los quesos correspondientes a los 8 ensayos. T: queso testigo; E1: queso experimental 1; E2: queso experimental 2. Se presentan los valores medios de tres quesos (réplicas).

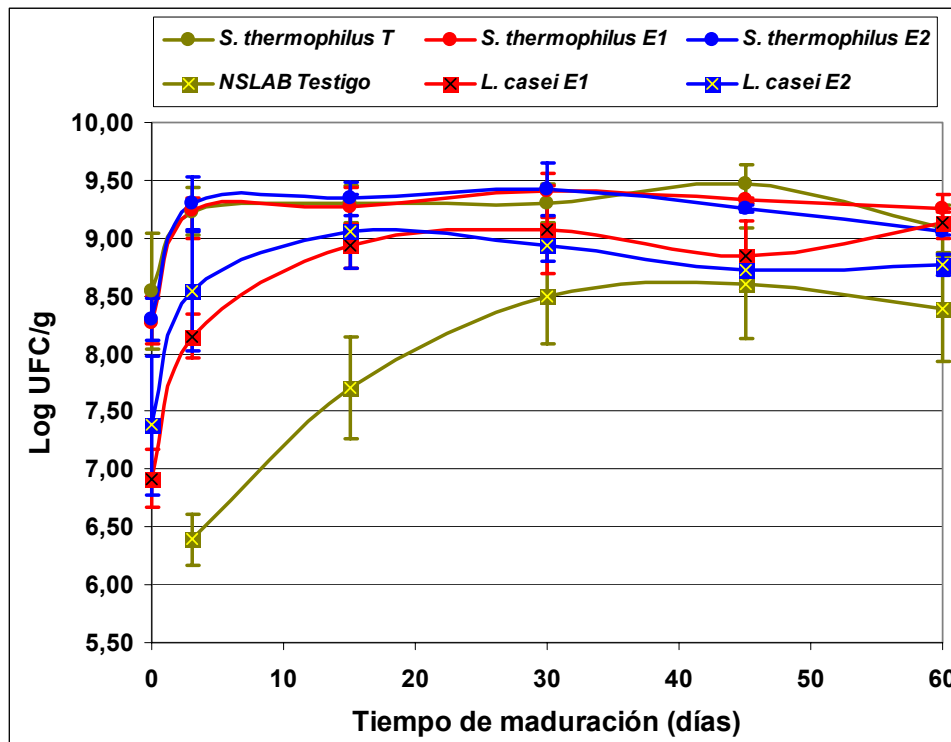
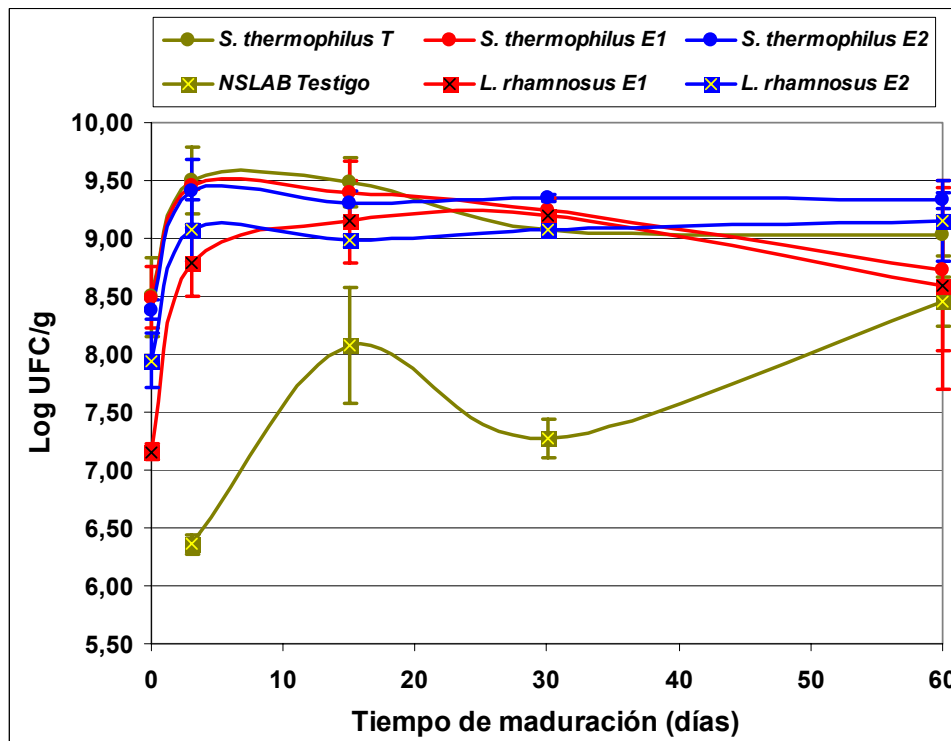
### a) Ensayo 1: *Lactobacillus acidophilus* A.



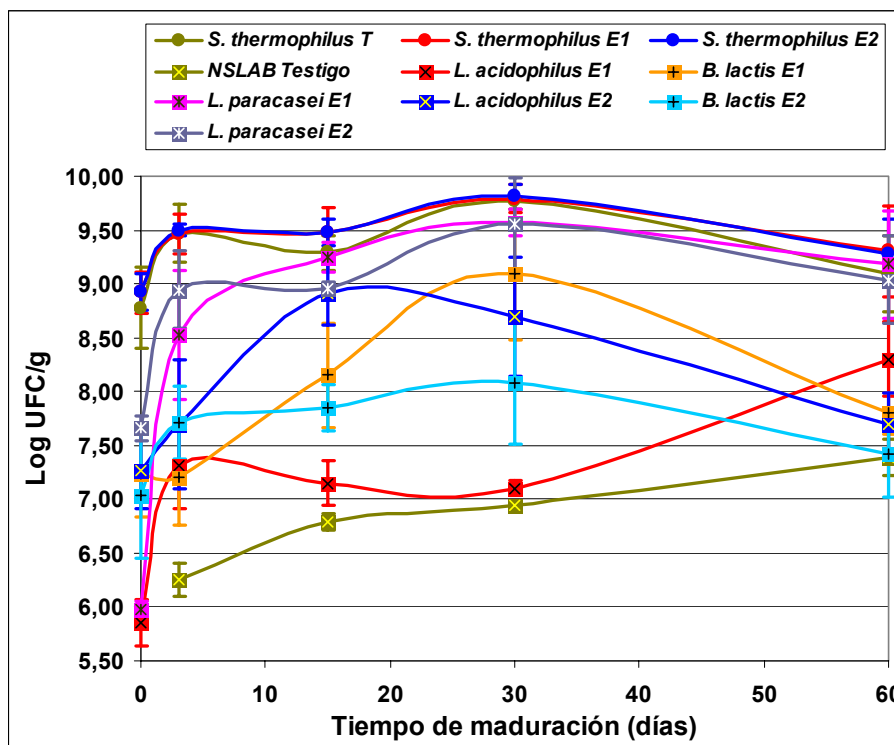
b) Ensayo 2: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.c) Ensayo 3: *Lactobacillus acidophilus* B.

d) Ensayo 4: *Bifidobacterium lactis*e) Ensayo 5: *Lactobacillus acidophilus C.*



f) Ensayo 6: *Lactobacillus casei*.g) Ensayo 7: *Lactobacillus rhamnosus*.

**h) Ensayo 8:** Fermento probiótico mixto, compuesto por *Lactobacillus acidophilus* C, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis*.



Con respecto al fermento primario de *Streptococcus thermophilus* puede observarse que, entre el proceso de elaboración y los primeros 3 días de maduración, existió un incremento tanto en quesos testigo como en ambos tipos de quesos experimentales, para todos los ensayos realizados. Si realizamos una comparación entre quesos testigo y experimentales dentro de cada ensayo, se nota que, a excepción de los quesos E1 de los ensayos 4, 5 y 8 (Figuras 5d, 5e y 5h), dicho incremento inicial fue siempre menor en los quesos testigo. A partir de los 3 días se observan leves incrementos en la población del fermento primario en todos los ensayos, en todos los tipos de quesos, alcanzando niveles máximos superiores a  $10^9$  UFC  $g^{-1}$  a los 15 ó 30 días, para luego mantenerse constantes o sufrir una leve disminución hacia el final. De cualquier manera, dichos descensos fueron prácticamente imperceptibles, dado que los niveles de *Streptococcus thermophilus* no fueron nunca menores a  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  en ningún queso de 60 días de maduración.

La comparación entre diferentes tipos de queso demostró la no existencia de diferencias significativas en las concentraciones de *Streptococcus thermophilus* entre quesos T, E1 y E2, para el conjunto de los ensayos (Figura 5). En los ensayos 1, 3 y 7

(Figuras 5a, 5c y 5g) se encontraron diferencias entre quesos testigo y experimentales, pero las mismas sólo fueron puntuales, no presentando una diferencia sostenida durante todo el período de maduración.

Lo más destacable a partir de la observación de los recuentos de las bacterias probióticas, es que las mismas se mantuvieron siempre en niveles no ya iguales, sino superiores a los recomendados para un alimento probiótico; en efecto, desde los 3 días y hasta el final (60 días) del período de maduración estudiado, las concentraciones fueron en todos los casos por encima de  $10^7$  UFC g<sup>-1</sup> (Figura 5).

Respecto de la evolución a lo largo de la maduración, las cepas probióticas mostraron aumentos importantes al comienzo de este período. En todas las experiencias donde se utilizó un lactobacilo probiótico, dicha cepa tuvo incrementos de al menos un orden logarítmico durante los 3 primeros días de maduración. En el ensayo 4 donde se utilizó *Bifidobacterium lactis*, en cambio, si bien también hubo en esta etapa un crecimiento, éste fue menos marcado; sólo de alrededor de 0,5 órdenes logarítmicos cuando la adición se realizó a partir del cultivo liofilizado (quesos E1), y prácticamente imperceptible cuando se realizó el agregado luego de la incubación en el SLG (quesos E2) (Figura 5d). Otro punto remarcable del incremento de las cepas probióticas durante los primeros días de maduración, es que fue mayor para los quesos E1, en todos los quesos experimentales de los 8 ensayos, salvo para *Bifidobacterium lactis* cuando se adicionó en el fermento probiótico mixto (ensayo 8) (Figura 5h).

Un hecho importante es la aparente influencia que posee el agregado de las cepas probióticas combinadas entre sí (en nuestro estudio, la combinación de 3 cepas, ensayo 8) sobre el crecimiento inicial durante la maduración de los quesos, en relación a aquéllos donde esas mismas 3 cepas fueron adicionadas como fermento adjunto en forma individual. Así, observamos que *Lactobacillus paracasei* aumentó su población en ambos quesos experimentales E1 y E2, entre 0 y 3 días, de manera mucho más marcada cuando su agregado fue concomitante al de cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* (ensayo 8, Figura 5h) que utilizado de manera individual (ensayo 2, Figura 5b). Por el contrario, el incremento de *Lactobacillus acidophilus* C fue más marcado cuando se utilizó en forma individual, especialmente en los quesos E2 (Figuras 5e y 5h). Finalmente, no hubo crecimiento de *Bifidobacterium lactis* en los quesos E1 del ensayo 8 a los 3 días (Figura 5h), pero se verificó un aumento notorio en los quesos E2 de dicho ensayo, en forma inversa a lo que sucedió cuando se empleó de manera individual (Figura 5d).

Los diferentes grupos de bacterias probióticas ensayados (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus* del grupo *casei* y bifidobacterias) mostraron patrones de viabilidad característicos de cada uno, cuando las cepas fueron empleadas de manera individual.

La mayor viabilidad alcanzada una vez culminado el período de maduración estudiado en el presente trabajo, correspondió al grupo de *Lactobacillus casei*, es decir *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* (ensayos 2, 6 y 7 respectivamente). *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus* llegaron a niveles cercanos a  $10^9$  UFC  $g^{-1}$  a los 3 días (Figuras 5b y 5g), en ambos quesos experimentales, y mantuvieron esta concentración prácticamente constante hasta los 60 días, salvo una ligera disminución de 0,5 órdenes logarítmicos en el queso E1 con *Lactobacillus rhamnosus*. *Lactobacillus casei* se comportó de manera similar y llegó a los mismos niveles al final de la maduración, sólo que la concentración máxima se alcanzó recién a los 30 días de maduración (Figura 5f). *Lactobacillus paracasei* fue utilizado también en el ensayo 8 combinado con una cepa de cada uno de los otros grupos (Figura 5h), y mostró un comportamiento muy parecido al correspondiente al ensayo individual (Figura 5b).

La concentración de las cepas de *Lactobacillus acidophilus* se mantuvo, luego del incremento inicial hasta los 3 días, prácticamente constante o con algunas disminuciones leves entre los 3 y los 60 días (Figuras 5a, 5c y 5e). Si bien la concentración final fue alta en los tres ensayos, de alrededor de  $10^8$  UFC  $g^{-1}$ , estuvo aproximadamente en un orden logarítmico menos que para los ensayos con bacterias del grupo de *Lactobacillus casei*. Cuando fue empleado en el fermento mixto (ensayo 8), *Lactobacillus acidophilus* C tuvo un aumento de más de un orden logarítmico en quesos E1 entre 30 y 60 días, mientras que en quesos E2 se verificó un aumento inicial de la viabilidad, hasta los 15 días, sufriendo luego una disminución (Figura 5h).

*Bifidobacterium lactis* presentó, cuando fue ensayada individualmente, un crecimiento mucho menor que los grupos de lactobacilos hasta los 30 días, tanto para quesos E1 como para quesos E2. A partir de allí, aunque sufrieron un incremento en la concentración hasta el final de la maduración, estuvieron un poco por debajo de  $10^8$  UFC  $g^{-1}$ , si bien aún bastante por encima de la concentración mínima esperada para un alimento probiótico (Figura 5d). En el fermento probiótico mixto, por otro lado, existió un aumento sostenido en la viabilidad hasta los 30 días (Figura 5h). Sin embargo, a diferencia de cuando fue ensayada en forma individual, esta cepa mostró una

disminución entre los 30 y los 60 días, llegando en este último punto (Figura 5h) a niveles comparables a los obtenidos en el ensayo individual (Figura 5d).

Por otro lado, se realizó una comparación mediante ANOVA de una vía con el objetivo de determinar diferencias significativas en la población probiótica, a lo largo de la maduración, con respecto a la metodología de adición de tales bacterias a los quesos (E1 vs. E2). Los niveles de supervivencia fueron parecidos entre ambos tipos, estando las escasas diferencias encontradas siempre presentes en la primera etapa de la maduración. El único ensayo donde la diferencia en la viabilidad del fermento probiótico se mantuvo durante los 60 días de maduración se dio en el ensayo 3, en el cual se utilizó *Lactobacillus acidophilus* B, estando las diferencias a favor de los quesos experimentales donde se realizó una incubación del fermento probiótico en el SLG (E2).

De las demás diferencias encontradas, las mismas también favorecieron a los quesos E2, pero sólo durante los primeros días de maduración. De esta manera, podemos mencionar que durante la elaboración (día 0) se encontraron niveles significativamente mayores de *Lactobacillus rhamnosus* en los quesos E2 con respecto a los quesos E1 (Figura 5g). Lo mismo sucedió en el ensayo 1 con *Lactobacillus acidophilus* A (Figura 5a) y en el ensayo 8 con las cepas de *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus acidophilus* C (Figura 5h). A los 3 días de maduración, por otro lado, de las tres diferencias mencionadas sólo se mantuvo aquella correspondiente a *Lactobacillus acidophilus* A en el ensayo 1 (Figura 5a), cuya población seguía siendo significativamente mayor en quesos E2. Desde los 15 días y hasta el final de la maduración, las concentraciones se igualaron entre quesos E1 y E2 para todos los ensayos, a excepción del ensayo 3 (donde como vimos las diferencias se mantuvieron siempre) y una diferencia puntual en *Lactobacillus acidophilus* C en el ensayo 8 (Figura 5h), que aún mostraba una población significativamente superior en quesos E2 a los 15 días, diferencia que sin embargo desapareció desde los 30 días en adelante.

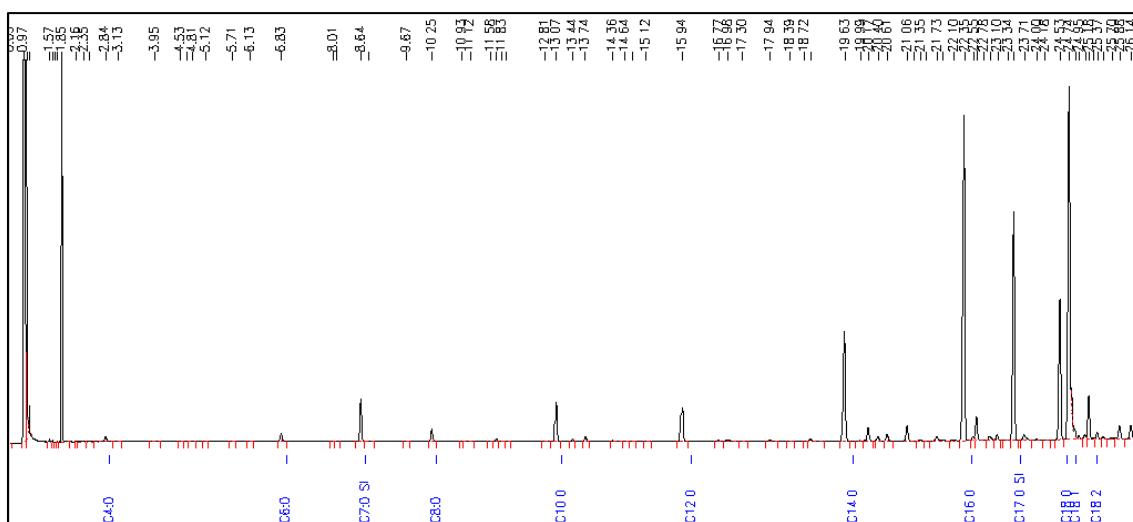
Las bacterias lácticas no pertenecientes al fermento (NSLAB) fueron cuantificadas en los quesos T de los diferentes ensayos (Figura 5), observándose un patrón constante de crecimiento a lo largo de la maduración, desde valores que rondaban las  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  a los 3 días hasta niveles entre  $10^7$  y ligeramente superiores a  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  a los 60 días. Por otro lado, en los quesos con bacterias probióticas agregadas como fermento adjunto, las colonias observadas durante los recuentos de lactobacilos no fueron distintas a las correspondientes a la cepa probiótica adicionada en

cada caso, y de este modo se supuso que las NSLAB se mantuvieron en niveles muy bajos en estos quesos.

### 3. Análisis de las transformaciones de la materia grasa

Las transformaciones de la materia grasa se cuantificaron a través de la determinación de las concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) y colesterol, en quesos Pategrás al inicio (3 días) y al final (60 días) del período de maduración estudiado. Los ácidos grasos libres totales se calcularon como la sumatoria de las concentraciones de los siguientes nueve ácidos grasos libres, cuantificados cada uno en forma individual: ácido caproico (C<sub>6:0</sub>); ácido caprílico (C<sub>8:0</sub>); ácido cáprico (C<sub>10:0</sub>); ácido láurico (C<sub>12:0</sub>); ácido mirístico (C<sub>14:0</sub>); ácido palmítico (C<sub>16:0</sub>); ácido esteárico (C<sub>18:0</sub>); ácido oleico (C<sub>18:1</sub>) y ácido linoléico (C<sub>18:2</sub>). En la Figura 6 se muestra como ejemplo un cromatograma, con los picos correspondiente a cada ácido graso cuantificado.

**Figura 6.** Cromatograma típico donde se observan los picos correspondientes a los nueve ácidos grasos cuantificados, los ácidos enántico y margárico (estándares internos) y el ácido butírico (no cuantificado). En la parte superior de la figura se observan los tiempos de retención cromatográfica.



C<sub>4:0</sub>: ácido butírico; C<sub>6:0</sub>: ácido caproico; C<sub>7:0</sub>: ácido enántico; C<sub>8:0</sub>: ácido caprílico; C<sub>10:0</sub>: ácido cáprico; C<sub>12:0</sub>: ácido láurico; C<sub>14:0</sub>: ácido mirístico; C<sub>16:0</sub>: ácido palmítico; C<sub>17:0</sub>: ácido margárico; C<sub>18:0</sub>: ácido esteárico; C<sub>18:1</sub>: ácido oleico; C<sub>18:2</sub>: ácido linoléico.

### **3.1. Lipólisis: ácidos grasos libres totales**

Con el objetivo de evaluar el impacto del factor “cepa probiótica utilizada” sobre los niveles de lipólisis del queso Pategrás Argentino, así como del factor “tiempo de maduración”, se determinó la concentración de AGL totales (promedio de las tres réplicas de elaboración) en los quesos E1 y E2 correspondientes a los 8 ensayos realizados; para los quesos T se calculó un promedio entre las 24 réplicas de los 8 ensayos. Se realizaron dos ANOVA de una vía, en forma independiente, para determinar la influencia de cada uno de los factores mencionados. Los promedios, desviaciones estándar y los resultados de los ANOVA se muestran en la Tabla 6. Asimismo, para facilitar la visualización de los resultados, se graficaron en forma independiente sólo los promedios, los cuales se pueden observar en la Figura 7.

La última columna de la Tabla 6 corresponde a los valores de AGL totales calculados para los quesos sin agregado de probióticos. En dichos quesos se observaron, durante el período de maduración, incrementos en la concentración de AGL totales en alrededor de 500 mg por Kg de queso.

Los quesos elaborados con la adición de fermentos probióticos, presentaron niveles de AGL totales similares a los quesos T al comienzo de la maduración. Efectivamente, a los 3 días no existieron diferencias significativas entre los quesos E1 y E2 de ninguno de los 8 ensayos, con respecto a los quesos T (Tabla 6). Por otro lado, analizando el cambio de concentración de AGL totales entre los 3 y los 60 días de maduración, los quesos experimentales presentaron aumentos similares a los quesos T. Dichos incrementos no resultaron, en general, significativos desde el punto de vista estadístico, si bien lo fueron para quesos T. Sin embargo, esto puede deberse a que se promediaron los 24 quesos T de los 8 ensayos, mientras que los promedios en los quesos probióticos corresponden a tres réplicas de cada ensayo. De esta manera, tanto para quesos T como E1 y E2, la lipólisis resultó muy baja, y similar en valor absoluto.

El queso E2 del ensayo 8 (elaborado con el fermento probiótico mixto) constituye una excepción; sus niveles de AGL totales a los 60 días resultaron significativamente mayores que a los 3 días, si bien no diferentes del queso E1 del mismo ensayo a 60 días.

**Tabla 6.** Ácidos grasos libres totales (mg/Kg de queso) calculados como la suma de los nueve ácidos grasos libres individuales desde C<sub>6:0</sub> hasta C<sub>18:2</sub>, para los quesos de los 8 ensayos al comienzo (3 días) y al final (60 días) del período de maduración estudiado.

	N° de ensayo								quesos T
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<b>queso E1</b> <b>(3 días)</b>	2107,1 <sup>a,1</sup> ± 114,2	2389,5 <sup>a,1</sup> ± 347,4	2470,1 <sup>a,1</sup> ± 120,0	1972,5 <sup>a,1</sup> ± 763,5	2210,0 <sup>a,1</sup> ± 169,6	2453,5 <sup>a,1</sup> ± 126,8	2006,6 <sup>a,1</sup> ± 127,8	1930,5 <sup>a,1</sup> ± 134,7	2065,3 <sup>a,1</sup> ± 399,3
<b>queso E2</b> <b>(3 días)</b>	2209,0 <sup>a,1</sup> ± 447,7	2287,7 <sup>a,1</sup> ± 385,0	2151,0 <sup>a,1</sup> ± 282,9	1801,1 <sup>a,1</sup> ± 714,6	2526,2 <sup>a,1</sup> ± 367,3	2294,0 <sup>a,1</sup> ± 1075,7	2298,3 <sup>a,1</sup> ± 621,8	2025,0 <sup>a,1</sup> ± 233,5	2065,3 <sup>a,1</sup> ± 399,3
<b>queso E1</b> <b>(60 días)</b>	2289,4 <sup>a,1,2</sup> ± 130,6	2472,1 <sup>a,1,2,3</sup> ± 376,6	2722,9 <sup>a,1,2,3</sup> ± 897,7	1874,0 <sup>a,1</sup> ± 256,9	3107,2 <sup>a,2,3</sup> ± 856,3	3230,6 <sup>a,3</sup> ± 944,8	2725,4 <sup>a,1,2,3</sup> ± 15,39	2259,4 <sup>a,b,1,2</sup> ± 128,77	2559,4 <sup>b,2</sup> ± 477,7
<b>queso E2</b> <b>(60 días)</b>	2768,2 <sup>a,1,2</sup> ± 616,8	2643,1 <sup>a,1,2</sup> ± 632,7	2186,2 <sup>a,1,2</sup> ± 219,2	2014,1 <sup>a,1</sup> ± 382,8	2913,1 <sup>a,2</sup> ± 1118,3	2432,8 <sup>a,1,2</sup> ± 126,2	2813,3 <sup>a,1,2</sup> ± 680,2	2605,6 <sup>b,1,2</sup> ± 442,9	2559,4 <sup>b,1,2</sup> ± 477,7

E1: fermentos probióticos agregados en forma liofilizada (promedios y desviaciones estándar correspondientes a 3 réplicas); E2: fermentos probióticos previamente incubados en el SLG (promedios y desviaciones estándar correspondientes a 3 réplicas).

T: quesos testigo sin probióticos (promedios y desviaciones estándar correspondientes a 24 réplicas). Debido a que los resultados correspondientes a quesos T comprenden los 8 ensayos realizados, los mismos se presentan en una única columna. Los valores correspondientes a cada tiempo de maduración se presentan repetidos a fin de ser comparados con los dos tipos de quesos experimentales, a lo largo de cada fila respectiva.

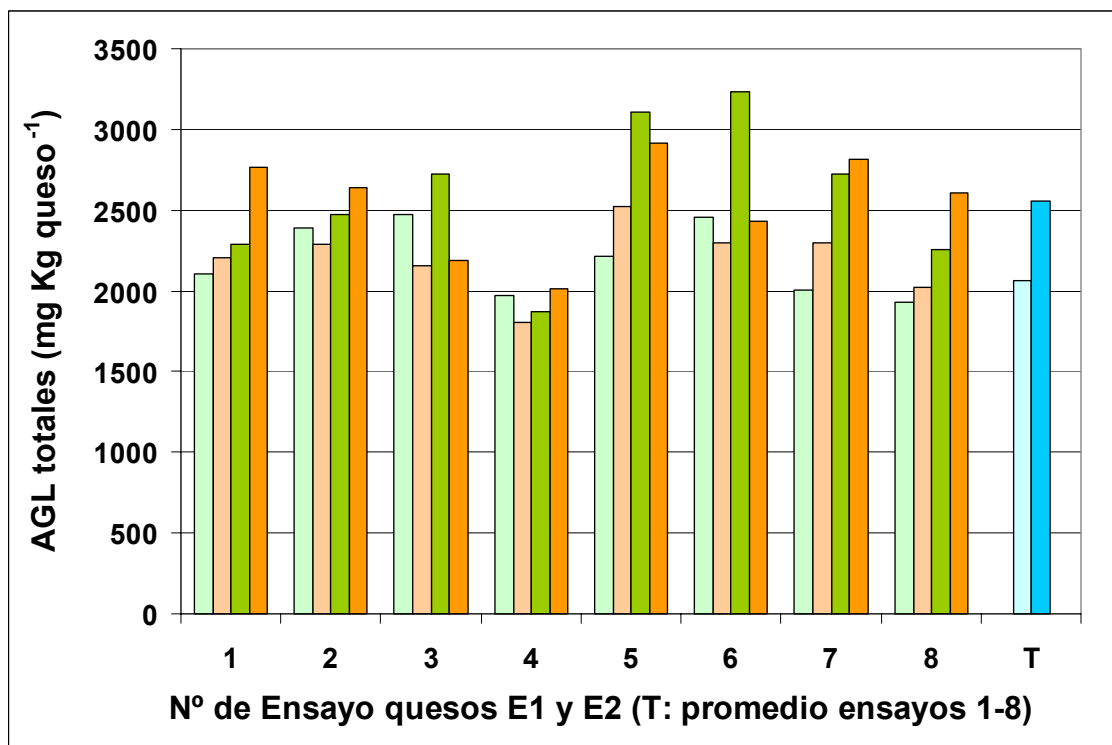
<sup>a,b</sup>superíndices diferentes dentro de la misma columna indican la presencia de diferencias significativas (P < 0,05).

<sup>1,2,3</sup>superíndices diferentes dentro de la misma fila indican la presencia de diferencias significativas (P < 0,05).

Cepas probióticas utilizadas en los diferentes ensayos: 1: *Lactobacillus acidophilus* A; 2: *Lactobacillus paracasei*; 3: *Lactobacillus acidophilus* B; 4: *Bifidobacterium lactis*; 5: *Lactobacillus acidophilus* C; 6: *Lactobacillus casei*; 7: *Lactobacillus rhamnosus* y 8: fermento probiótico mixto ensayos 2, 4 y 5.



**Figura 7.** Representación gráfica de las concentraciones de ácidos grasos libres totales (mg/Kg de queso) calculados como la suma de los nueve ácidos grasos libres individuales desde C<sub>6:0</sub> hasta C<sub>18:2</sub>, para los quesos de los 8 ensayos al comienzo (3 días) y al final (60 días) del período de maduración estudiado.



T: quesos testigo sin probióticos (promedios de 24 réplicas); ■ 03 días; ■ 60 días.

E1: fermentos probióticos agregados en forma liofilizada (promedios de 3 réplicas); ■ 03 días; ■ 60 días.

E2: fermentos probióticos previamente incubados en el SLG (promedios de 3 réplicas); ■ 03 días; ■ 60 días.

Cepas probióticas utilizadas en los diferentes ensayos: 1: *Lactobacillus acidophilus* A; 2: *Lactobacillus paracasei*; 3: *Lactobacillus acidophilus* B; 4: *Bifidobacterium lactis*; 5: *Lactobacillus acidophilus* C; 6: *Lactobacillus casei*; 7: *Lactobacillus rhamnosus* y 8: fermento probiótico mixto ensayos 2, 4 y 5.

Con respecto al queso E1 del ensayo 8 y los quesos experimentales de todos los otros ensayos, la comparación visual muestra en algunos casos valores muy superiores a los 60 días que a los 3 días. Los ejemplos más notorios corresponden a los quesos E2/Ensayo 1, E1/Ensayo 5, E1/Ensayo 6 y E1/Ensayo 7 (Figura 7). Sin embargo, el hecho de que, de acuerdo a los ANOVA realizados, ninguno de estos incrementos haya resultado significativo (Tabla 6), es el resultado de desviaciones estándar muy elevadas. Este hecho es consecuencia, a su vez, de una variabilidad mucho mayor debida a factores no controlados, entre diferentes elaboraciones de quesos del mismo tipo y

dentro del mismo ensayo (réplicas), que la variabilidad debida al agregado de bacterias probióticas y/o al efecto del tiempo de maduración.

Asimismo, el queso E1 del ensayo 6, que a los 60 días presentó valores de AGL totales significativamente mayores que los quesos T de 60 días, ya mostraba diferencias elevadas con estos quesos a los 3 días (aproximadamente 400 mg/Kg de queso, Tabla 6) si bien estas no resultaron estadísticamente significativas.

### 3.2. Lipólisis: perfiles de ácidos grasos libres individuales

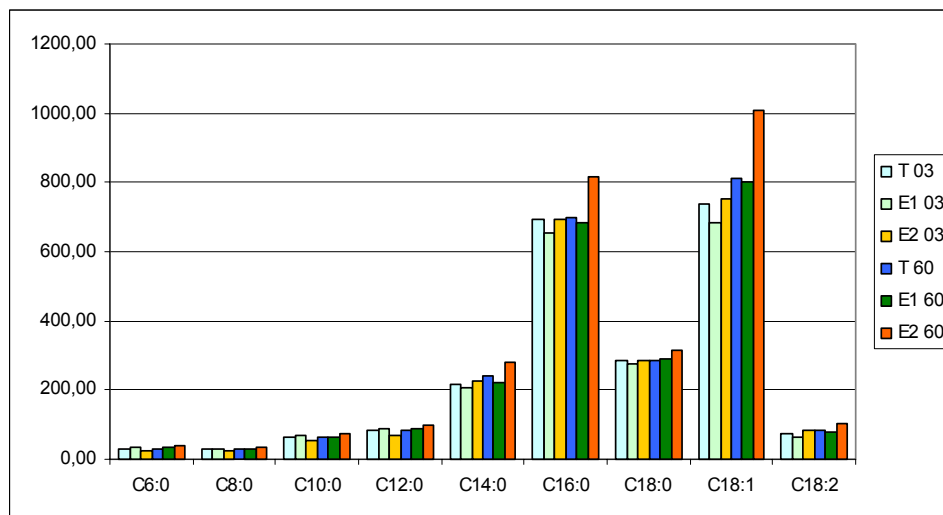
Debido a que pueden producirse variaciones significativas en el contenido de uno o más AGL individuales, sin tener un efecto notorio en la concentración total, se realizó el análisis de los perfiles de AGL, de modo de detectar la posible liberación de uno o más de ellos de manera selectiva. Para cada ensayo, se contrastaron las concentraciones de cada ácido graso libre entre quesos T, E1 y E2, tanto a 3 como a 60 días de maduración. Los valores individuales de concentración de AGL obtenidos para cada muestra, se encuentran listados al final del presente trabajo, y pueden consultarse en el Apéndice 1.

#### 3.2.1. Ensayo 1: *Lactobacillus acidophilus* A

La Figura 8 muestra los perfiles de AGL correspondientes al ensayo donde se utilizó *Lactobacillus acidophilus* A como fermento probiótico. Todos los perfiles observados se corresponden con el perfil típico de AGL en leche de vaca, tanto a 3 como a 60 días, con proporciones de ácidos grasos de cadena larga (C<sub>14:0</sub>-C<sub>18:2</sub>) entre el 89,6% y el 92,1%, de los cuales los ácidos oleico y palmítico, en conjunto, representaron entre el 63,7% y el 66% de los AGL totales.

En la Figura 8 puede observarse que, en general, no existieron diferencias apreciables en los perfiles de quesos T y E1, mientras que para los quesos E2, la mayor concentración detectada para los AGL totales podría explicarse por el aumento de los ácidos oleico y palmítico, encontrados en mayor concentración. La Tabla 7 indica, no obstante, que para ambos AGL no existieron diferencias significativas de concentración ( $P > 0,05$ ) entre quesos E2 de 3 y 60 días de maduración, si bien para los mismos se observó un aumento correspondiente al ácido mirístico, el cuarto AGL en orden decreciente de concentración. Asimismo, debemos destacar que las diferencias encontradas para los AGL totales entre quesos E2 de 3 y 60 días de maduración, si bien fueron altas en valor absoluto, no resultaron estadísticamente significativas (Tabla 6).

**Figura 8.** Concentraciones de ácidos grasos libres (mg/Kg de queso) desde C<sub>6:0</sub> hasta C<sub>18:2</sub> en los quesos correspondientes al Ensayo 1, donde se empleó la cepa probiótica comercial *Lactobacillus acidophilus* A como fermento adjunto, a los 3 y 60 días de maduración.



T: quesos testigo elaborados sin adición de bacterias probióticas.

E1: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en forma liofilizada.

E2: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en el sustrato lácteo graso.

03 y 60: días de maduración. Promedios de 3 réplicas.

**Tabla 7.** ANOVA realizado para determinar diferencias significativas en las concentraciones de cada AGL entre 3 y 60 días de maduración, para los quesos T, E1 y E2 correspondientes al Ensayo 1, donde se empleó la cepa probiótica comercial *Lactobacillus acidophilus* A como fermento probiótico adjunto.

AGL	T – Δ 3-60	E1 – Δ 3-60	E2 – Δ 3-60
ácido caproico	-	-	-
ácido caprílico	-	-	-
ácido cáprico	-	-	-
ácido láurico	-	-	-
ácido mirístico	-	-	X
ácido palmítico	-	-	-
ácido esteárico	-	-	-
ácido oleico	-	-	-
ácido linoleico	-	-	-

X denota la presencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

### 3.2.2. Ensayo 2: *Lactobacillus paracasei*

La Figura 9 muestra los perfiles de AGL correspondientes al ensayo donde se utilizó *Lactobacillus paracasei* como fermento probiótico. Todos los perfiles observados se corresponden con el perfil típico de AGL en leche de vaca, tanto a 3 como a 60 días, con proporciones de ácidos grasos de cadena larga (C<sub>14:0</sub>-C<sub>18:2</sub>) entre el 90,2% y el 92,2%, de los cuales los ácidos oleico y palmítico, en conjunto, representaron entre el 63,0% y el 66,4% de los AGL totales.

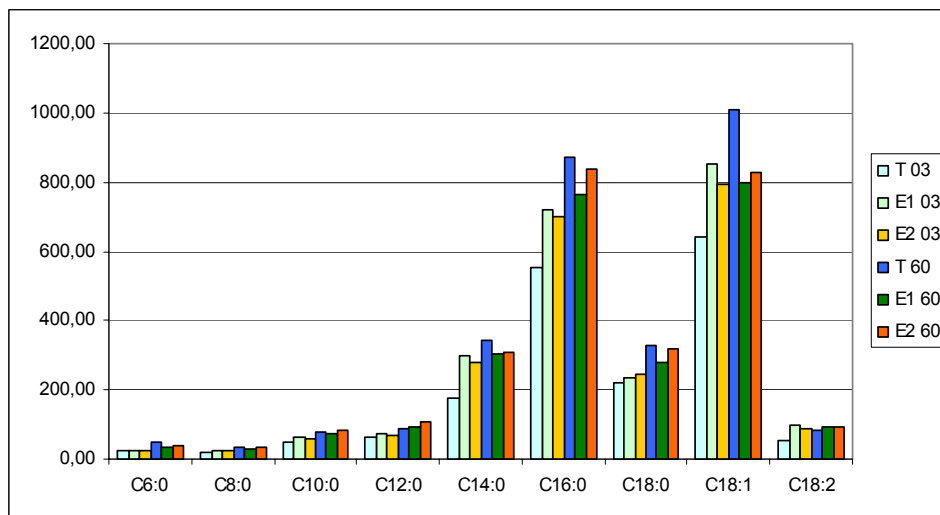
En la Figura 9 se observa, en general, aumentos en los niveles de AGL durante la maduración en quesos T. Efectivamente, de acuerdo al ANOVA realizado (Tabla 8), tales diferencias resultaron significativas para los ácidos caproico, caprílico, mirístico, palmítico y linoléico ( $P < 0,05$ ). El ácido oleico, AGL principal, no aumentó su concentración de manera significativa en quesos T. Por otro lado, no se encontraron diferencias de concentración para ningún AGL en ambos tipos de quesos experimentales, indicando una actividad lipolítica indetectable para esta cepa probiótica.

### 3.2.3. Ensayo 3: *Lactobacillus acidophilus* B

La Figura 10 muestra los perfiles de AGL correspondientes al ensayo donde se utilizó *Lactobacillus acidophilus* B como fermento probiótico. Todos los perfiles observados se corresponden con el perfil típico de AGL en leche de vaca, tanto a 3 como a 60 días, con proporciones de ácidos grasos de cadena larga (C<sub>14:0</sub>-C<sub>18:2</sub>) entre el 89,4% y el 91,5%, de los cuales los ácidos oleico y palmítico, en conjunto, representaron entre el 58,6% y el 64,6% de los AGL totales.

De acuerdo a la observación visual de la Figura 10, podría inferirse un aumento en la concentración de determinados ácidos libres en quesos E2, entre el principio y el final del período de maduración, principalmente los ácidos palmítico (encontrado en mayor concentración que el ácido oleico para los quesos E1 y E2 de este ensayo) y mirístico. Sin embargo, así como ocurrió con las concentraciones de AGL totales en los quesos E1 y E2 (Tabla 6), el ANOVA llevado a cabo no encontró la presencia de ninguna diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) entre las concentraciones de todos los AGL analizados entre 3 y 60 días, tanto para quesos T como para ambos tipos de quesos experimentales. Esto indicaría que, al igual que en el ensayo anterior, *Lactobacillus acidophilus* B no presenta una actividad lipolítica detectable durante la maduración del queso Pategrás.

**Figura 9.** Concentraciones de ácidos grasos libres (mg/Kg de queso) desde C<sub>6:0</sub> hasta C<sub>18:2</sub> en los quesos correspondientes al Ensayo 2, donde se empleó la cepa probiótica comercial *Lactobacillus paracasei* como fermento adjunto, a los 3 y 60 días de maduración.



T: quesos testigo elaborados sin adición de bacterias probióticas.

E1: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en forma liofilizada.

E2: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en el sustrato lácteo graso.

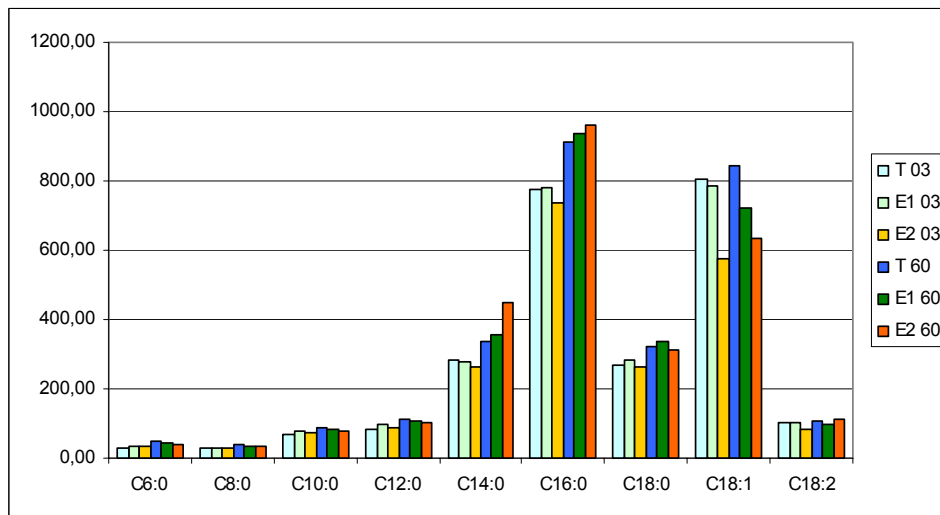
03 y 60: días de maduración. Promedios de 3 réplicas.

**Tabla 8.** ANOVA realizado para determinar diferencias significativas en las concentraciones de cada AGL entre 3 y 60 días de maduración, para los quesos T, E1 y E2 correspondientes al Ensayo 2, donde se empleó la cepa probiótica comercial *Lactobacillus paracasei* (cepa A) como fermento probiótico adjunto.

AGL	T – Δ 3-60	E1 – Δ 3-60	E2 – Δ 3-60
ácido caproico	X	-	-
ácido caprílico	X	-	-
ácido cáprico	-	-	-
ácido láurico	-	-	-
ácido mirístico	X	-	-
ácido palmítico	X	-	-
ácido esteárico	-	-	-
ácido oleico	-	-	-
ácido linoleico	X	-	-

X denota la presencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

**Figura 10.** Concentraciones de ácidos grasos libres (mg/Kg de queso) desde C<sub>6:0</sub> hasta C<sub>18:2</sub> en los quesos correspondientes al Ensayo 3, donde se empleó la cepa probiótica comercial *Lactobacillus acidophilus* B como fermento adjunto, a los 3 y 60 días de maduración.



T: quesos testigo elaborados sin adición de bacterias probióticas.

E1: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en forma liofilizada.

E2: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en el sustrato lácteo graso.

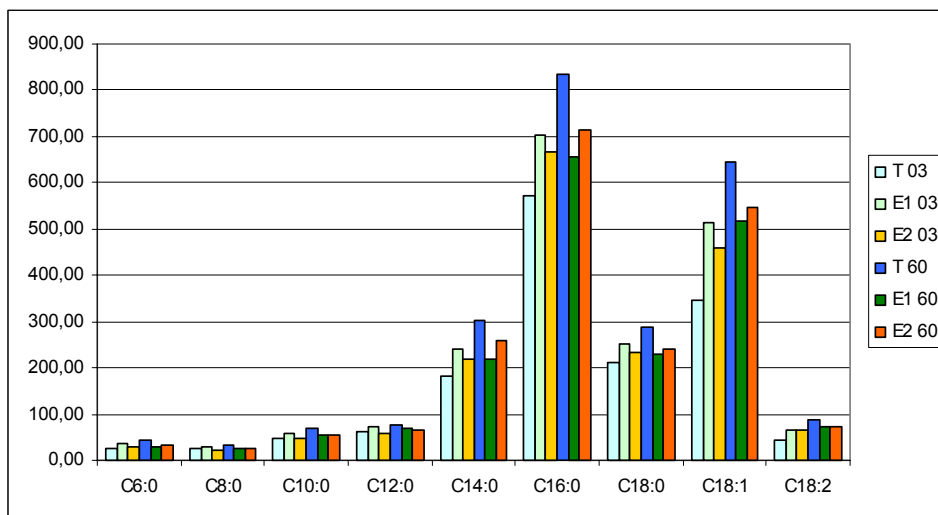
03 y 60: días de maduración. Promedios de 3 réplicas.

### 3.2.4. Ensayo 4: *Bifidobacterium lactis*

La Figura 11 muestra los perfiles de AGL correspondientes al ensayo donde se utilizó *Bifidobacterium lactis* como fermento probiótico. Todos los perfiles observados se corresponden con el perfil típico de AGL en leche de vaca, tanto a 3 como a 60 días, con proporciones de ácidos grasos de cadena larga (C<sub>14:0</sub>-C<sub>18:2</sub>) entre el 89,6% y el 91,1%, de los cuales los ácidos oleico y palmítico, en conjunto, representaron entre el 60,7% y el 62,6% de los AGL totales.

En el ANOVA realizado para determinar aumentos en las concentraciones de AGL durante la maduración, sólo se encontraron dos diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en quesos T, para los ácidos mirístico y linoleico, no registrándose variaciones para los AGL mayoritarios (palmítico y oleico) (Tabla 9). Por su parte, el empleo de *Bifidobacterium lactis* como fermento adjunto no supuso aumentos significativos en la concentración de ningún ácido graso entre los 3 y los 60 días de maduración (Tabla 9), revelando una ausencia de actividad lipolítica para dicha cepa probiótica.

**Figura 11.** Concentraciones de ácidos grasos libres (mg/Kg de queso) desde C<sub>6:0</sub> hasta C<sub>18:2</sub> en los quesos correspondientes al Ensayo 4, donde se empleó la cepa probiótica comercial *Bifidobacterium lactis* como fermento adjunto, a los 3 y 60 días de maduración.



T: quesos testigo elaborados sin adición de bacterias probióticas.

E1: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en forma liofilizada.

E2: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en el sustrato lácteo graso.

03 y 60: días de maduración. Promedios de 3 réplicas.

**Tabla 9.** ANOVA realizado para determinar diferencias significativas en las concentraciones de cada AGL entre 3 y 60 días de maduración, para los quesos T, E1 y E2 correspondientes al Ensayo 4, donde se empleó la cepa probiótica comercial *Bifidobacterium lactis* como fermento probiótico adjunto.

AGL	T – Δ 3-60	E1 – Δ 3-60	E2 – Δ 3-60
ácido caproico	-	-	-
ácido caprílico	-	-	-
ácido cáprico	-	-	-
ácido láurico	-	-	-
ácido mirístico	X	-	-
ácido palmítico	-	-	-
ácido esteárico	-	-	-
ácido oleico	-	-	-
ácido linoleico	X	-	-

X denota la presencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

### 3.2.5. Ensayo 5: *Lactobacillus acidophilus* C

La Figura 12 muestra los perfiles de AGL correspondientes al ensayo donde se utilizó *Lactobacillus acidophilus* C como fermento probiótico. Todos los perfiles observados se corresponden con el perfil típico de AGL en leche de vaca, tanto a 3 como a 60 días, con proporciones de ácidos grasos de cadena larga (C<sub>14:0</sub>-C<sub>18:2</sub>) entre el 92,4% y el 93,7%, de los cuales los ácidos oleico y palmítico, en conjunto, representaron entre el 64,4% y el 65,6% de los AGL totales.

Como se observa en la Tabla 10, el ANOVA llevado a cabo detectó diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la liberación de ácidos grasos de cadena corta y media (caproico, caprílico y cáprico) durante la maduración de los quesos E1, mientras que en los quesos T no se registraron tales diferencias. Podríamos pensar en una cierta actividad lipolítica, presente durante la maduración de los quesos, atribuible a la cepa de *Lactobacillus acidophilus* utilizada. Sin embargo, la otra metodología de adición (E2) no produjo tales diferencias. Además, a pesar del resultado del ANOVA, tanto las concentraciones de AGL de cadena corta en quesos E1 de 60 días de maduración como sus diferencias con respecto a los 3 días, fueron de cualquier manera muy bajas en valor absoluto. Es por ello que, a pesar de haberse encontrado diferencias significativas en tres de los nueve AGL analizados, las mismas no impactan sobre el contenido total de AGL en quesos E1 de 60 días (Tabla 6).

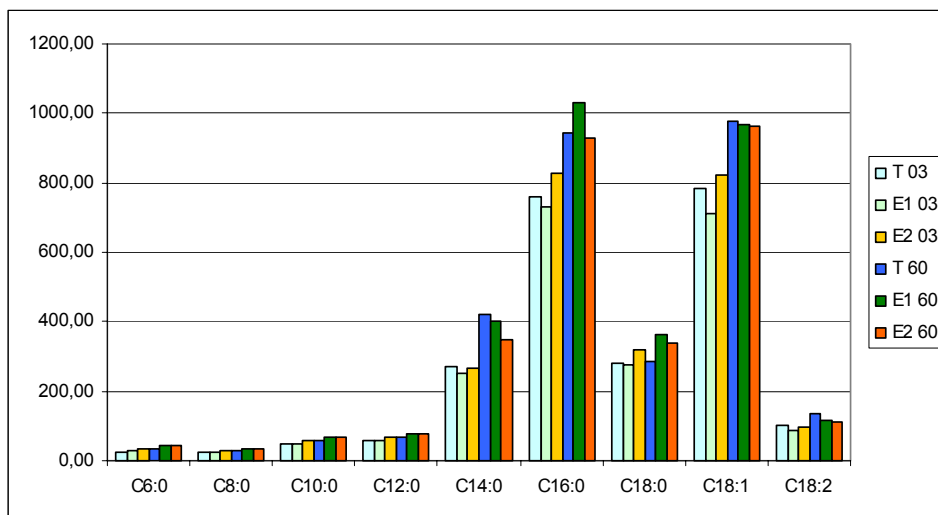
### 3.2.6. Ensayo 6: *Lactobacillus casei*

La Figura 13 muestra los perfiles de AGL correspondientes al ensayo donde se utilizó *Lactobacillus casei* como fermento probiótico. Todos los perfiles observados se corresponden con el perfil típico de AGL en leche de vaca, tanto a 3 como a 60 días, con proporciones de ácidos grasos de cadena larga (C<sub>14:0</sub>-C<sub>18:2</sub>) entre el 87,5% y el 91,2%, de los cuales los ácidos oleico y palmítico, en conjunto, representaron entre el 60,3% y el 62,8% de los AGL totales.

En la Figura 13 se observan, en general, enormes diferencias en la evolución de las concentraciones de todos los AGL entre 3 y 60 días de maduración. Estas diferencias son más marcadas en los quesos experimentales, especialmente para el tipo E2, y los AGL que muestran mayores variaciones corresponden a aquellos encontrados en mayor concentración (palmítico y oleico).



**Figura 12.** Concentraciones de ácidos grasos libres (mg/Kg de queso) desde C<sub>6:0</sub> hasta C<sub>18:2</sub> en los quesos correspondientes al Ensayo 5, donde se empleó la cepa probiótica comercial *Lactobacillus acidophilus* C como fermento adjunto, a los 3 y 60 días de maduración.



T: quesos testigo elaborados sin adición de bacterias probióticas.

E1: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en forma liofilizada.

E2: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en el sustrato lácteo graso.

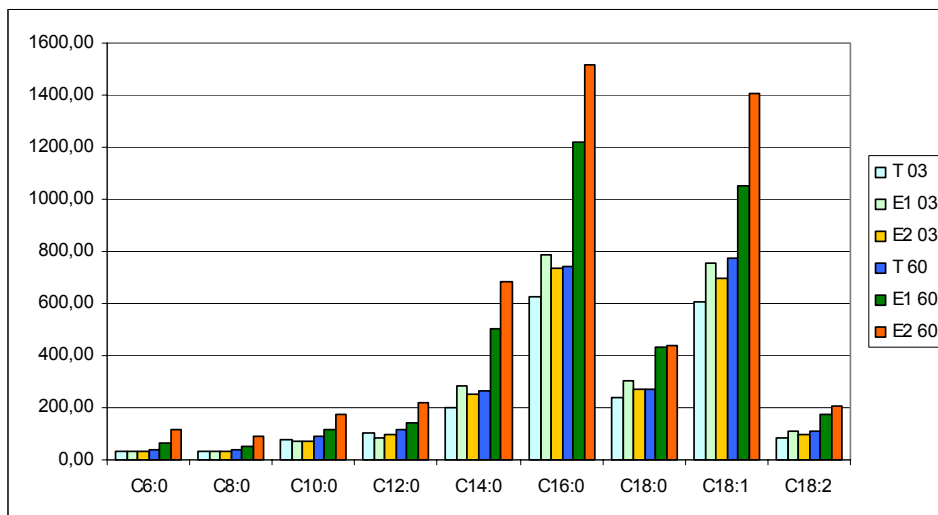
03 y 60: días de maduración. Promedios de 3 réplicas.

**Tabla 10.** ANOVA realizado para determinar diferencias significativas en las concentraciones de cada AGL entre 3 y 60 días de maduración, para los quesos T, E1 y E2 correspondientes al Ensayo 5, donde se empleó la cepa probiótica comercial *Lactobacillus acidophilus* C como fermento probiótico adjunto.

AGL	T – Δ 3-60	E1 – Δ 3-60	E2 – Δ 3-60
ácido caproico	-	X	-
ácido caprílico	-	X	-
ácido cáprico	-	X	-
ácido láurico	-	-	-
ácido mirístico	-	-	-
ácido palmítico	-	-	-
ácido esteárico	-	-	-
ácido oleico	-	-	-
ácido linoleico	-	-	-

X denota la presencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

**Figura 13.** Concentraciones de ácidos grasos libres (mg/Kg de queso) desde C<sub>6:0</sub> hasta C<sub>18:2</sub> en los quesos correspondientes al Ensayo 6, donde se empleó la cepa probiótica comercial *Lactobacillus casei* como fermento adjunto, a los 3 y 60 días de maduración.



T: quesos testigo elaborados sin adición de bacterias probióticas.

E1: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en forma liofilizada.

E2: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en el sustrato lácteo graso.

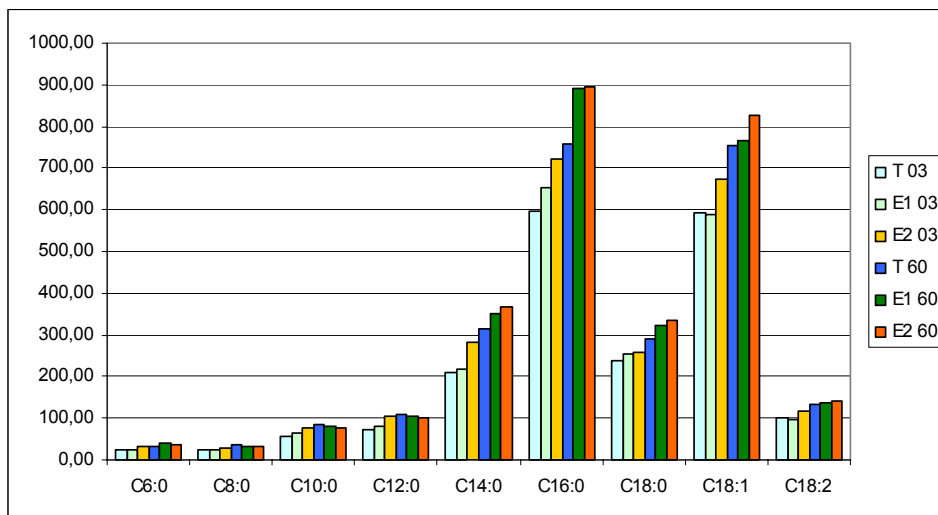
03 y 60: días de maduración. Promedios de 3 réplicas.

A pesar de los resultados inferidos a partir del análisis visual de la Figura 13, un ANOVA realizado no encontró la presencia de ninguna diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) entre las concentraciones de todos los AGL analizados entre 3 y 60 días, para ningún tipo de queso. Esto se debe, probablemente, a la baja repetitividad observada para este ensayo entre las réplicas del mismo tipo de queso. En efecto, se encontraron desviaciones estándar muy elevadas, con coeficientes de variación que llegaron a superar el 45% (Apéndice 1).

### 3.2.7. Ensayo 7: *Lactobacillus rhamnosus*

La Figura 14 muestra los perfiles de AGL correspondientes al ensayo donde se utilizó *Lactobacillus rhamnosus* como fermento probiótico. Todos los perfiles observados se corresponden con el perfil típico de AGL en leche de vaca, tanto a 3 como a 60 días, con proporciones de ácidos grasos de cadena larga (C<sub>14:0</sub>-C<sub>18:2</sub>) entre el 89,5% y el 91,2%, de los cuales los ácidos oleico y palmítico, en conjunto, representaron entre el 60,3% y el 62,1% de los AGL totales.

**Figura 14.** Concentraciones de ácidos grasos libres (mg/Kg de queso) desde C<sub>6:0</sub> hasta C<sub>18:2</sub> en los quesos correspondientes al Ensayo 7, donde se empleó la cepa probiótica aislada en el INLAIN *Lactobacillus rhamnosus* como fermento adjunto, a los 3 y 60 días de maduración.



T: quesos testigo elaborados sin adición de bacterias probióticas.

E1: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en forma liofilizada.

E2: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en el sustrato lácteo graso.

03 y 60: días de maduración. Promedios de 3 réplicas.

**Tabla 11.** ANOVA realizado para determinar diferencias significativas en las concentraciones de cada AGL entre 3 y 60 días de maduración, para los quesos T, E1 y E2 correspondientes al Ensayo 7, donde se empleó la cepa probiótica aislada en el INLAIN *Lactobacillus rhamnosus* como fermento probiótico adjunto.

AGL	T – Δ 3-60	E1 – Δ 3-60	E2 – Δ 3-60
ácido caproico	-	-	-
ácido caprílico	X	-	-
ácido cáprico	X	-	-
ácido láurico	X	-	-
ácido mirístico	-	-	-
ácido palmítico	-	-	-
ácido esteárico	-	-	-
ácido oleico	-	-	-
ácido linoleico	-	-	-

X denota la presencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Un ANOVA arrojó diferencias significativas ( $P < 0,05$ , Tabla 11) sólo para algunos AGL de cadena corta y media en quesos T, entre 3 y 60 días de maduración. Debido a la alta variabilidad entre réplicas, la existencia de diferencias significativas entre 3 y 60 días en quesos E1 y E2, inferida por comparación visual de los promedios obtenidos para cada AGL, y en especial para los AGL mayoritarios (Figura 14), queda nuevamente descartada por los resultados del ANOVA, no habiendo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) para ningún AGL (Tabla 11).

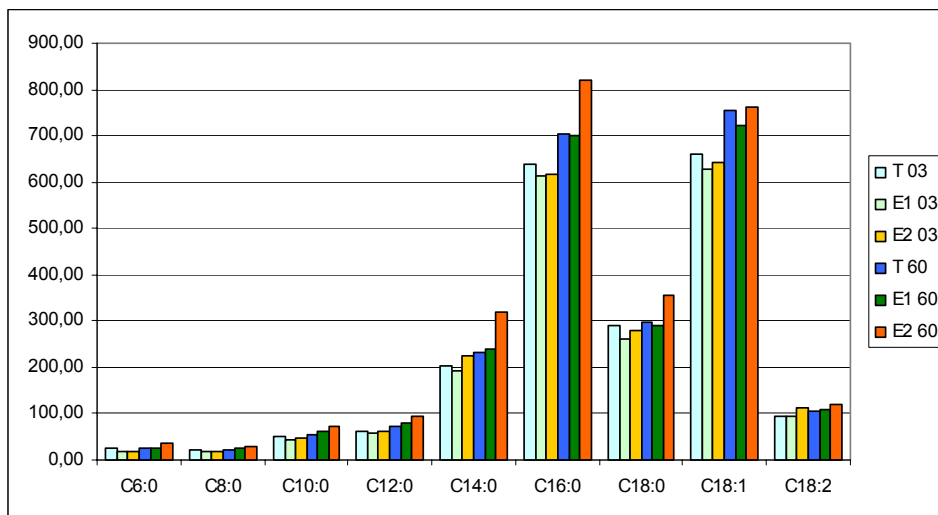
### 3.2.8. Ensayo 8: fermento probiótico mixto: *Lactobacillus acidophilus* C, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis*

La Figura 15 muestra los perfiles de AGL correspondientes al ensayo donde se utilizó el fermento probiótico mixto (*Lactobacillus acidophilus* C, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis*). Todos los perfiles observados se corresponden con el perfil típico de AGL en leche de vaca, tanto a 3 como a 60 días, con proporciones de ácidos grasos de cadena larga ( $C_{14:0}$ - $C_{18:2}$ ) entre el 91,2% y el 92,7%, de los cuales los ácidos oleico y palmítico, en conjunto, representaron entre el 60,7% y el 64,2% de los AGL totales.

De acuerdo al ANOVA llevado a cabo, no existieron diferencias significativas para la concentración de ningún AGL entre 3 y 60 días de maduración, en quesos T y E1 (Tabla 12). Por otro lado, las diferencias de concentración observadas en los quesos E2 (especialmente para los AGL de cadena larga, Figura 15), fueron significativas desde el punto de vista estadístico para los ácidos caproico, mirístico, palmítico, esteárico y oleico ( $P > 0,05$ , Tabla 12). Al tratarse, excepto el ácido caproico, de los AGL mayoritarios, esto explicaría las diferencias significativas en la concentración de AGL totales (Tabla 6) en quesos E2, entre el inicio y el final de la maduración, no encontradas en ningún ensayo con cepas probióticas individuales.

De cualquier manera, a pesar de ser el único ensayo donde se encontró una serie de diferencias a lo largo de la maduración de quesos experimentales, ni las concentraciones individuales ni totales de AGL difirieron de los quesos T para igual tiempo de maduración (Tabla 6).

**Figura 15.** Concentraciones de ácidos grasos libres (mg/Kg de queso) desde C<sub>6:0</sub> hasta C<sub>18:2</sub> en los quesos correspondientes al Ensayo 8, donde se adicionó la combinación de cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* C, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis* como fermento adjunto, a los 3 y 60 días de maduración.



T: quesos testigo elaborados sin adición de bacterias probióticas.

E1: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en forma liofilizada.

E2: quesos elaborados con la cepa probiótica adicionada en el sustrato lácteo graso.

03 y 60: días de maduración. Promedios de 3 réplicas.

**Tabla 12.** ANOVA realizado para determinar diferencias significativas en las concentraciones de cada AGL entre 3 y 60 días de maduración, para los quesos T, E1 y E2 correspondientes al Ensayo 8, utilizando como fermento probiótico una combinación de *Lactobacillus acidophilus* C, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis*.

AGL	T – Δ 3-60	E1 – Δ 3-60	E2 – Δ 3-60
ácido caproico	-	-	X
ácido caprílico	-	-	-
ácido cáprico	-	-	-
ácido láurico	-	-	-
ácido mirístico	-	-	X
ácido palmítico	-	-	X
ácido esteárico	-	-	X
ácido oleico	-	-	X
ácido linoleico	-	-	-

X denota la presencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

### 3.2.9. Análisis por componentes principales de los perfiles de AGL

En el análisis realizado hasta este punto, por comparación visual y por ANOVA de los perfiles de AGL, no se observaron diferencias notables entre quesos T, E1 y E2, tanto al comienzo como al final del período de maduración, para ninguno de los ocho ensayos realizados. Aún en los quesos en donde las bacterias probióticas produjeron aumentos en las concentraciones de AGL totales a lo largo de la maduración, las mismas se verificaron también en los quesos T, no existiendo, para ningún queso experimental, niveles de lipólisis mayores a los quesos T a tiempos de maduración equivalentes. Sin embargo, dado que se trata de un número elevado de variables analizadas simultáneamente, se decidió aplicar la técnica de análisis por componentes principales (ACP), utilizando como variables cada uno de los nueve AGL cuantificados en forma individual, de manera de detectar si existen diferencias sutiles en los perfiles obtenidos para uno y otro tipo de queso, teniendo en cuenta en qué magnitud influye cada AGL en la lipólisis global.

El ACP tiene dos objetivos. En primer lugar, se emplea para analizar la contribución de cada AGL en la variación total encontrada entre los diferentes quesos, mediante el exámen de los *loadings* o cargas factoriales asignados a cada AGL en los componentes principales (CP) más importantes. Por otro lado, la resolución de un CP para una muestra determinada, permite asignarle un *score* o puntaje a la misma, que corresponde a dicho CP; es decir, cada muestra tendrá un *score* para cada CP. Dichos *scores* se representan usualmente en un gráfico de dos o tres dimensiones, utilizando un eje para cada CP seleccionado para el análisis, que usualmente son los dos o tres que explican el mayor porcentaje de la variancia total del sistema. Dicho gráfico se analiza de manera de buscar patrones de agrupamiento entre muestras, ya que las mismas se encontrarán más cerca si poseen perfiles de AGL similares, desde un punto de vista que tiene en consideración la contribución de cada AGL a la variabilidad total del sistema. Finalmente, la herramienta de clasificación “análisis de *clusters*” (AC), permite realizar un agrupamiento de muestras en una cantidad predefinida de conjuntos, de acuerdo a sus *scores*. Un elevado porcentaje de muestras correspondientes a un mismo tratamiento que se agrupen dentro de un mismo cluster, indica una mayor similitud entre las muestras correspondientes a dicho tratamiento y una mayor diversidad con respecto a las correspondientes a tratamientos diferentes, resaltando el efecto ejercido por tal tratamiento.

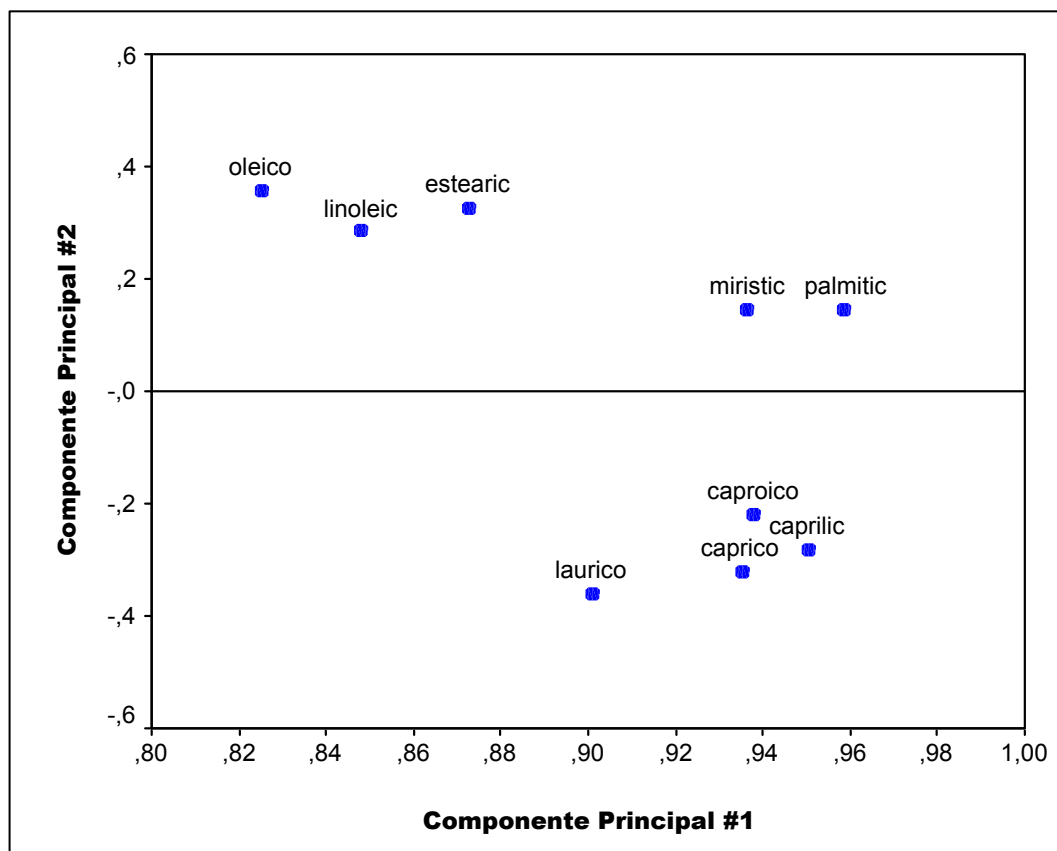
En nuestro trabajo, el ACP se aplicó, en primer lugar, al conjunto completo de datos, correspondiente a los quesos T, E1 y E2 de los 8 ensayos, a 3 y 60 días de maduración. Se utilizó la matriz de correlación en el ACP, en vez de la matriz de variancia-covariancia, dado que se habían encontrado diferencias en el orden de magnitud de las variables numéricas y de la variancia calculada para las variables utilizadas (AGL). Si bien existen criterios diversos para determinar el número de componentes principales a ser extraídos, en nuestro trabajo utilizamos el criterio de *eigenvalue* mayor a 1, lo que es equivalente al criterio de *eigenvalue* mayor al promedio cuando el ACP se lleva a cabo utilizando la matriz de variancia-covariancia. En los casos en donde, según el criterio utilizado, se extraía un sólo CP, se consideró forzosamente el segundo, de modo de poder graficar *scores* y *loading* en dos dimensiones, y de esta manera mejorar la legibilidad de los resultados.

Se seleccionaron para el ACP los dos primeros CP extraídos, que en su conjunto explicaron el 90,5% de la variabilidad total del sistema (82,5% PC1 y 8,0%PC2). La Figura 16 muestra la representación de los *loadings* o cargas factoriales correspondientes a cada AGL utilizado como variable para el ACP, y la Figura 17 el gráfico de *scores* o puntajes correspondientes a cada muestra, para los componentes principales 1 y 2.

El primer componente principal seleccionado (CP1) tuvo *loadings* elevados y positivos, todos ellos mayores a 0,8, para las nueve variables analizadas. Dentro de los puntajes más altos se agruparon los ácidos palmítico (0,96), caprílico (0,95), mirístico (0,94), caproico (0,94) y cáprico (0,94). El ácido láurico tuvo un *loading* algo menor (0,90), mientras que las variables restantes oscilaron entre 0,83 y 0,87. El CP2, por su parte, mostró *loadings* positivos para los AGL de cadena larga ( $C_{14:0}$ - $C_{18:2}$ ), mientras que para aquéllos de cadena corta y media ( $C_{6:0}$ - $C_{12:0}$ ) los *loadings* fueron siempre negativos. Todos los *loadings* para CP2 fueron menores que para CP1 en valor absoluto, no siendo en ningún caso superiores a 0,4. Como se observa en la Figura 16, las variables se dividen en tres grupos mas o menos definidos, dentro de los cuales la influencia de cada una de aquéllas sobre la variancia total serían similares. En primer lugar, los ácidos mirístico y palmítico serían los responsables de la mayor variabilidad observada entre las muestras, dado que presentan valores positivos para el CP2 mientras que sus *loadings* para el CP1 están entre los más altos. En una posición intermedia se encontrarían los ácidos de cadena más larga ( $C_{16:0}$ - $C_{18:2}$ ), cuyos *loadings* fueron menores para el CP1, si bien fueron positivos para ambos CP1 y CP2. Por último se

encontrarían los AGL de cadena corta ( $C_{6:0}$ - $C_{12}$ ) los cuales, aunque tuvieron *loadings* positivos y elevados para CP1, fueron en todos los casos negativos para el CP2.

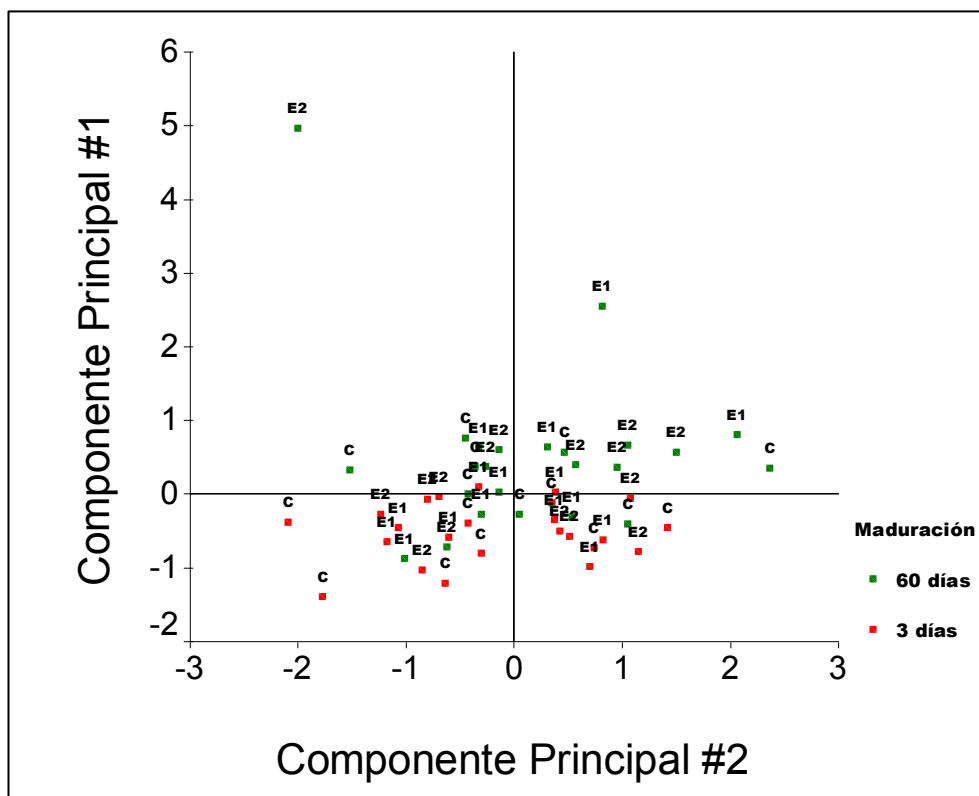
**Figura 16.** Análisis por componentes principales de los perfiles de AGL obtenidos por cromatografía gaseosa, correspondientes a los quesos testigo y experimentales (E1 y E2) de los 8 ensayos realizados, a 3 y 60 días de maduración. Gráfico de *loadings* o cargas factoriales para cada AGL utilizado como variable.



En lo referente a los *scores* asignados a cada muestra, la representación de los mismos en un gráfico de dos dimensiones (CP1 versus CP2, Figura 17) muestra una tendencia de las muestras de todos los ensayos a agruparse por tiempo de maduración. Esto queda evidenciado por una separación evidente a lo largo del eje del CP1, de los *scores*, negativos y positivos, correspondientes a muestras de 3 y 60 días de maduración, respectivamente. Dicha separación no se observó a lo largo del eje correspondiente al CP2; por lo tanto, de acuerdo a los *loadings* obtenidos para CP1, los AGL entre  $C_{6:0}$  y  $C_{16:0}$  serían los que más variaciones sufrieron durante la maduración.



**Figura 17.** Análisis por componentes principales de los perfiles de AGL obtenidos por cromatografía gaseosa, correspondientes a los quesos testigo (C) y experimentales (E1 y E2) de los 8 ensayos realizados, a 3 y 60 días de maduración. Gráfico de *scores* o puntajes correspondientes a cada muestra para los componentes principales 1 y 2.



El AC se realizó, en primer lugar, empleando CP1 como variable, y forzando el agrupamiento de las muestras en 2, 3 y 4 *clusters* de manera predefinida. Dado que la utilización de 3 *clusters* agrupó el 96% de las muestras en sólo uno de ellos, mientras que el 4% restante se repartió en los 2 *clusters* restantes, se realizó el análisis utilizando 4 *clusters*, de modo que el 96% de las muestras se repartió esta vez entre los *clusters* 1 y 2 (aproximadamente la mitad en cada uno). El 4% restante corresponde a las dos muestras que se observan más alejadas del resto en la Figura 17, agrupada cada una en un cluster diferente (3 y 4 para E1 y E2, respectivamente). Ambos quesos corresponden a la experiencia 6, donde se utilizó *Lactobacillus casei*, y la baja repetitividad observada entre las réplicas del mismo tipo de queso condujo a errores muy groseros en la determinación de las concentraciones de AGL. Dentro del *cluster* 1, el 75% y 25% de las muestras correspondieron a quesos de 3 y 60 días de maduración, respectivamente, mientras que dentro del *cluster* 2 se encontraron exclusivamente (100%) muestras de 60 días de maduración.

Por otro lado, en otro AC realizado usando ambos CP1 y CP2 como variables, se predefinieron 5 *clusters*, dentro de los cuales el 92% de las muestras se repartió entre los dos primeros, ya que al utilizar 4 *clusters*, uno sólo de ellos comprendía el 92% de las muestras. Dentro del *cluster* 1, el 54% y 46% de las muestras correspondieron a quesos de 3 y 60 días de maduración, respectivamente, mientras que para el *cluster* 2 los porcentajes fueron similares (55% y 45% para muestras de 3 y 60 días, respectivamente). De esta manera, se confirman los resultados del análisis visual de la Figura 17, en el sentido de que CP1 realiza un agrupamiento real de las muestras en dos grupos bien definidos de acuerdo al tiempo de maduración, mientras que cuando se tiene en cuenta también CP1 y CP2, dicho agrupamiento no resulta tan evidente.

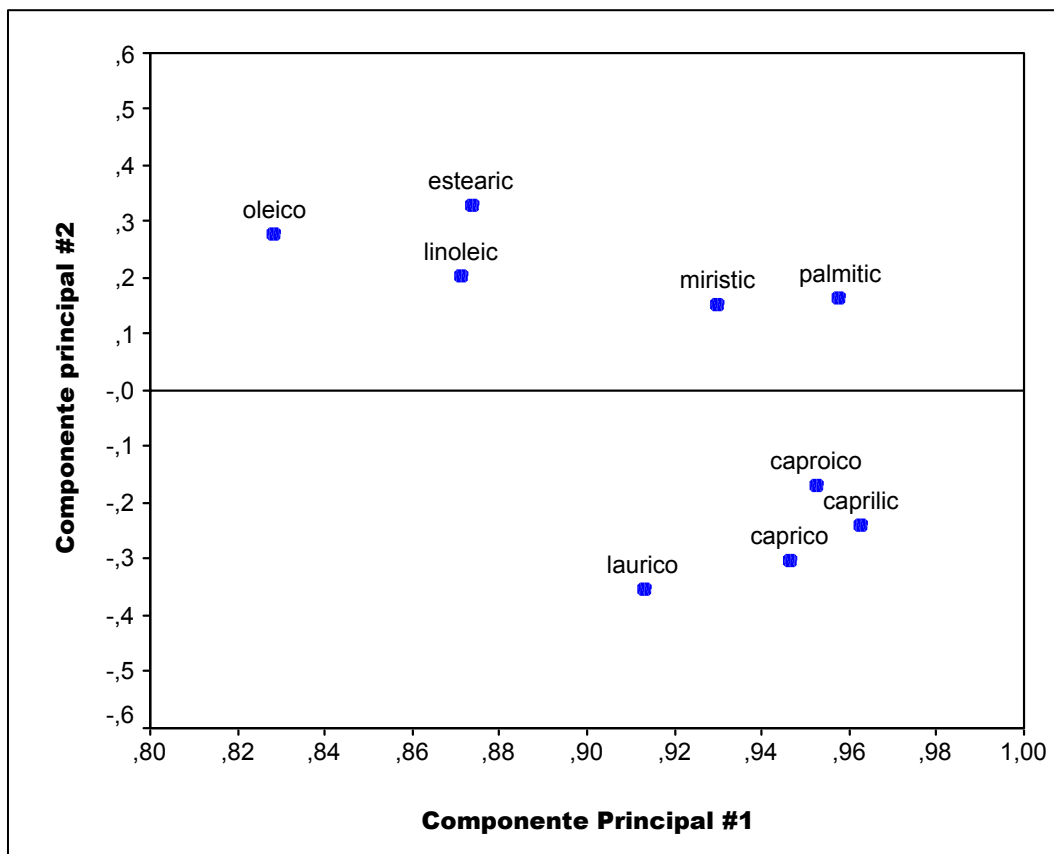
Teniendo en cuenta el tipo de queso, ya sea éste T, E1 o E2, no se observan en la Figura 17 patrones definidos de agrupamiento entre muestras. En forma concordante, en los AC realizados anteriormente, empleando como variables tanto CP1 como ambos CP1 y CP2, cada *cluster* agrupó porcentajes similares de muestras correspondientes a cada tipo de queso (entre el 28% y el 40%).

Una vez verificado el efecto del tiempo de maduración sobre la liberación de AGL, se realizó otro ACP aplicado únicamente a los 60 días de maduración. Se emplearon sólo los quesos de 60 días, con el objetivo de maximizar diferencias entre los quesos T y los experimentales, debidas a una posible actividad de las bacterias probióticas durante el período de maduración. Este análisis se llevó a cabo para determinar alguna influencia de cada cepa probiótica utilizada. La metodología utilizada para la realización del ACP fue la misma que para el análisis de todas las muestras juntas (a los 3 y 60 días de maduración), realizado previamente.

Para este nuevo ACP se seleccionaron los dos primeros CP extraídos, que en su conjunto explicaron el 90,3% de la variabilidad total del sistema (83,9% CP1 y 6,4% CP2). La Figura 18 muestra la representación de los *loadings* o cargas factoriales correspondientes a cada AGL utilizado como variable para el ACP, y la Figura 19 el gráfico de *scores* o puntajes correspondientes a cada muestra, para los componentes principales 1 y 2.

El gráfico de *loadings* (Figura 18) mostró resultados muy similares a los obtenidos a partir del ACP con todas las muestras de 3 y 60 días juntas (Figura 16), y por lo tanto el análisis de resultados se corresponde con el realizado previamente para dicha figura, siendo la influencia de cada AGL en particular, similar.

**Figura 18.** Análisis por componentes principales de los perfiles de AGL obtenidos por cromatografía gaseosa, correspondientes a los quesos testigo y experimentales (E1 y E2) de los 8 ensayos realizados, a 60 días de maduración. Gráfico de *loadings* o cargas factoriales para cada AGL utilizado como variable.

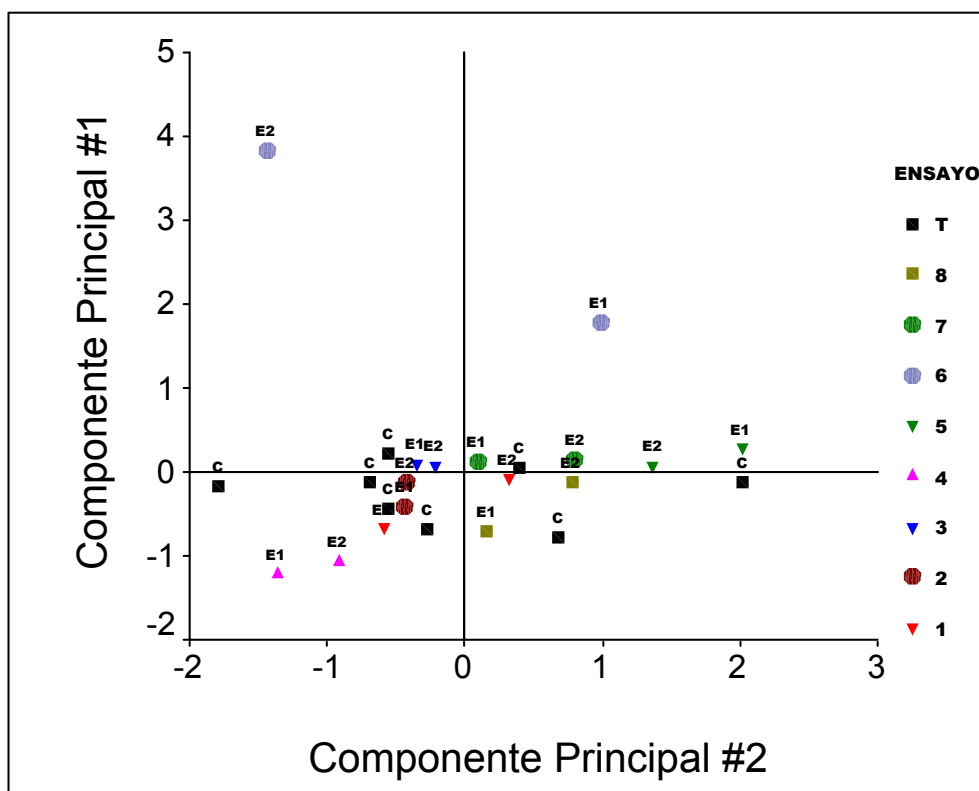


Los *scores* de las muestras correspondientes al conjunto de quesos T de 60 días estuvieron dentro de un rango muy estrecho en lo respectivo al CP1, alrededor de 0, así como también los quesos E1 y E2 de todos los ensayos, a excepción de ambos quesos experimentales del ensayo 6, cuyos *scores* fueron positivos y con valor absoluto más elevado (Figura 19). Para estos quesos, los *scores* en PC1 resultaron similares entre sí y bastante diferentes de todas las muestras correspondientes al resto de los ensayos. Para PC2, en cambio, los *scores* para los quesos E1 y E2 del ensayo 6 resultaron muy diferentes entre sí (Figura 19). No obstante, como se aclaró previamente, en dicho ensayo hubo una dispersión muy alta en la determinación de AGL entre réplicas del mismo tipo de queso, por lo que las concentraciones muy elevadas de AGL a los 60 días de maduración (especialmente palmítico y oleico), no fueron sin embargo significativamente mayores que a los 3 días, de acuerdo al ANOVA realizado.

Por otro lado, los quesos T mostraron una dispersión mucho mayor a lo largo del eje de CP2 que con respecto a CP1. Dentro de los quesos experimentales se encuentran agrupamientos para los ensayos 2 y 3 (con *scores* muy similares entre quesos E1 y E2), 4, 5, 7 y 8 (con *scores* similares entre quesos E1 y E2) (Figura 19). Sin embargo, no se encuentran diferencias entre quesos T y experimentales dentro de cada ensayo; además, en este sentido, un AC agrupó las tres muestras de cada ensayo dentro del mismo *cluster* (a excepción del ensayo 6, que no se tuvo en cuenta por los motivos explicados previamente).

En cuanto al tipo de agregado del fermento probiótico, no se verificó que los quesos E1 de los diferentes ensayos posean *scores* más elevados que los quesos E2 correspondientes, ni viceversa (Figura 19). Asimismo, el AC no arrojó ningún resultado positivo en cuanto a la presencia de agrupaciones por tipo de queso, ya que dentro de cada *cluster* se encontró aproximadamente una tercera parte de muestras de cada tipo (T, E1 y E2).

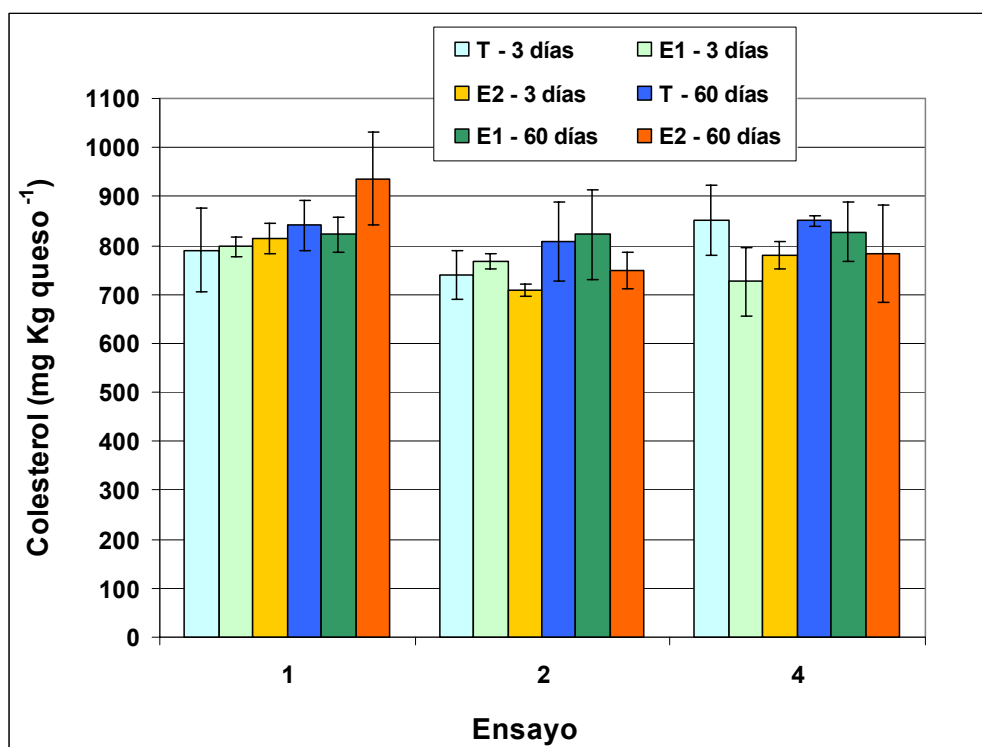
**Figura 19.** Análisis por componentes principales de los perfiles de AGL obtenidos por cromatografía gaseosa, correspondientes a los quesos testigo (C) y experimentales (E1 y E2) de los 8 ensayos realizados, a 60 días de maduración. Gráfico de *scores* o puntajes correspondientes a cada muestra para los componentes principales 1 y 2.



### 3.3. Determinación del contenido de colesterol

El contenido de colesterol se determinó en los quesos testigo y experimentales correspondientes a los ensayos 1, 2 y 4, a los 3 y 60 días, de manera de determinar alguna posible disminución en la concentración de dicho compuesto a lo largo de la maduración debida a su metabolización por parte del fermento probiótico. Los ensayos fueron seleccionados de modo de estudiar una cepa probiótica de cada grupo principal: bifidobacterias (ensayo 4), *Lactobacillus acidophilus* (ensayo 1) y *Lactobacillus* del grupo casei (ensayo 2). Los resultados se obtuvieron a partir de las 3 réplicas de cada ensayo, y se muestran en la Figura 20.

**Figura 20.** Contenido de colesterol en quesos Pategrás elaborados con y sin adición de una cepa probiótica de cada grupo microbiano, a los 3 y 60 días de maduración.



Promedios y desviaciones estándar para 3 réplicas.

E1: quesos con adición de probióticos en forma liofilizada; E2: quesos con adición de probióticos en el SLG; T: quesos sin adición de fermentos probióticos.

Cepas probióticas utilizadas en los diferentes ensayos: 1: *Lactobacillus acidophilus* A; 2: *Lactobacillus paracasei*; 4: *Bifidobacterium lactis*.

Un análisis visual de la figura demuestra que el contenido de colesterol fue en general similar, tanto entre los distintos ensayos como para los diferentes quesos dentro de un mismo ensayo. Un ANOVA de una vía realizado promediando los valores correspondientes a quesos testigo y experimentales, tanto a 3 como a 60 días, no arrojó diferencias significativas ( $P = 0,08$ ) entre los tres ensayos.

Los valores correspondientes a los 3 días de maduración se encontraron, para todas las muestras, dentro de los rangos esperables, teniendo en cuenta que el contenido de materia grasa de los quesos fue un poco menor al 30%, y que de acuerdo a la bibliografía el colesterol representa entre un 0,3 y un 0,4% de la grasa láctea total (Bitman y Wood, 1990).

Por otro lado, y en forma independiente para cada ensayo, se realizó la comparación mediante ANOVA de una vía entre las 6 medias correspondientes a los tres tipos de quesos (T, E1 y E2) tanto al inicio (3 días) como al final (60 días) del período de maduración. Los valores de  $P$  obtenidos en este caso fueron iguales a 0,138, 0,200 y 0,203 cuando se emplearon como fermentos probióticos las cepas de *Lactobacillus acidophilus* A (ensayo 1), *Lactobacillus paracasei* (ensayo 2) y *Bifidobacterium lactis* (ensayo 4), respectivamente.

Además, tampoco se encontraron diferencias significativas luego de comparar quesos dentro de una misma categoría entre 3 y 60 días. Aún la notoria diferencia que se observa en la figura 20 para el queso E2 del ensayo 1 entre 3 y 60 días, no resultó significativa desde el punto de vista estadístico, debido probablemente al mayor error experimental observado en este caso al final de la maduración.

Estos resultados indican, en primer lugar, que a lo largo del período de maduración del queso Pategrás elaborado en forma tradicional, no existe una modificación del contenido de colesterol, ya que no hubo variaciones entre los quesos T entre 3 y 60 días.

Por otra parte, la presencia de bacterias probióticas en los dos tipos de quesos experimentales elaborados tampoco logró una reducción en el contenido de colesterol, para ninguno de los grupos microbianos ensayados, indicando que los mismos no serían capaces de metabolizar este compuesto en el medio ambiente del queso Pategrás Argentino durante su maduración, no importando cuál sea su forma de agregado a los quesos durante la elaboración.

#### 4. Determinación del contenido de azúcares

La determinación de azúcares se realizó con el objetivo de determinar si el agregado de las cepas probióticas utilizadas en el presente estudio, tenía alguna influencia sobre las concentraciones de lactosa y galactosa presentes en los quesos al final de la maduración. Para ello, se compararon los resultados obtenidos en las determinaciones de azúcares reductores totales (mediante el método analítico volumétrico) y de galactosa residual (mediante el método enzimático).

La concentración de galactosa se determinó en las tres réplicas de los quesos T, E1 y E2 de 60 días, correspondientes a los ensayos 1 al 6, donde se utilizaron las cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* A, B y C, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum*. En todos los quesos probióticos analizados, las concentraciones de galactosa resultaron muy bajas, menores a 0,5 g Kg de queso<sup>-1</sup>. De la misma manera, en los quesos T se encontraron concentraciones de galactosa también muy bajas a los 60 días, en todos los ensayos realizados, sin que hayan existido diferencias apreciables con respecto a los quesos probióticos.

Por otro lado, las determinaciones de azúcares reductores totales arrojaron valores prácticamente iguales a los obtenidos para galactosa, tanto para quesos T como experimentales, y para los seis ensayos analizados. Así, podríamos suponer que al final de la maduración no existen residuos de otros azúcares reductores, tales como lactosa ni glucosa, tanto en quesos T como en aquellos con el agregado de cualquiera de las cepas comerciales empleadas.

#### 5. Análisis sensoriales

##### 5.1. Análisis sensoriales descriptivos

Los análisis sensoriales descriptivos se llevaron a cabo de modo de realizar una caracterización de los quesos Pategrás, desde el punto de vista de los principales atributos de apariencia, aroma y sabor, así como de textura. Debido a la limitación en la cantidad de elaboraciones de quesos destinados exclusivamente a análisis sensoriales factibles de realizar, se ensayaron sólo las cepas *Lactobacillus acidophilus* A y C, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium lactis* y la mezcla de cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* C, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis* (ensayos 1, 5, 2, 4, y 8, respectivamente).

Los resultados correspondientes a los quesos T resultan de utilidad para conocer el perfil sensorial de una de las variedades más importantes en nuestro país. Por otro lado, la caracterización de los quesos experimentales permite verificar si el agregado de cada fermento probiótico (o la combinación ensayada), altera de alguna forma las características sensoriales del queso elaborado de manera tradicional.

### 5.1.1. Atributos sensoriales de apariencia, aroma y sabor

La Tabla 13 muestra los promedios y las desviaciones estándar correspondientes a la evaluación de los principales parámetros sensoriales de apariencia, aroma y sabor, llevada a cabo por un panel sensorial constituido por 12 personas. Los valores medios de cada parámetro se compararon mediante ANOVA de una vía, y las diferencias encontradas se consideraron significativas teniendo en cuenta un valor  $P < 0,05$ . La primera fila de la Tabla 13, correspondiente a los quesos elaborado sin adición de bacterias probióticas, muestra, dentro de los atributos visuales, un puntaje alto asignado al parámetro “aspecto de la masa”, lo cual está relacionado con la ausencia total, o bien la presencia de muy pocos ojos, mientras que el color característico tuvo un valor intermedio entre neutro y amarillo. El aroma genuino a queso Pategrás tuvo también puntuaciones intermedias, así como el gusto “ácido” o “a crema”. Las muy bajas puntuaciones correspondientes al gusto residual, indican que el mismo no resulta persistente. En general, estos resultados están de acuerdo con las características fisicoquímicas de esta variedad de queso.

La presencia de bacterias probióticas resultó en muy pocos casos un factor de variación significativo, con relación a los puntajes asignados a los quesos T. A continuación se compara cada atributo analizado, entre quesos testigo y experimentales.

El color fue el único atributo que no presentó diferencias significativas entre ninguna de las muestras, y las pequeñas diferencias encontradas en el caso del aroma, correspondieron a distintos quesos probióticos entre sí, ninguno de los cuales, sin embargo, resultó diferente a los quesos T (Tabla 13).

El aspecto de la masa del queso obtuvo puntuaciones altas en la mayoría de las muestras de quesos probióticos, con valores cercanos a 7, al igual que para los quesos T. Las únicas excepciones correspondieron a los quesos con *Lactobacillus paracasei* (ensayo 2), los cuales tuvieron puntuaciones significativamente menores, para ambas formas de agregado del fermento probiótico (Tabla 13).



**Tabla 13.** Análisis sensoriales descriptivos realizados por un panel entrenado en degustación de quesos, en quesos Pategrás con y sin adición de diversas cepas probióticas. Atributos sensoriales visuales, de aroma y de sabor.

Nº de ensayo	Tipo de queso	Aspecto de la masa	Color	Aroma	Gusto ácido	Gusto a crema	Gusto residual
-	T	7,00 ± 0,74 <sup>b</sup>	5,58 ± 0,79 <sup>a</sup>	5,58 ± 0,79 <sup>ab</sup>	5,83 ± 1,03 <sup>cd</sup>	5,25 ± 0,75 <sup>bc</sup>	2,17 ± 0,72 <sup>a</sup>
1	E1	6,83 ± 0,58 <sup>b</sup>	5,50 ± 0,80 <sup>a</sup>	5,50 ± 0,52 <sup>ab</sup>	5,58 ± 0,67 <sup>bc</sup>	5,00 ± 0,60 <sup>bc</sup>	1,92 ± 0,51 <sup>a</sup>
1	E2	7,08 ± 0,67 <sup>b</sup>	5,42 ± 0,79 <sup>a</sup>	5,67 ± 0,78 <sup>ab</sup>	6,25 ± 0,75 <sup>de</sup>	5,08 ± 0,67 <sup>bc</sup>	1,92 ± 0,67 <sup>a</sup>
2	E1	5,17 ± 0,58 <sup>a</sup>	5,67 ± 0,65 <sup>a</sup>	5,75 ± 0,45 <sup>b</sup>	5,92 ± 0,90 <sup>cde</sup>	4,17 ± 0,83 <sup>a</sup>	3,17 ± 0,58 <sup>b</sup>
2	E2	5,25 ± 0,75 <sup>a</sup>	5,42 ± 0,79 <sup>a</sup>	5,67 ± 0,78 <sup>ab</sup>	6,08 ± 0,67 <sup>cde</sup>	3,92 ± 0,79 <sup>a</sup>	3,33 ± 0,89 <sup>b</sup>
4	E1	7,17 ± 0,72 <sup>b</sup>	5,75 ± 0,97 <sup>a</sup>	5,83 ± 0,94 <sup>b</sup>	5,17 ± 1,03 <sup>b</sup>	5,33 ± 0,65 <sup>bc</sup>	2,00 ± 0,74 <sup>a</sup>
4	E2	7,08 ± 0,79 <sup>b</sup>	6,05 ± 0,87 <sup>a</sup>	5,08 ± 0,79 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,78 <sup>a</sup>	5,42 ± 0,79 <sup>c</sup>	1,83 ± 0,72 <sup>a</sup>
5	E2	6,92 ± 0,67 <sup>b</sup>	5,67 ± 0,78 <sup>a</sup>	5,50 ± 0,80 <sup>ab</sup>	6,50 ± 0,67 <sup>e</sup>	4,83 ± 0,58 <sup>b</sup>	2,08 ± 0,79 <sup>a</sup>
8	E1	6,67 ± 0,65 <sup>b</sup>	5,75 ± 0,87 <sup>a</sup>	5,67 ± 0,65 <sup>ab</sup>	5,58 ± 0,79 <sup>bc</sup>	5,08 ± 0,67 <sup>bc</sup>	2,17 ± 0,58 <sup>a</sup>
8	E2	7,08 ± 0,67 <sup>b</sup>	5,50 ± 1,00 <sup>a</sup>	5,67 ± 0,65 <sup>ab</sup>	5,83 ± 0,72 <sup>cd</sup>	5,33 ± 0,65 <sup>bc</sup>	2,08 ± 0,79 <sup>a</sup>

Promedios y desviaciones estándar correspondientes a 12 réplicas.

E1: quesos con adición de probióticos en forma liofilizada; E2: quesos con adición de probióticos en el SLG; T: quesos sin adición de fermentos probióticos.

Cepas probióticas utilizadas en los diferentes ensayos: 1: *Lactobacillus acidophilus* A; 2: *Lactobacillus paracasei*; 4: *Bifidobacterium lactis*; 5: *Lactobacillus acidophilus* C;

8: fermento probiótico mixto ensayos 2, 4 y 5.

<sup>a,b,c,d,e</sup>superíndices diferentes dentro de la misma columna indican la presencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Asimismo, *Lactobacillus paracasei* produjo alteraciones significativas en la percepción del sabor de los quesos; los mismos resultaron con un mayor sabor residual, mientras que hubo una menor percepción de “gusto a crema”, siendo la única de las cepas probióticas ensayadas que afectó dichos parámetros (Tabla 13).

Por otro lado, centrándonos en el parámetro gusto ácido, cabe recordar que cuando las cepas probióticas fueron ensayadas en quesos destinados a análisis fisicoquímicos y microbiológicos, aquéllas que produjeron una mayor acidificación con respecto a los quesos T de sus correspondientes ensayos, fueron *Lactobacillus acidophilus* A (queso E2, a los 3 días de maduración), *Lactobacillus acidophilus* B (quesos E1 y E2, a los 60 días) y la combinación de 3 cepas probióticas (queso E2, a los 3 días de maduración) (Tabla 5). Debido al problema de acidificación excesiva encontrado al final de la maduración para ambos quesos E1 y E2 elaborados con *Lactobacillus acidophilus* B, dicho ensayo no se repitió para la realización de pruebas sensoriales. En los dos ensayos donde se habían encontrado diferencias de pH entre quesos E2 y T a los 3 días de maduración, el análisis sensorial descriptivo no detectó diferencias significativas de gusto ácido entre tales quesos (Tabla 13). No obstante, el mismo se llevó a cabo empleando muestras de quesos a los 60 días de maduración, punto en el cual las diferencias de pH mencionadas ya habían desaparecido. Los quesos elaborados con *Bifidobacterium lactis* fueron calificados como menos ácidos, y aquéllos con *Lactobacillus acidophilus* C como más ácidos, con relación a los quesos T, a pesar de no haberse encontrado diferencias de pH entre los quesos análogos, cuando fueron elaborados en ensayos destinados a análisis fisicoquímicos y microbiológicos. Los quesos elaborados con *Lactobacillus paracasei*, cuyos pH no habían sido diferentes de aquéllos elaborados sin bacterias probióticas, no resultaron tampoco más ácidos en el análisis sensorial, a pesar de las diferencias en el gusto a crema y gusto residual encontradas en el mismo.

De cualquier manera, las diferencias encontradas dentro del parámetro gusto ácido, aún cuando fueron significativas, estuvieron acotadas dentro de un rango de poco más de 2 unidades (4,33 - 6,50), y con un mínimo cercano al valor medio de la escala utilizada (entre 1 y 9), por lo que no puede considerarse que se trate de un sabor mucho menos ácido el detectado en los quesos elaborados con *Bifidobacterium lactis*, sino sólo sensiblemente menor al de los quesos T. Del mismo modo, todos los otros parámetros de apariencia, aroma y sabor analizados presentaron rangos que no superaron las 2 unidades.

Un hecho notorio resulta que los quesos elaborados con la mezcla de tres de las cepas probióticas, no presentaron en ningún caso diferencias con los quesos testigo, mientras que las tres cepas utilizadas de manera individual (*Lactobacillus acidophilus* C, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis*) produjeron diferencias significativas en al menos un atributo sensorial (Tabla 13).

Debido a que el aroma de los quesos está influenciado, entre una amplia variedad de compuestos, por la presencia de AGL de cadena corta, se compararon los resultados obtenidos para ambos parámetros (sensorial y fisicoquímico) entre los quesos utilizados en la evaluación sensorial y aquéllos elaborados previamente para realizar los análisis fisicoquímicos. De manera análoga, se realizó la confrontación de los puntajes medios obtenidos para gusto ácido (atributo sensorial) con el pH de cada queso (medida fisicoquímica). Los resultados no se muestran, dado que en ningún caso se pudo verificar la presencia de algún tipo de correlación. Esto, sin embargo, puede explicarse por la influencia de dos factores. Por un lado, como ya dijimos, los rangos encontrados entre las diferentes muestras analizadas, dentro de cada atributo sensorial, fueron muy bajos, lo que conduce a una mayor variabilidad y error al realizar la comparación con una medida de otro tipo (fisicoquímica) y en otro tipo de escala. Por otro lado, ambos tipos de parámetros (sensoriales y fisicoquímicos) fueron determinados en quesos distintos, elaborados, si bien se utilizó la misma metodología, con más de un año de diferencia, lo que puede afectar sus propiedades, debido a la existencia de numerosos factores no controlados.

### 5.1.2. Atributos sensoriales de textura

La Tabla 14 muestra los promedios y las desviaciones estándar correspondientes a la evaluación de diversos parámetros sensoriales de textura, llevada a cabo por el panel de 12 personas utilizado en las determinaciones sensoriales de apariencia, aroma y sabor, y para los mismos quesos. Los valores medios de cada parámetro se compararon mediante ANOVA de una vía, y las diferencias encontradas se consideraron significativas teniendo en cuenta un valor  $P < 0,05$ .

En general, las puntuaciones asignadas al parámetro aspereza fueron bajas (Tabla 14). El ANOVA realizado para este parámetro no arrojó diferencias significativas entre los quesos T y quesos probióticos, si bien hubo ligeras variaciones entre diferentes quesos probióticos entre sí. Todas las muestras, sin embargo, se encontraron dentro de un rango muy estrecho (0,83 unidades).

Los puntajes establecidos para el atributo elasticidad rondaron el valor medio de la escala utilizada, y sólo se encontró una diferencia significativa aislada entre quesos T y experimentales, correspondiente al queso E2 elaborado con *Bifidobacterium lactis*, cuya masa se encontró más elástica.

En cuanto a la cohesividad, se encontraron puntajes mayores a 6 para los quesos T y la mayoría de los experimentales, lo que indica una buena capacidad de la masa para ligarse. Las calificaciones para ambos quesos experimentales con *Lactobacillus paracasei*, así como para el queso E2 elaborado con el fermento probiótico combinado, fueron las únicas tres menores a 6 (aunque aún por encima de 5, el valor medio de la escala utilizada), y todas ellas significativamente menores que en los quesos T, de acuerdo al ANOVA realizado.

El corte, por último, reveló una superficie con irregularidades intermedias (valores cercanos a 5) para los quesos testigo y la mayoría de los quesos con probióticos, siendo la superficie menos irregular en el queso E2 con *Lactobacillus acidophilus*, y más irregular en el queso E2 con *Lactobacillus acidophilus* A.

A grandes rasgos, el análisis sensorial de los atributos de textura reveló, a pesar de las diferencias encontradas en los ANOVA realizados, diferencias muy sutiles entre quesos T y probióticos. Podemos considerar que esto es así, dado que, al igual que para los atributos sensoriales de apariencia, aroma y sabor, los rangos encontrados entre los puntajes asignados a todas las muestras analizadas fueron muy bajos, no llegando a 2 unidades de la escala para ninguno de los atributos de textura estudiados.

**Tabla 14.** Análisis sensoriales descriptivos realizados por un panel entrenado en degustación de quesos, en quesos Pategrás con y sin adición de diversas cepas probióticas. Atributos sensoriales de textura.

Nº de ensayo	Tipo de queso	Elasticidad	Cohesividad	Corte	Aspereza
-	Testigos	4,83 ± 0,94 <sup>a</sup>	6,42 ± 0,67 <sup>d</sup>	4,50 ± 0,67 <sup>b</sup>	2,75 ± 0,62 <sup>abc</sup>
1	E1	5,00 ± 0,95 <sup>a</sup>	6,17 ± 0,83 <sup>cd</sup>	4,75 ± 0,75 <sup>bc</sup>	3,17 ± 0,58 <sup>bc</sup>
1	E2	4,58 ± 0,67 <sup>a</sup>	6,08 ± 0,79 <sup>bcd</sup>	5,33 ± 0,78 <sup>c</sup>	3,25 ± 0,75 <sup>b</sup>
2	E1	4,92 ± 0,90 <sup>a</sup>	5,50 ± 0,80 <sup>ab</sup>	4,83 ± 1,03 <sup>bc</sup>	2,42 ± 0,51 <sup>a</sup>
2	E2	5,00 ± 0,74 <sup>a</sup>	5,17 ± 0,72 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,98 <sup>ab</sup>	2,83 ± 0,83 <sup>abc</sup>
4	E1	5,08 ± 0,90 <sup>a</sup>	6,50 ± 0,90 <sup>d</sup>	4,50 ± 0,80 <sup>b</sup>	2,58 ± 0,51 <sup>a</sup>
4	E2	6,42 ± 0,79 <sup>b</sup>	6,42 ± 0,67 <sup>d</sup>	4,33 ± 0,65 <sup>ab</sup>	2,91 ± 0,67 <sup>abc</sup>
5	E2	4,58 ± 0,79 <sup>a</sup>	6,33 ± 0,89 <sup>cd</sup>	3,83 ± 0,94 <sup>a</sup>	2,83 ± 0,83 <sup>abc</sup>
8	E1	4,83 ± 0,72 <sup>a</sup>	6,50 ± 0,67 <sup>d</sup>	4,42 ± 0,79 <sup>ab</sup>	2,83 ± 0,72 <sup>abc</sup>
8	E2	4,67 ± 0,89 <sup>a</sup>	5,75 ± 0,87 <sup>abc</sup>	4,67 ± 0,65 <sup>b</sup>	2,67 ± 0,65 <sup>ab</sup>

Promedios y desviaciones estándar correspondientes a 12 réplicas.

E1: quesos con adición de probióticos en forma liofilizada; E2: quesos con adición de probióticos en el SLG; T: quesos sin adición de fermentos probióticos.

Cepas probióticas utilizadas en los diferentes ensayos: 1: *Lactobacillus acidophilus* A; 2: *Lactobacillus paracasei*; 4: *Bifidobacterium lactis*; 5: *Lactobacillus acidophilus* C; 8: fermento probiótico mixto ensayos 2, 4 y 5.

<sup>a,b,c,d</sup>superíndices diferentes dentro de la misma columna indican la presencia de diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

El nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6), pH isoelectrico de las caseínas, es un valor representativo del nivel de proteólisis primaria que sufren los quesos a lo largo de su maduración, la cual puede afectar notablemente su textura. Dado que el NS-pH 4,6 había sido cuantificado en un trabajo complementario al mostrado en la presente Tesis, para todos los quesos elaborados previamente y destinados al análisis fisicoquímico, se enfrentaron estos resultados con los obtenidos para los cuatro atributos sensoriales de textura, en los quesos análogos destinados al análisis sensorial. Los resultados no se muestran dado que, al igual que lo sucedido para las comparaciones realizadas entre gusto ácido y pH, y aroma y AGL de cadena corta, no se encontraron correlaciones de ninguna naturaleza. Nuevamente, como en el caso anterior, el hecho de que los rangos encontrados para el mismo atributo de textura entre diferentes muestras hayan sido muy

pequeños en valor absoluto, y que los quesos utilizados para realizar las comparaciones se hayan elaborado con más de un año de diferencia, podría enmascarar la presencia de algún tipo de correlación.

## 5.2. Análisis sensoriales de aceptabilidad

Los análisis de aceptabilidad se realizaron con el objetivo de determinar, por un lado, si los quesos Pategrás elaborados de manera tradicional (quesos testigo) resultaban del agrado, y en qué medida, de gente no entrenada en análisis sensorial, utilizando para la encuesta un grupo lo suficientemente numeroso (limitado principalmente por la cantidad de muestras de queso disponibles) como para resultar representativo del consumidor promedio, dentro de la población en general.

Por otro lado, se elaboraron quesos experimentales con algunas de las cepas probióticas previamente utilizadas, elegidas en base a criterios de selección de al menos una de cada grupo microbiano, y el fermento mixto. De esta manera, se analizaron los resultados en el sentido de detectar posibles diferencias de aceptabilidad, ya sean positivas o negativas, debidas a la adición de probióticos. Los quesos utilizados para los análisis de aceptabilidad correspondieron a los ensayos 1 y 8 (quesos E1 y E2), y 2 y 4 (sólo quesos E1). Se realizaron en total tres ensayos destinados a este análisis; el esquema utilizado puede verse en la Tabla 15. Dada la limitación en la cantidad de elaboraciones de quesos destinadas al análisis sensorial, se decidió elaborar un solo tipo de queso experimental (E1) en el tercer ensayo de aceptabilidad, con el propósito de priorizar el estudio de dos cepas probióticas muy diferentes (*Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis*) en vez de una, empleando la metodología más simple para su adición, la cual además, tal como se discutirá mas adelante, resultó ventajosa por varias razones.

Las opiniones de la gente encuestada, de acuerdo a opciones de aceptabilidad prefijadas, se transformaron en una escala numérica con un mínimo de 1 y un máximo de 9, mediante la utilización de una escala hedónica (ver sección *Materiales y Métodos*, Tabla 4). A su vez, teniendo en cuenta la cantidad de gente que eligió cada opción, se calcularon los promedios ponderados para las diferentes muestras, y los resultados se muestran en la Tabla 15. Debido a que se realizaron tres elaboraciones de quesos en forma independiente, en diferentes días, y a que en cada ensayo se elaboraron dos quesos probióticos y un queso testigo correspondiente, los resultados se presentan en

forma independiente para las tres elaboraciones, para así minimizar el error causado por la presencia de factores de variabilidad no controlados entre los diferentes ensayos.

La comparación de los promedios ponderados entre los quesos testigo de los diferentes ensayos, muestra una diferencia muy pequeña entre los mismos, siendo los valores mínimo y máximo iguales a 6,55 y 6,83, con un rango menor a 0,4 unidades (Tabla 15). Dentro de una escala donde una unidad representa la diferencia entre una opinión y la siguiente, ésta diferencia resulta ínfima, por lo que suponemos que el factor ensayo no provocó un error apreciable en la aceptabilidad de los quesos elaborados. El valor absoluto que se observa refleja una opinión, en general, mejor que la correspondiente al valor 6: “me gusta poco”, y más cercana al valor 7: “me gusta moderadamente”.

**Tabla 15.** Puntajes medios ponderados obtenidos en ensayos sensoriales de aceptabilidad, para quesos Pategrás con y sin adición de diversas cepas de bacterias probióticas, a los 60 días de maduración. El promedio ponderado se calculó mediante la sumatoria de los puntajes asignados a cada opinión por el número de personas que eligió dicha opinión, sobre el total de personas encuestadas.

1° prueba de aceptabilidad	Testigo	Ensayo 1 – E1	Ensayo 1 – E2
	6,70	6,69	6,65
2° prueba de aceptabilidad	Testigo	Ensayo 8 – E1	Ensayo 8 – E2
	6,55	6,14	6,43
3° prueba de aceptabilidad	Testigo	Ensayo 4 – E1	Ensayo 2 – E1
	6,83	6,86	6,65

Escala hedónica utilizada: 1: me disgusta muchísimo; 2: me disgusta mucho; 3: me disgusta moderadamente; 4: me disgusta poco; 5: me resulta indiferente; 6: me gusta poco; 7: me gusta moderadamente; 8: me gusta mucho; 9: me gusta muchísimo.

E1: quesos con adición de probióticos en forma liofilizada; E2: quesos con adición de probióticos en el SLG; T: quesos sin adición de fermentos probióticos.

Cepas probióticas utilizadas en los diferentes ensayos: 1: *Lactobacillus acidophilus* A; 2: *Lactobacillus paracasei*; 4: *Bifidobacterium lactis*; 8: fermento probiótico mixto ensayos 2, 4 y 5.

Con respecto a los quesos con adición de bacterias probióticas, se observa que cuando se utilizaron *Lactobacillus acidophilus* A (para ambas metodologías de adición),

*Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis* en forma individual, resultaron quesos con una aceptabilidad prácticamente igual a la de los quesos testigo, con valores mínimo (6,65) y máximo (6,86) similares, que determinaron un rango también muy estrecho (Tabla 15). Los quesos elaborados con el fermento probiótico mixto tuvieron puntajes algo menores, en especial cuando la metodología de adición fue en forma liofilizada. En este caso, sin embargo, y al igual que para los quesos testigo, ambos promedios ponderados se encontraron en valores intermedios a los correspondientes a las opiniones “me gusta poco” y “me gusta moderadamente”.

Otra manera de visualizar los resultados es a través del análisis de los histogramas de frecuencia de cada opinión posible. Los porcentajes de personas encuestadas que eligió cada opción se muestran en las Figuras 21, 22 y 23, en forma independiente para la primera, segunda y tercera evaluación de aceptabilidad, respectivamente.

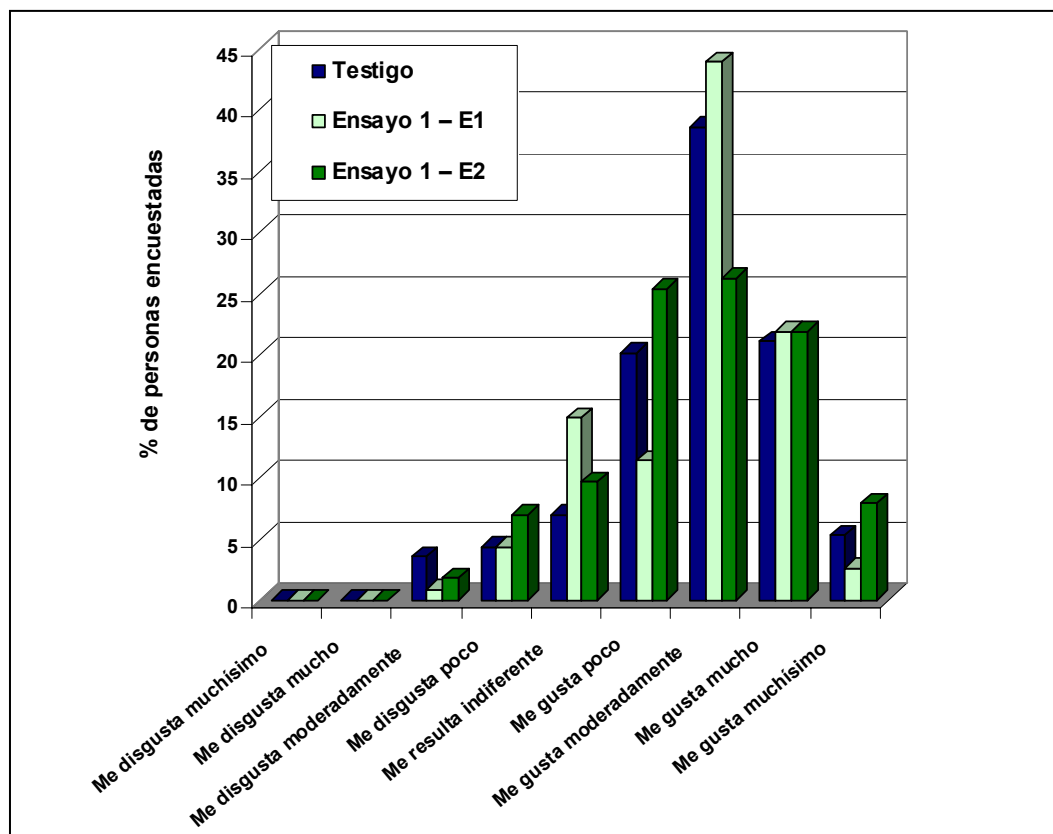
### 5.2.1. Primera prueba de aceptabilidad

La Figura 21 muestra que tanto para los quesos elaborados con *Lactobacillus acidophilus* A (independientemente de su metodología de adición) como para el queso testigo correspondiente, la opción más elegida fue “me gusta moderadamente”. Es importante destacar que no se registraron casos de ninguna de las dos opciones más desfavorables, en el extremo izquierdo del histograma, para ninguno de los tres quesos. Además, la opción negativa siguiente, “me disgusta moderadamente”, presentó un porcentaje mayor en el queso testigo que en los experimentales. Por otro lado, al analizar los patrones de distribución, se observa que la misma es aproximadamente normal, con un sólo máximo, para los quesos testigo y E2. Sin embargo, para el queso E2 aparece un nivel de heterogeneidad en las respuestas visiblemente mayor, con un elevado porcentaje alejado de la media; el mismo fue, por ejemplo, el queso más tildado con la opción positiva extrema “me gusta muchísimo”. El queso E1, por otro lado, presenta dos máximos en la distribución, lo que sugiere que dentro del grupo de 114 personas encuestadas, existen dos subgrupos con diferentes preferencias, al menos para este queso en particular (Figura 21). Si consideramos una aceptabilidad “negativa”, “neutral” o “positiva” a aquella obtenida a partir de la sumatoria de las respuestas [1-4], [5] y [6-9], respectivamente, los resultados son muy buenos tanto para quesos con y sin adición de probióticos, dado que en todos los casos obtuvimos porcentajes de



aceptabilidad positiva de al menos un 80% (85,2%, 79,8% y 81,5% para quesos testigo, E1 y E2, respectivamente).

**Figura 21.** Ensayo sensorial de aceptabilidad de quesos Pategrás con adición de *Lactobacillus acidophilus* A (Ensayo 1, E1 y E2) y sin adición de probióticos (Testigo). En la encuesta participaron 114 personas no entrenadas en degustación de quesos.



E1: quesos con adición de probióticos en forma liofilizada; E2: quesos con adición de probióticos en el SLG

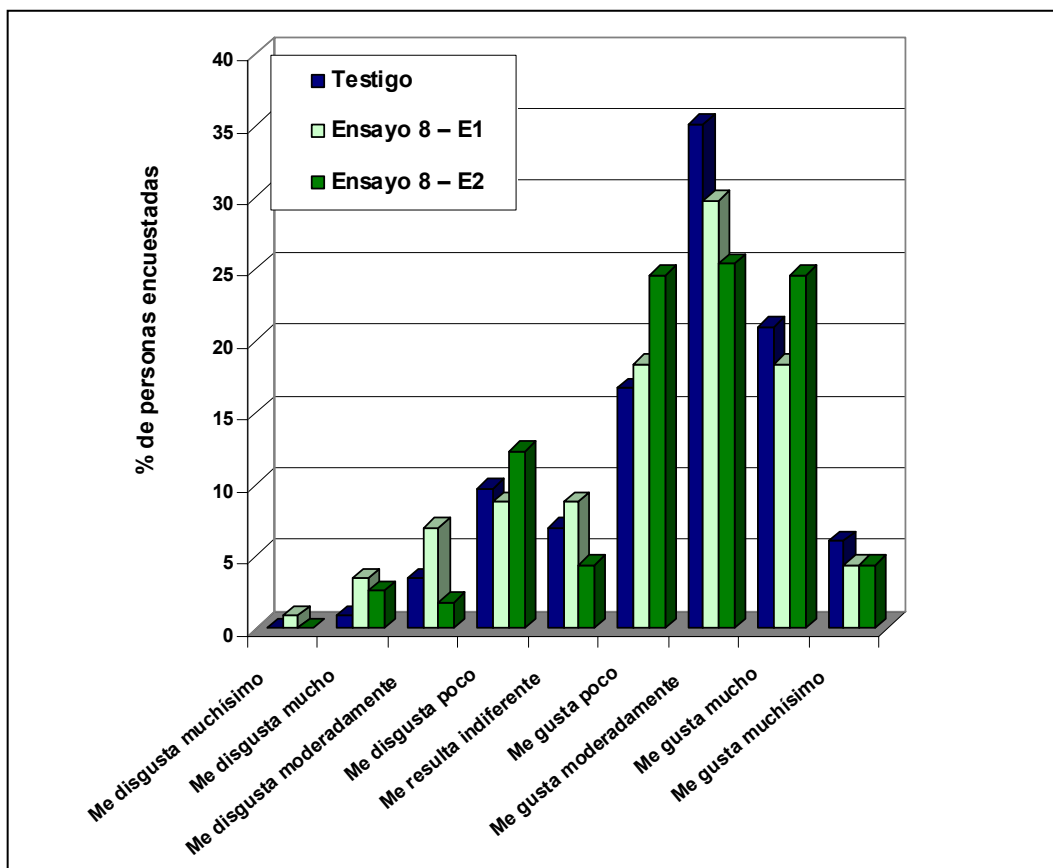
### 5.2.2. Segunda prueba de aceptabilidad

La segunda evaluación de aceptabilidad, realizada utilizando quesos elaborados con la adición de la mezcla de cultivos probióticos por ambas metodologías (E1 y E2) y su testigo correspondiente, mostró, al igual que la primera, una frecuencia máxima para la opción “me gusta moderadamente”, en todos los quesos (Figura 22).

En este caso, sin embargo, las distribuciones de frecuencia fueron diferentes, observándose para los tres una curva bimodal, con dos máximos. El máximo secundario

coincidió, en todos los quesos, con la opción “me disgusta poco”. Este resultado apoya la hipótesis, surgida para los quesos E1 de la primera prueba de aceptabilidad, de la presencia de dos subgrupos con diferentes preferencias, dentro del total de personas encuestadas. Por este motivo, entre otros, si bien las tres pruebas de aceptabilidad se realizaron separadas por períodos de tiempo no menores a un mes, es importante destacar el hecho haber utilizado siempre el mismo grupo de personas.

**Figura 22.** Ensayo sensorial de aceptabilidad de quesos Pategrás con adición del fermento probiótico mixto (Ensayo 8, E1 y E2) y sin adición de probióticos (Testigo). En la encuesta participaron 114 personas no entrenadas en degustación de quesos.



E1: quesos con adición de probióticos en forma liofilizada; E2: quesos con adición de probióticos en el SLG

Tal como se observó en la Tabla 15, los promedios ponderados para los quesos experimentales de esta prueba fueron algo menores a los observados para el queso

testigo, en especial para la variedad E1. Estas ligeras diferencias podrían explicarse, de acuerdo a la distribución de frecuencias (Figura 22), no por un porcentaje menor de personas que haya calificado a la variedad E1 con las opciones “altamente” positivas (“me gusta mucho” o “me gusta muchísimo”), sino por una mayor cantidad de personas cuyas opiniones fueron negativas (llegando a opinar “me disgusta muchísimo”), en detrimento de calificaciones neutrales o “levemente” positivas (“me gusta poco” o “me gusta moderadamente”). En efecto, para la variedad E1 se encontraron los máximos porcentajes de aceptabilidad negativa de todos los ensayos (20,2%), mientras que el porcentaje correspondiente a una aceptabilidad positiva, si bien aún resultó moderadamente bueno, fue casi un 10 por ciento menor (71%) comparado con los quesos testigo y E2 del mismo ensayos, ambos rondando el 80%.

### 5.2.3. Tercera prueba de aceptabilidad

La última evaluación de aceptabilidad se realizó entre quesos elaborados con *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium lactis* (ambos quesos E1), y el queso testigo correspondiente. Los histogramas de frecuencia se muestran en la Figura 23.

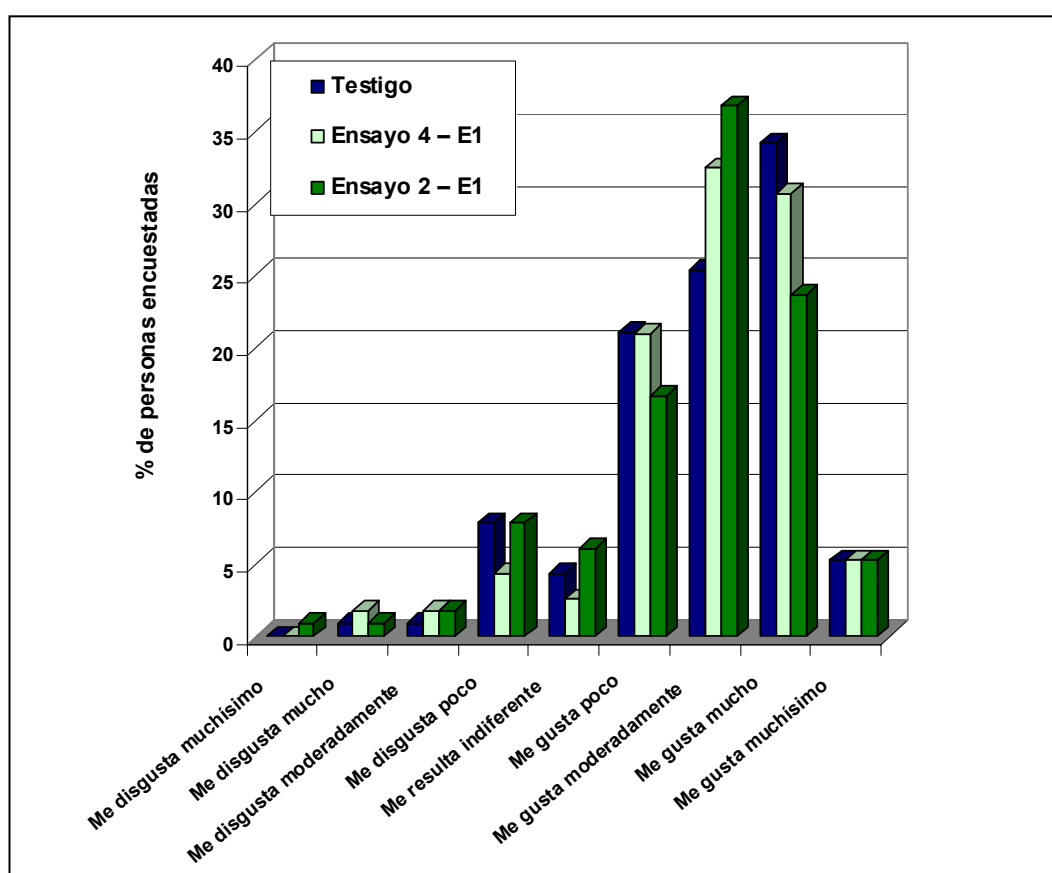
De igual manera que para los tres quesos de la segunda evaluación, en el tercer ensayo se encontraron distribuciones bimodales para las tres muestras, lo que reafirma aún más la hipótesis planteada acerca de la presencia de dos subgrupos con preferencias distintas dentro del total de gente encuestada. Nuevamente, el máximo menor fue para la opción “me gusta poco”. Sin embargo, a pesar de que ambos quesos probióticos presentaron su máximo absoluto en “me gusta moderadamente”, el mismo correspondió a la opción “me gusta mucho” en el queso testigo. Este es un ejemplo de las diferencias observadas en los patrones de distribuciones de frecuencias entre los quesos testigo de los diferentes ensayos, a pesar de que, como dijimos anteriormente, los promedios ponderados fueron prácticamente iguales entre ellos. Esto remarca la importancia de realizar los análisis de cada ensayo en forma independiente.

Los porcentajes de aceptabilidad positiva fueron los mayores dentro de todos los ensayos, alcanzando el queso E1 con *Bifidobacterium lactis* un porcentaje del 89,5%. Asimismo, los valores de 86% y 82,5% correspondientes a quesos testigo y E1 con *Bifidobacterium lactis*, respectivamente, fueron también muy elevados.

Arribados a este punto, luego de realizar un análisis en forma minuciosa y de manera independiente para las diferentes pruebas, se remarcaron ciertas diferencias sutiles. Sin embargo, es necesario recordar que, a grandes rasgos, las diferencias

encontradas en la aceptabilidad (tanto entre ensayos como dentro de cada uno) fueron pequeñas, dado que como dijimos anteriormente, todos los promedios ponderados se encontraron en un rango entre 6 y 7, y la mínima aceptabilidad positiva registrada, para el queso E1 con la mezcla de fermentos probióticos, fue media-alta (71%).

**Figura 23.** Ensayo sensorial de aceptabilidad de quesos Pategrás con adición de *Bifidobacterium lactis* (Ensayo 4, E1), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Ensayo 2, E1) y sin adición de probióticos (Testigo). En la encuesta participaron 114 personas no entrenadas en degustación de quesos.



E1: quesos con adición de probióticos en forma liofilizada.

## **5. Discusión**

## 1. Fundamentos de los diferentes tipos de adición del fermento probiótico.

En el presente trabajo de Tesis se planteó la adición de bacterias probióticas al queso Pategrás Argentino, el queso semiduro más importante en cuanto a volumen de producción, dentro de los que son elaborados en nuestro país. Dicha adición fue diseñada a través de dos protocolos diversos, aunque en ambas acompañando el agregado de un fermento primario no probiótico.

Existen estudios anteriores que informan sobre la fabricación de quesos usando probióticos como fermento único, y en los cuales se logra una acidificación similar a la del proceso tradicional, por ejemplo en queso Gouda, donde Gomes y col. (1995) han ensayado exitosamente diferentes inóculos de *Bifidobacterium* sp. Bo y *Lactobacillus acidophilus* Ki, dos cepas probióticas reconocidas. Sin embargo, en dicho trabajo se necesitaron inóculos muy elevados para alcanzar niveles de acidificación apropiados. Por otro lado, la suplementación de la leche de elaboración con hidrolizado de leche, promotor del crecimiento de las bifidobacterias, contribuyó a la generación de sabores indeseables, que afectaron la calidad organoléptica de los quesos, entre otras cosas por la mayor producción de ácido acético (Gomes y col., 1995). De cualquier manera, en la mayoría de los quesos probióticos desarrollados, dichos fermentos han sido adicionados en forma suplementaria al proceso fermentativo tradicional, el cual es llevado a cabo por bacterias lácticas no probióticas (Dinakar y Mistry, 1994; Roy y col., 1998; Gardiner y col., 1999; Kasimoğlu y col., 2004; Songisepp y col., 2004).

De las dos metodologías utilizadas en nuestro trabajo, la primera de ellas supuso el agregado directo del cultivo probiótico liofilizado a la tina quesera, previa resuspensión en una alícuota de la leche de elaboración. El éxito esperado a través del empleo de esta metodología estuvo soportado en el uso de cultivos comerciales liofilizados; los mismos vienen ya preparados por las empresas proveedoras, de manera tal de poder realizar una adición en la tina quesera simple, directa y rápida, conservando a la vez una excelente capacidad de crecimiento bacteriano, o al menos supervivencia, durante el proceso de manufactura. En este caso, por lo tanto, se buscó priorizar la practicidad y conveniencia del proceso, pensando especialmente en una futura aplicación industrial.

Por otro lado, y como ya se explicó en detalle en la *Introducción*, un punto crítico en el desarrollo de alimentos con fermentos probióticos implica lograr una supervivencia elevada de los mismos en el producto, durante un tiempo no inferior al máximo calculado entre su elaboración y su consumo. Es por ello que se han empleado estrategias para mejorar esta supervivencia. Aquélla de más fácil aplicación consiste en

el desarrollo de una fermentación en dos pasos: se comienza con la adición de las bacterias probióticas, y el agregado del fermento primario se lleva a cabo recién cuando la primera fermentación ya ha tenido lugar (Shah, 2000). Este razonamiento dio lugar, en el presente trabajo, al agregado de las cepas probióticas a los quesos previa incubación en un sustrato lácteo especialmente diseñado para tal fin. La elevada composición en materia grasa de dicho sustrato generaría potencialmente una protección de la viabilidad bacteriana en el queso. Se debe tener en cuenta que la preincubación de las bacterias fue hecha en un medio distinto (SLG) al cual se desarrollarían finalmente (leche de elaboración), pero de cualquier manera el cambio de un medio a otro se realizó cuando el cultivo se encontraba en fase estacionaria de crecimiento, etapa que se asocia con una mejor adaptación a las condiciones adversas del nuevo medio (Heller y col., 2003).

De esta manera, la segunda metodología de adición, que debido a la incubación en un sustrato lácteo implica más etapas previas de preparación, se ensayó principalmente para ver si se ejercía un efecto positivo significativo sobre la supervivencia de los probióticos. Por otro lado, tal beneficio debería ser significativo, de manera de compensar las desventajas de la utilización de esta metodología, más impráctica y cara desde el punto de vista industrial.

Un punto importante a tener en cuenta es la acidificación excesiva que podría tener lugar si, además de la actividad del fermento tradicional, se suma el efecto de una cepa probiótica muy acidificante. En este sentido, dado que tratándose de un alimento funcional se debe priorizar la supervivencia de las bacterias probióticas en el producto, se ha propuesto la reducción del inóculo del fermento primario, aunque tal desbalance podría afectar los procesos fisicoquímicos que ocurren durante la maduración (McBrearty y col., 2001). En nuestro trabajo se planteó la adición de inóculos de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> en la leche de elaboración, tanto para los fermentos primario y probiótico, en la medida en que no se produjera una acidificación excesiva durante la incubación del SLG. Dicha acidificación fue muy variable de acuerdo a la cepa en cuestión, llegando a representar un problema para dos de las tres cepas de *Lactobacillus acidophilus* ensayadas (B y C). Para minimizar este efecto, se empleó la mitad del inóculo del fermento primario en los ensayos correspondientes (3, 5 y 8), siendo el ensayo 8 aquel con el fermento probiótico mixto, que incluía la cepa *Lactobacillus acidophilus* C.

Todas las cepas utilizadas en el presente estudio mantuvieron una viabilidad elevada, durante el período de incubación y almacenamiento del SLG. Un incremento

en los niveles de probióticos durante la preincubación se considera potencialmente beneficioso, ya que representa un mayor inóculo probiótico en el queso y hace prever una supervivencia mejorada durante la maduración (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

El crecimiento de las cepas de lactobacilos en general, fue algo mayor que en el caso de la cepa de bifidobacteria ensayada. Esto puede deberse a que la mayor capacidad proteolítica presente en lactobacilos, les permite una mayor degradación de las caseínas y un mejor desarrollo celular (Vassal, 1996; Boylston y col., 2004). Las bifidobacterias, en cambio, carecen de una actividad proteolítica significativa (Boylston y col., 2004), sumado al hecho de la escasa cantidad de aminoácidos libres y oligopéptidos presentes en leche. Además, la presencia de metabolitos con efecto antimicrobiano, tales como diversos ácidos (Heller, 2001) está asociada a una menor supervivencia de bacterias probióticas en productos lácteos. La sensibilidad de estas bacterias a la acidez ha demostrado ser altamente dependiente de la cepa (Shah, 2000). En el caso de las bifidobacterias, el menor crecimiento observado en el SLG podría estar relacionado con la producción de ácido acético, producto de su metabolismo (Desjardins y col., 1990; Gomes y col., 1995; Blanchette y col., 1996). Dado que la incubación del SLG se realizó en presencia de oxígeno, el hecho de que las bifidobacterias mantuvieran una elevada viabilidad y actividad, sugiere que la cepa estudiada es aerotolerante (Boylston y col., 2004). A pesar del menor crecimiento observado para las bifidobacterias en el SLG en el presente trabajo, el empleo de sólo una cepa de bifidobacterias no permite realizar una extrapolación de los resultados, debido a la gran variación en la actividad metabólica entre especies y cepas (Boylston y col., 2004).

## **2. Composición de los quesos**

Cuando se pretende analizar la influencia de la presencia o no de fermentos adjuntos en quesos (en este trabajo, las cepas probióticas ensayadas), sobre parámetros fisicoquímicos tales como la liberación de ácidos grasos durante la maduración, o los cambios en las concentraciones de azúcares o colesterol, se vuelve un requisito indispensable la determinación de la composición global y del valor de pH. Estos análisis permiten comprobar que las condiciones en el medio ambiente del queso sean similares entre muestras con diferentes fermentos, y de esta manera asegurar que, de encontrarse luego diferencias en los parámetros antes mencionados, las mismas se deban exclusivamente a la actividad del fermento utilizado.



En efecto, tanto la supervivencia como la actividad de los diferentes cultivos, probióticos o no, están condicionadas por las condiciones del medio. La presencia de diferencias en la composición podría tanto encubrir como potenciar resultados (Hunter y col., 1997; Shakeel-Ur-Rehman y col., 2001). Efectivamente, el contenido de humedad, la fuerza iónica, determinada principalmente por el contenido de cloruro de sodio, y el pH, son tres factores que influyen y determinan en gran medida toda actividad enzimática, incluyendo las enzimas bacterianas responsables del metabolismo de los triglicéridos, el colesterol y los azúcares. De esta manera, diferencias en el contenido de materia grasa entre diferentes quesos, podrían enmascarar supuestas diferencias entre los mismos; existe evidencia de una mayor liberación de AGL en quesos con mayor contenido graso (Collins y col., 2004).

El hecho de no haber existido diferencias significativas en cuanto al contenido de humedad, cloruro de sodio y porcentaje de materia grasa y proteínas, indica que el modelo experimental utilizado en el presente trabajo resultó reproducible, y por lo tanto adecuado para el análisis de la influencia de las cepas probióticas ensayadas sobre las transformaciones de la materia grasa y los azúcares. Además, aún realizando una comparación entre ensayos diferentes, los rangos obtenidos en la determinación de la composición mayoritaria fueron bastante estrechos, a pesar de que todo el esquema de elaboraciones consumió 2 años y 4 meses, lo que da una idea de que el proceso de manufactura fue correcto y repetitivo.

Algunos autores encontraron que, al realizar elaboraciones de quesos con y sin adición de bacterias probióticas a escala laboratorio (25 y 10 L) (Gardiner y col., 1998; Ong y col., 2007a), era frecuente encontrar variaciones en parámetros de composición global entre ellos. Gardiner y col. (1998) atribuyeron estas diferencias al pequeño volumen de leche empleado y, efectivamente, corroboraron que al realizar las elaboraciones utilizando los mismos fermentos pero con un volumen de 450 L de leche, aquellas diferencias desaparecían. En el presente trabajo se trabajó con una escala intermedia entre aquellas (45 L), y se obtuvo una reproducibilidad suficiente para el análisis de los resultados correspondientes al resto de los análisis.

En relación al pH de los quesos con agregado de bacterias probióticas, la presencia de diferencias con respecto a los quesos elaborados de manera tradicional se encontró solamente en tres ensayos. Dos de ellos correspondieron a dos de las tres cepas de *Lactobacillus acidophilus* (A y B) ensayadas en forma individual (ensayos 1 y 3, respectivamente), y al ensayo con el fermento probiótico mixto (ensayo 8). En este

último caso, si bien las cepas utilizadas no produjeron una disminución en el pH de los quesos cuando se utilizaron en forma individual (ensayos 2, 4 y 5), y no incluían las cepas *Lactobacillus acidophilus* A y B que sí lo hicieron, el efecto se debería probablemente a un efecto aditivo y/o sinérgico cuando las tres cepas se utilizaron combinadas. De cualquier manera, en los ensayos 1 y 8 las diferencias se encontraron sólo al inicio de la maduración, desapareciendo ya hacia los 30 días, por lo que su influencia en las transformaciones de la materia grasa y los azúcares no sería importante. Contrariamente, en el ensayo 3 (*Lactobacillus acidophilus* B), las diferencias fueron evidentes recién hacia el final de la maduración, lo que podría haber tenido cierta influencia sobre la actividad de las enzimas presentes y, por consiguiente, en la expresión bioquímica de las bacterias probióticas. Precisamente en el ensayo 3, se empleó la mitad de la dosis del fermento primario utilizada normalmente en los demás ensayos, dado que a partir del seguimiento del pH durante la incubación del SLG con *Lactobacillus acidophilus* B, se conocía la elevada actividad acidificante de esta cepa. Debido a esto, si bien los quesos experimentales del ensayo 3 tuvieron un pH significativamente menor que el queso testigo de ese mismo ensayo, los pH de los tres quesos del ensayo 3 fueron similares (o aún ligeramente superiores) a sus análogos en los restantes siete ensayos.

Se sabe que la alteración del pH en el queso es, además, muy susceptible de impactar sensible y negativamente en la textura del queso, ya que produce modificaciones en el estado del calcio, el cual tiene un papel fundamental en la estructura de la matriz del queso, estando presente en las uniones de las micelas de caseína entre sí (Watkinson y col., 2001; Pastorino y col., 2003; Fox y McSweeney, 2004). A partir de este fenómeno, un queso con una acidificación excesiva sufriría el defecto de “arricotamiento”, con características reológicas indeseables (Watkinson y col., 2001; Pastorino y col., 2003).

Dentro de una numerosa lista de trabajos realizados sobre quesos elaborados con y sin adición de bacterias probióticas, se encuentran resultados discordantes en cuanto al impacto de las mismas sobre el pH del producto. Por un lado, se encontró que dichos fermentos probióticos no tuvieron ningún impacto sobre la composición global ni sobre el pH (Daigle y col., 1999; Gardiner y col., 1999; Corbo y col., 2001; Kasimoğlu y col., 2004). Inversamente, varios autores determinaron que el pH de los quesos resultaba significativamente menor cuando se encontraban presentes bacterias probióticas, debido a una que su capacidad de acidificación se sumaba a la del fermento primario (Gobbetti

y col., 1998; El-Zayat y Osman, 2001; McBrearty y col., 2001; Ong y col., 2006). Un hecho notorio resulta que, en uno de estos trabajos, la presencia de una cepa de *Bifidobacterium lactis* muy acidificante provocó una sinéresis incorrecta durante el proceso de manufactura de los quesos, y por lo tanto los mismos mostraron, además de un pH muy bajo, un contenido de humedad mayor al normal (McBrearty y col., 2001).

Comparando la evolución del pH entre quesos del mismo tipo entre ensayos distintos, se encuentra una variabilidad más alta entre los quesos sin bacterias probióticas, lo que podría ser consecuencia de la presencia de una microbiota más heterogénea, representada en gran proporción por miembros de las bacterias lácticas no pertenecientes al fermento (NSLAB). Efectivamente, en los quesos testigo del presente trabajo las NSLAB se encontraron en concentraciones menores pero cercanas a las del fermento primario, especialmente hacia el final de la maduración. La flora NSLAB proviene de contaminaciones sobre superficies y utensilios empleados en la elaboración de quesos y, en quesos fabricados con leche pasteurizada, de cepas autóctonas presentes en leche que sobreviven a la pasteurización. En dichos quesos, se han indicado como el principal factor responsable de la incostancia en la calidad y composición (Hynes y Bergamini, 2004). Zalazar y col. (1979), por otro lado, observaron que los cambios de pH a lo largo de la maduración fueron variables entre quesos Pategrás elaborados en días diferentes.

Por otro lado, el pH de los quesos con bacterias probióticas mostró, tanto cuando su adición se llevó a cabo en forma liofilizada como previa incubación en el SLG, patrones evolutivos similares durante la maduración, entre diferentes ensayos. Esto puede deberse a la presencia de cepas puras de los lactobacilos que, adicionados como fermentos adjuntos, estuvieron presentes en concentraciones muy altas, dominando junto al fermento primario el ecosistema del queso, en lugar de poblaciones heterogéneas de lactobacilos (y otras especies) desarrolladas a lo largo de la maduración como flora NSLAB. Asimismo, en el ensayo 4, en donde en lugar de lactobacilos se utilizó una bifidobacteria probiótica (las bifidobacterias no constituyen flora NSLAB) la evolución del pH fue notoriamente diferente del resto de los ensayos, para ambos tipos de quesos experimentales.

Dentro de los quesos experimentales, aquéllos con adición de probióticos previa incubación en el SLG (E2) mostraron un menor cambio de pH a lo largo del período de maduración, en relación a cuando fueron adicionados directamente liofilizados (E1). Este hecho parece indicar que cuando las bacterias probióticas se adicionan luego de la

preincubación en el SLG poseen, debido a la etapa de crecimiento en que se encuentran, una actividad metabólica mayor, por lo cual podrían metabolizar los azúcares residuales de manera muy rápida, bajando el pH ya desde el comienzo de la maduración (Williams y col., 2002).

Diversos parámetros que son usualmente determinados en quesos, entre ellos el pH, pueden presentar variaciones de acuerdo a la zona de donde se toma la muestra, en especial de acuerdo a la distancia de la misma con respecto a la superficie (Noomen, 1977; Fallico y col., 2004; Verdini y col., 2004). Las variaciones surgen, principalmente, por el gradiente de sal que se genera cuando el proceso de salado se realiza sumergiendo los bloques enteros de quesos en salmuera. Ciertamente, durante y luego de finalizado este proceso, la sal se encuentra en concentraciones muy elevadas en las zonas superficiales, y la concentración tiende a decrecer hacia el centro. Estas diferencias tienden a desaparecer a lo largo del período de maduración, durante el cual se produce la difusión de la sal, impulsada por el gradiente de concentraciones existente. La concentración de sal puede influir notablemente en el desarrollo de las bacterias lácticas, y su capacidad de acidificación (Noomen, 1977). Las mismas pueden consumir pequeñas cantidades de lactosa residuales y de esta manera originan variaciones sutiles de pH durante la maduración del queso, en especial los primeros días luego de la elaboración (Fox, 2003). De esta manera, un mismo queso puede presentar variaciones tanto espaciales como temporales de pH, así como variaciones entre réplicas del mismo queso elaboradas en días diferentes. Es normal encontrar que se reste importancia a este efecto, el cual podría haber influido significativamente en los resultados que se han discutido precedentemente, por lo que debería prestarse mayor atención en estudios futuros.

### **3. Análisis microbiológicos**

En la mayoría de los trabajos realizados sobre quesos probióticos se han empleado fermentos mesófilos, normalmente lactococos, como fermento primario de acidificación. El medio ambiente del queso presenta condiciones que resultan adversas para el normal desarrollo de estos microorganismos a lo largo de la maduración, entre los que podemos mencionar como más importantes a la ausencia de hidratos de carbono fermentables, bajo pH, alta concentración de sal y temperaturas relativamente bajas. Estos factores causan normalmente el descenso de las poblaciones del fermento primario, debido a su muerte, con probable lisis celular, durante el período de

maduración (Gardiner y col., 1998; Roy y col., 1998; Kasimoğlu y col., 2004; Ong y col., 2007a). Es perfectamente conocido el hecho de que la presencia de dos o más poblaciones bacterianas diferentes en un mismo ambiente, experimentan indefectiblemente interacciones, las cuales pueden ser positivas, neutrales o negativas (Ray, 2001). En este sentido, se ha postulado que, generalmente, la lisis del fermento primario resulta positiva para el desarrollo de cultivos adjuntos (Thomas, 1987).

En el presente trabajo se utilizó *Streptococcus thermophilus* como fermento primario; dichos microorganismos son termófilos, al igual que la mayoría de las especies bacterianas utilizadas como cultivos iniciadores en nuestro país. A diferencia de los trabajos anteriormente citados, en el desarrollo de la presente Tesis no encontramos ninguna disminución de *Streptococcus thermophilus* que indique una lisis celular durante la maduración de los quesos Pategrás, en ninguno de los ensayos realizados. De acuerdo a esta observación, la ruptura celular del fermento primario no resultaría un factor indispensable para el crecimiento de fermentos adjuntos, de la misma manera que ha sido verificado en otros trabajos donde también se utilizó un fermento no lítico (Vinderola y col., 2000; Corbo y col., 2001; Hynes y col., 2003; Milesi y col., 2006) Vinderola y col. (2000) han incorporado diferentes cepas de bacterias probióticas en queso Fresco y encontraron, de manera similar al presente trabajo, una elevada viabilidad durante 60 días para *Streptococcus thermophilus*, empleado como fermento primario.

En el sentido inverso, Vinderola y col. (2002a) encontraron interacciones negativas entre los fermentos primario y probiótico, siendo mayor la inhibición causada por los últimos sobre los primeros que viceversa. No obstante, otros autores no detectaron una interacción significativa en la supervivencia, entre ambos fermentos (Gobbetti y col., 1998; Daigle y col., 1999; Vinderola y col., 2000; Ong y col., 2006). Del mismo modo, en el presente trabajo se observó que las poblaciones de *Streptococcus thermophilus* evolucionaron de manera similar en quesos testigo y experimentales, no resultando en general inhibido por la presencia de las cepas probióticas ensayadas, cuando las mismas se emplearon individualmente. El único cambio negativo detectado correspondió a los quesos elaborados con el fermento probiótico mixto, donde los recuentos de *Streptococcus thermophilus* resultaron menores en quesos experimentales, entre los 0 y 3 días de maduración. En este caso, hay que tener en cuenta que se trataba de tres cepas probióticas distintas, presentes todas en elevadas concentraciones como resultado del inóculo inicial, y es probable que haya

existido una gran competencia por los nutrientes durante este período inicial (Roy, 2005). De cualquier manera, cabe destacar que estas diferencias fueron ínfimas, y la evolución del fermento primario no resultó afectada durante el resto del período de maduración.

Por otro lado, Corbo y col. (2001) incorporaron las cepas *Bifidobacterium bifidum* Bb02 y *Bifidobacterium longum* Bb46 (en forma individual y combinadas) en queso Canestrato Pugliese, elaborado con *Streptococcus thermophilus* como fermento primario. Dichos autores encontraron poblaciones de este fermento, al final de la maduración, mayores en aquellos quesos con bifidobacterias, con relación a los quesos testigo. Esta influencia positiva sobre el fermento primario, de alrededor de un orden logarítmico, se atribuyó a la elevada actividad peptidasa y  $\beta$ -galactosidasa de las bifidobacterias. En nuestro trabajo, la incorporación de *Bifidobacterium lactis* como único cultivo probiótico produjo un aumento muy leve en las poblaciones del fermento primario en queso Pategrás, dentro de los 3 días de elaborados. Sin embargo, al igual que con las diferencias observadas para el cultivo probiótico mixto, las mismas fueron también en este caso puntuales, y muy pequeñas para ser consideradas relevantes en cuanto a la viabilidad del fermento primario.

Con respecto a la viabilidad de los fermentos probióticos, es importante recordar que se espera que sus concentraciones en los quesos sean lo más elevadas posible. Teniendo en cuenta que se trata de cultivos adquiridos en el mercado de forma liofilizada, resulta entonces muy importante desde el punto de vista económico, asegurar una buena retención en la cuajada durante la elaboración, con mínimas pérdidas en el suero. Un trabajo reciente indica pérdidas elevadas de probióticos en suero de quesería, alcanzando valores de hasta  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (Ong y col., 2007a). Para contrarrestar este problema, se han propuesto numerosas estrategias, entre ellas el agregado de los cultivos probióticos en una etapa tardía de la elaboración, o bien una microencapsulación previa (Dinakar y Mistry, 1994; Gobbetti y col., 1998; Songisepp y col., 2004). Una alternativa para la producción de quesos frescos con adición de probióticos, consistió en la utilización de leche concentrada por ultrafiltración previo a la elaboración. En este caso, el fermento probiótico se incorporó luego del paso de ultrafiltración (Roy y col., 1998; Vinderola y col., 2000). Otro mecanismo, propuesto para la manufactura de queso Canestrato Pugliese, consistió en el acortamiento del tiempo normal de calentamiento de la cuajada en los moldes, evitando de este modo una

sobreacidificación y mejorando en consecuencia la retención de probióticos en la masa del queso (Corbo y col., 2001).

El desarrollo de dicha serie de estrategias, supone que existen dificultades para lograr una buena concentración de fermentos probióticos en la cuajada durante la elaboración de quesos. Nuestros resultados mostraron, sin embargo, que la adición directa a la leche sin realizar modificaciones tecnológicas, no trajo aparejadas pérdidas significativas de probióticos en el suero. De esta manera, recuentos realizados en los sueros de elaboración corroboraron pérdidas en el mismo menores al 10%, a pesar de que sólo el 5% del contenido de agua de la leche queda retenido en el gel de caseína. Así, el desarrollo de quesos Pategrás probióticos no requeriría de modificaciones al protocolo estándar de manufactura.

Varias de las cepas probióticas utilizadas en este trabajo han sido ya estudiadas en diversos quesos, principalmente en Cheddar (Phillips y col., 2006; Ong y col., 2006 y 2007a; Darukaradhya y col., 2006), pero también en variedades menos conocidas mundialmente, como ser los quesos Fresco Minas (Buriti y col., 2005) y Tallaga (El-Zayat y Osman, 2001). La identidad de cada una de estas cepas entre dichos estudios y el presente trabajo fue corroborada, de acuerdo al proveedor y al nombre comercial de cada una de ellas, en una tesis desarrollada precedentemente en nuestro laboratorio (Bergamini, 2006).

Phillips y col. (2006) elaboraron quesos Cheddar con una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, correspondiente a la utilizada en el ensayo 3 del presente trabajo (*Lactobacillus acidophilus* B). La misma se adicionó junto a cepas de *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis*, y sufrió una marcada disminución durante la maduración. Ong y col. (2006 y 2007a) utilizaron la misma cepa, sola y en combinación con otras dos cepas probióticas, también en queso Cheddar; en ambas oportunidades la viabilidad se mantuvo muy elevada durante 6 meses, a pesar de ser un período de maduración muy prolongado, tres veces superior al empleado en el presente estudio para quesos Pategrás. Finalmente, Darukaradhya y col. (2006) estudiaron esta cepa, también en queso Cheddar, junto a una cepa de *Bifidobacterium lactis*. Durante los primeros 30 días, las concentraciones fueron muy elevadas, pero sin embargo se observó una disminución hasta valores de  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  a los 60 días. Nuestros resultados, obtenidos para la utilización de *Lactobacillus acidophilus* B sólo en forma individual, mostraron concentraciones de aproximadamente  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  desde el comienzo de la maduración hasta los 60 días.

Buriti y col. (2005) adicionaron la misma cepa probiótica de *Lactobacillus acidophilus* empleada en el ensayo 5 de la presente tesis, en queso Fresco Minas, y la misma conservó una viabilidad de  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  durante 21 días. Por otro lado, en queso Tallaga los niveles encontrados para esta cepa fueron de  $10^9$  UFC  $g^{-1}$ , tanto cuando se adicionó en forma individual como junto a una cepa de *Bifidobacterium lactis* (El-Zayat y Osman, 2001). Philips y col. (2006) ensayaron esta cepa en queso Cheddar, como parte de un fermento que también contenía *Lactobacillus casei* Lc1 y *Bifidobacterium lactis* Bb12. Estos autores encontraron descensos pronunciados en su población, observándose recuentos de  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  y  $10^3$  UFC  $g^{-1}$  a las 12 y a las 32 semanas, respectivamente. Estos períodos resultan, sin embargo, superiores al máximo estudiado en el presente trabajo, de sólo 8 semanas. Los niveles de *Lactobacillus acidophilus* C en nuestros ensayos fueron elevados (alrededor de  $10^8$  UFC  $g^{-1}$ ) tanto cuando se empleó la cepa en forma individual como en el fermento mixto. Sin embargo, en este último ensayo las otras cepas probióticas utilizadas eran diferentes a las del estudio en queso Cheddar (Philips y col., 2006).

La misma cepa de *Lactobacillus casei* estudiada en forma individual en la presente Tesis (ensayo 6) fue adicionada en queso Cheddar por Phillips y col. (2006), junto a otras dos cepas probióticas. En dicho trabajo, las concentraciones fueron muy elevadas a las 10 semanas de maduración, alcanzando  $10^8$  UFC  $g^{-1}$ . En nuestro trabajo se obtuvieron niveles aún mayores, de  $10^9$  UFC  $g^{-1}$  a los 60 días de maduración.

La cepa de *Lactobacillus paracasei* utilizada en nuestro estudio (de manera individual en el ensayo 2 y en el fermento mixto del ensayo 8) fue también estudiada en queso Cheddar (Ong y col., 2006 y 2007a). Los autores incorporaron dicha cepa probiótica de manera individual y en combinación con otras dos cepas probióticas, y en ambos casos verificaron poblaciones de *Lactobacillus paracasei* muy elevadas durante los 6 meses que duró la maduración de los quesos. De la misma manera, Phillips y col. (2006) obtuvieron concentraciones muy elevadas ( $10^7$  UFC  $g^{-1}$ ) tras 10 semanas de maduración, en quesos Cheddar donde la cepa de *Lactobacillus paracasei* había sido incorporada como parte de un fermento mixto. Nuestros resultados fueron mejores que los obtenidos en los trabajos citados, ya que en quesos Pategrás de 60 días *Lactobacillus paracasei* se encontraba en niveles de  $10^9$  UFC  $g^{-1}$ . Concentraciones similares se obtuvieron cuando esta cepa fue acompañada por *Lactobacillus acidophilus* C y *Bifidobacterium lactis* (ensayo 8, fermento mixto).



La cepa de *Bifidobacterium lactis*, utilizada en los ensayos 4 y 8 del presente estudio (individualmente y como parte del fermento probiótico mixto, respectivamente) mostró valores de concentración elevados (poco menores a  $10^8$  UFC  $g^{-1}$ ), aunque no tanto como ninguna de las cepas probióticas de lactobacilos. En queso Cheddar, los recuentos de esta cepa de *Bifidobacterium lactis* alcanzaron, por un lado,  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  durante los 6 meses de maduración (Ong y col., 2006 y 2007a), mientras que en ensayos donde se adicionó junto a otras dos cepas probióticas, la supervivencia fue ligeramente inferior (Phillips y col., 2006). Por otro lado, en queso Cheddar se encontró una disminución hasta alcanzar  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  a los 60 días de maduración (Darukaradhya y col., 2006).

En cuanto al fermento constituido por *Lactobacillus acidophilus* C, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis*, las tres cepas probióticas mantuvieron niveles elevados de viabilidad durante toda la maduración. Si bien la presencia simultánea de las demás cepas probióticas produjo un aumento inicial en la concentración de *Lactobacillus paracasei* en quesos E1 y una disminución en *Lactobacillus acidophilus* en quesos E2, estas pequeñas interacciones no fueron detectadas a partir de los 3 días de maduración, siendo las concentraciones de cada cepa en el queso maduro, similares a los ensayos respectivos donde se adicionaron en forma individual.

Como se ha detallado, existieron notables diferencias en la supervivencia cuando la misma cepa fue utilizada en diferentes trabajos, normalmente empleando distintos tipos de queso. Esto remarca la influencia muy elevada que posee la matriz alimentaria, incluyendo el uso de distintos fermentos primarios de acidificación y/o el uso concomitante de dos o más cepas probióticas diferentes, sobre la viabilidad de estos cultivos. Así, encontramos que el queso Cheddar, matriz sobre la cual se desarrollaron la mayoría de los quesos probióticos, posee un proceso de elaboración que resultaría más agresivo para el desarrollo de tales fermentos, entre otras cosas por poseer una humedad menor, cocción a temperaturas más altas, molido de la cuajada y cheddarización, y un proceso de salado directo (Banks, 2003). Por otro lado, el tiempo de maduración, otro factor importante que influencia el desarrollo de las bacterias probióticas, puede alcanzar fácilmente los 6 meses en queso Cheddar, mientras que el período normal para el queso Pategrás, con mayor contenido de humedad, es de sólo un mes. Por lo expuesto resulta evidente que, si bien se pueden hacer generalizaciones, el modo en que cada cepa probiótica o combinación de estas desarrollará en una variedad de queso determinada, debe ser siempre corroborada experimentalmente, ya que la

evolución será característica de cada sistema en particular y las extrapolaciones de resultados no tienen validez (O'Riordan y Fitzgerald, 1998; Corbo y col., 2001; McBrearty y col., 2001).

En cuanto a la forma de adición de los fermentos probióticos a los quesos, existe evidencia de que el estado fisiológico del cultivo impacta significativamente sobre su resistencia a las condiciones adversas del alimento (Bertazzoni Minelli y col., 2004). Pese a ello, nuestra experiencia no demostró que exista ninguna mejora (o detrimento) en la supervivencia de las cepas probióticas a lo largo de la maduración del queso Pategrás, cuando las mismas fueron previamente incubadas en un sustrato lácteo con elevado contenido de materia grasa. Se encontraron concentraciones sólo ligeramente mayores en quesos E2, siendo significativa la diferencia con los quesos E1 sólo en unos pocos casos, y únicamente durante los primeros días de maduración (podría explicarse únicamente por el empleo de un inóculo mayor debido al crecimiento en el sustrato fermentado, tendiendo las poblaciones a igualarse al poco tiempo). El uso de dicho sustrato fue propuesto por Daigle y col. (1999) para bifidobacterias. Estos autores pensaron que su crecimiento en el queso podría verse favorecido por una etapa previa de crecimiento y, de hecho, obtuvieron niveles aceptables en queso Cheddar a las 12 semanas de maduración ( $5 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>). Sin embargo, en dicho trabajo se analizaron sólo dos inóculos y tiempos de incubación del sustrato diferentes, no cotejándose los resultados con experiencias de adición de las cepas en forma directa.

Al haber sido los niveles de las poblaciones probióticas, alcanzados y mantenidos durante todo el período de maduración del queso Pategrás, prácticamente iguales entre quesos E1 y E2, podemos concluir que la adición en forma liofilizada resultó mucho más conveniente, al menos desde el punto de vista de la supervivencia en el producto (otros factores tales como el impacto en la maduración y sobre las características sensoriales serán discutidos mas adelante). Esta conveniencia resulta de una manipulación del cultivo mucho menor, sin etapas de propagación intermedias que conllevan tiempo y trabajo, y son riesgosas ya que pueden favorecer el crecimiento de bacteriófagos en la industria láctea (Batt y col., 1995).

De cualquier manera, debemos resaltar que en ambos tipos de quesos experimentales desarrollados en la presente Tesis, y para todas las cepas ensayadas, los probióticos estudiados demostraron, en general, una supervivencia igual o mayor a  $10^7$  UFC g<sup>-1</sup> o mL<sup>-1</sup> durante toda la maduración (60 días), nivel mínimo sugerido para un alimento probiótico (De Vuyst, 2000; Salminen y Ouwehand, 2003).

Considerando cada grupo microbiano por separado, las cepas que mostraron una mejor supervivencia en queso Pategrás fueron los lactobacilos del grupo *casei*, resultados que abarcan tanto su uso en forma individual (ensayos 2, 6 y 7) como el empleo de *Lactobacillus paracasei* (del ensayo 2) junto a *Lactobacillus acidophilus* C y *Bifidobacterium lactis* en el ensayo 8. Del mismo modo, Vinderola y col. (2000) observaron, utilizando combinaciones de dos y tres cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y bifidobacterias en queso Fresco, una disminución de las dos últimas en aproximadamente 1 orden logarítmico durante 60 días, mientras que *Lactobacillus casei* tuvo las mayores concentraciones, no registrándose descensos durante el mismo período. Gardiner y col. (1998 y 2002), Stanton y col. (1998), Ong y col. (2006 y 2007a) y Phillips y col. (2006) encontraron asimismo poblaciones muy altas de este grupo microbiano en queso Cheddar. En sentido opuesto, no se encontraron estudios que reporten una disminución marcada durante la maduración de quesos; solamente en dos estudios se observaron descensos leves, no bajando de  $10^6$  UFC g<sup>-1</sup> (Stanton y col., 1998; Lynch y col., 1999). Como es sabido, la flora NSLAB, que alcanza niveles muy elevados en quesos de larga maduración, comprende gran parte de los lactobacilos adventicios presentes en dichos productos (Hynes y Bergamini, 2004). Si bien existen diferencias entre el origen de la flora NSLAB y los lactobacilos probióticos, es posible que determinadas cepas de estos se encuentren adaptadas al ambiente del queso, y de esta manera se podría explicar la mayor resistencia observada.

Las cepas de *Lactobacillus acidophilus* tuvieron, en general, una supervivencia algo menor que las cepas del grupo *casei*, si bien sus concentraciones fueron, en todos los ensayos donde se estudiaron, muy elevadas. Ong y col. (2007a) determinaron, en una experiencia con queso Cheddar, pérdidas de viabilidad mayores para dos cepas de *Lactobacillus acidophilus* que para otros lactobacilos y bifidobacterias. Vinderola y col. (2002a), por su parte, detectaron una menor resistencia al pH de varias cepas de *Lactobacillus acidophilus* con respecto a otras bacterias probióticas, cuando se ensayaron en leches acidificadas a pH 4 y 5. Por otro lado, se encontraron divergencias en diferentes variedades de quesos, mas o menos similares, en cuanto a la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus*, aun utilizando la misma cepa (El-Zayat y Osman, 2001; Darukaradhyia y col., 2006; Ong y col., 2006; Phillips y col., 2006).

Por último, la cepa de *Bifidobacterium lactis* resultó la más afectada en su crecimiento y supervivencia en queso Pategrás. Es conocida la marcada sensibilidad de estos microorganismos a factores ambientales tales como presencia de oxígeno,

interacciones negativas con otros microorganismos, requerimientos nutricionales complejos y producción de ácidos orgánicos, que limitan su propio crecimiento y supervivencia (Boylston y col., 2004; Roy, 2005). De cualquier modo, todos los factores mencionados afectan de manera muy diversa a diferentes bifidobacterias, y las cepas comerciales normalmente utilizadas en alimentos han sido, por lo general, aisladas teniendo en cuenta que presenten una elevada resistencia en matrices alimentarias. Igualmente, el comportamiento muy diferente entre cepas distintas, especialmente cuando se utilizan en productos diversos, es un hecho ampliamente demostrado (Corbo y col., 2001; McBrearty y col., 2001; Blanchette y col., 1996; Roy y col., 1998). Por un lado, en queso Cheddar se verificaron niveles mas elevados para cepas de *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium lactis*, que para una cepa de *Bifidobacterium longum*, la cual disminuyó su concentración hasta  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup> (Corbo y col., 2001; McBrearty y col., 2001). En quesos Cottage y Fresco, por otra parte, los resultados fueron negativos para varias cepas de bifidobacterias, con una pérdida de viabilidad muy pronunciada a los 30 días de maduración (Blanchette y col., 1996; Roy y col., 1998). Esto remarca lo dicho anteriormente, en cuanto a la importancia de considerar cada sistema “cepa probiótica-variedad de queso” de manera independiente, sin realizar extrapolaciones.

En el presente trabajo, por su parte, la supervivencia de *Bifidobacterium lactis* fue, si bien menor a todos los lactobacilos probióticos estudiados, mayor que los recomendados para un alimento probiótico. En el ensayo 4, donde se utilizó en forma individual, se encontró un crecimiento muy bajo durante la primera mitad del período de maduración, el cual sin embargo se mantuvo entre los 30 y los 60 días, alcanzando poblaciones no mucho menores que para *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* en quesos de 60 días. En este sentido se ha establecido que, durante el proceso de maduración, la producción de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular por parte de las bacterias lácticas, ayudaría al crecimiento de las bifidobacterias (Boylston y col., 2004; Roy, 2005).

#### 4. Lipólisis

En el presente trabajo de tesis la lipólisis se analizó, en primer lugar, a través del contenido total de AGL en quesos a lo largo de la maduración, lo cual da una idea de su magnitud. En el queso Pategrás tradicional (elaborado sin el agregado de fermentos probióticos) encontramos concentraciones de AGL totales al inicio de la maduración

que no difieren significativamente de las informadas para la grasa de leche cruda de vaca en Argentina (Paez y col., 2005). Por otro lado, si bien existió un aumento en las concentraciones de AGL durante los 60 días de maduración en los quesos testigo, el mismo fue leve y los niveles se mantuvieron bajos aún hacia final, indicando una lipólisis muy suave en el queso maduro.

Tal como se detalló anteriormente, el empleo de coagulantes en pasta produce una lipólisis moderada en variedades italianas, en las cuales se han encontrado niveles de hasta 7000 mg de AGL Kg de queso<sup>-1</sup> (Collins y col., 2004).

Asimismo, el empleo de fermentos secundarios produce, en algunos casos, un aumento considerable en la liberación de AGL. El caso extremo lo encontramos al utilizar hongos del género *Penicillium*, que llegan a hidrolizar hasta el 25% de los triglicéridos durante la maduración de quesos azules, y en menor medida bacterias del género *Brevibacterium*, que crecen en la superficie, por ejemplo, del queso Limburguer (Collins y col., 2004). También las bacterias propiónicas, que se utilizan en la manufactura de quesos suizos tales como el Gruyere y el Emmental, han demostrado tener una actividad lipolítica, si bien no excesivamente alta, entre 2 y 3 órdenes superior a la de las bacterias lácticas (Deborde, 2003). Esto se debe principalmente a la presencia de una lipasa intracelular, aislada y caracterizada por Oterholm y col. (1970) en *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, la cual tiene una mayor especificidad por los AGL de cadena corta.

Finalmente, la actividad de la LPL, normalmente presente en leche, contribuye significativamente a la lipólisis en quesos elaborados con leche cruda. De esta manera, Hickey y col. (2007) elaboraron quesos Cheddar con leche cruda, termizada a 65°C durante 15 s y pasteurizada a 72° durante 15 s, encontrando que en el primer caso y, en menor medida, en el segundo, la LPL era determinante en la lipólisis que sufrieron los quesos durante la maduración, mientras que cuando se utilizó leche pasteurizada los principales agentes lipolíticos fueron las esterases de las bacterias lácticas, debido seguramente al mayor grado de desnaturalización de la LPL por el tratamiento térmico intenso. Otro efecto que posee la pasteurización es la inactivación de la mayor parte de la microflora indígena presente en la leche cruda. De esta manera, se ha propuesto también que los mayores niveles de lipólisis encontrados en quesos Cheddar elaborados con leche cruda, pueden deberse a la flora NSLAB, que en dichos quesos se incrementa y alcanza una meseta en el crecimiento en etapas más tempranas durante el período de

maduración, en comparación con quesos en cuya fabricación se emplea leche pasteurizada (Hickey y col., 2007).

En todas las variedades discutidas anteriormente, la lipólisis juega un rol fundamental en el desarrollo de las características del queso, especialmente en el aroma y el sabor. El queso Pategrás, por otro lado, se elabora normalmente con leche pasteurizada, no se utilizan fermentos adjuntos ni coagulantes con actividad lipolítica y, además, no se adiciona con lipasas exógenas. En un principio, la elaboración del queso Pategrás se realizaba utilizando fermentos de leche naturales, que contenían bacterias heterofermentativas, lo cual le proporcionaba un sabor más acentuado y daba lugar al desarrollo de una cantidad limitada de ojos dulces (Zalazar y col., 1999). Sin embargo, el cambio de tecnología que supuso la adopción de fermentos comerciales de adición directa, disminuyó notablemente este fenómeno. Es por esto que, actualmente, se suele recurrir al empleo de bacterias propiónicas como fermento secundario en su elaboración, lo cual podría afectar tanto el nivel de lipólisis (por la liberación de AGL) como el aroma y sabor, debido al catabolismo del lactato con generación de ojos picantes (Deborde, 2003). No obstante, en el presente trabajo sólo se estudiaron quesos sin bacterias propiónicas, elaborados según el protocolo estándar actual (Zalazar y col., 1999).

Por todas estas razones, el grado de lipólisis observado en el presente estudio para los quesos testigo de todos los ensayos (alrededor de 2000 mg/Kg de queso) resulta perfectamente normal para esta variedad, ya que en la misma, al igual que en los quesos Gouda y Cheddar, las bacterias lácticas constituyen prácticamente el único factor responsable de la liberación de ácidos grasos, no estando presentes los otros factores mencionados previamente, que contribuyen a la lipólisis de manera mucho más marcada (Collins y col., 2004).

A pesar de que se han aislado y caracterizado numerosas enzimas esterolíticas y lipolíticas en bacterias lácticas, las cuales han demostrado ser activas en la hidrólisis de tri-, di- y monoglicéridos, dichos cultivos tienen mucho menor actividad lipolítica que los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium* (Chich y col., 1997). A esto se suma que, dentro de las bacterias lácticas en general, las cepas de *Streptococcus thermophilus* en especial presentan una muy baja actividad lipolítica (Choisy y col., 1997). Por otro lado, las esterasas y lipasas de bacterias lácticas son mayormente intracelulares, y deben liberarse en la matriz del queso para tener una actividad significativa, lo que supone una lisis del fermento (Collins y col., 2004). Collins y col.

(2003) demostraron mayores concentraciones en determinados AGL en queso Cheddar cuando se reemplazó un fermento primario de lactococos por otro similar pero más autolítico, a pesar de haber mostrado, ambas cepas, actividades lipasa y esterasa similares cuando fueron ensayadas *in vitro*.

En nuestro caso, a pesar de no haberse realizado ensayos para determinar el grado de lisis del fermento primario, las elevadas poblaciones del mismo encontradas a lo largo de todo el período de maduración hacen suponer que la autólisis fue, en el caso de haber existido, muy baja, contribuyendo también de esta manera al bajo nivel de lipólisis observado.

En referencia a los quesos con bacterias probióticas, hay evidencia de que las mismas poseen también una actividad lipolítica muy baja, tanto latobacilos como bifidobacterias, y por lo tanto, no deberían afectar el grado de lipólisis de los quesos durante la maduración (Fox y col., 1993; Collins y col., 2004). Efectivamente, en los quesos experimentales de todos los ensayos, los valores de AGL encontrados a los 60 días no resultaron significativamente mayores que los correspondientes a los quesos testigo maduros. De este modo, también aquí se observó una lipólisis escasa, por debajo de los límites a partir de los cuales se empiezan a percibir modificaciones en las características sensoriales del producto. Una excepción se dio en el ensayo 6, donde se observaron valores estadísticamente mayores en un queso experimental que en los quesos T ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, esto ocurrió sólo en uno de los quesos experimentales del ensayo (E1), y dicho valor fue el que presentó la mayor desviación estándar dentro de todas las determinaciones de AGL totales a los 60 días de maduración.

El análisis de los perfiles de AGL aporta información de gran relevancia en el estudio de la lipólisis, debido sobre todo a la gran diferencia en las concentraciones relativas de cada uno de ellos. En especial los AGL de cadena corta y media, que a diferencia de los ácidos grasos de cadena larga pueden contribuir, tanto de manera directa como indirecta, al desarrollo del aroma y sabor de los quesos durante la maduración, son los encontrados en menor concentración con respecto a la cantidad total de AGL en leche. Por consiguiente, un aumento proporcionalmente grande en las concentraciones de AGL de cadena corta, puede suponer un cambio en las características sensoriales del producto, mientras que dicho aumento se ve enmascarado por las elevadas concentraciones de AGL de cadena larga cuando se realiza la determinación de AGL totales.

Tanto en quesos testigo como experimentales, y en los todos los ensayos, se observó que los perfiles de AGL a los 3 días fueron muy similares a los correspondientes a grasa de leche cruda de vaca (Paez y col., 2005). Efectivamente, los ácidos grasos de cadena larga ( $C_{14:0}$  y superiores) representaron alrededor del 90% del total de AGL, siendo muy pequeñas las variaciones entre diferentes quesos del mismo ensayo, y aún entre quesos de ensayos diferentes. Dentro de los AGL de cadena larga, los ácidos palmítico y oleico fueron los encontrados en mayor concentración, representando en conjunto más del 60% de los AGL totales. La variabilidad encontrada para esta proporción entre las diferentes muestras analizadas, fue también pequeña en este caso.

Todos los quesos (tanto testigos como experimentales) presentaron, a los 60 días, perfiles de lipólisis muy similares a los respectivos a los 3 días, con porcentajes de distribución de AGL de cadena larga (y específicamente de ácidos palmítico y oleico) muy parecidos a los correspondientes al inicio de la maduración. Esto indica que no hubo una liberación selectiva de ácidos grasos durante la maduración, tanto en quesos testigo como en aquéllos con adición de cultivos probióticos.

En cuanto a los niveles de AGL totales, se había observado que, a excepción de un caso aislado (queso E2/ensayo 8), en ningún quesos probiótico de ningún ensayo se había producido un aumento a lo largo de la maduración. Con el propósito de determinar si la presencia de probióticos, mediante las dos metodologías utilizadas, producía la liberación de uno o más AGL en forma significativa a lo largo de la maduración (en el caso de que esto no modificara notablemente las concentraciones de AGL totales), se realizaron ANOVA para determinar diferencias significativas dentro del mismo queso entre 3 y 60 días, para cada AGL y ensayo en forma individual. Las diferencias encontradas fueron en general muy sutiles, no siguiendo un patrón determinado.

En los ensayos 2 (*Lactobacillus paracasei*), 3 (*Lactobacillus acidophilus* B), 4 (*Bifidobacterium lactis*), 6 (*Lactobacillus rhamnosus*) y 7 (*Lactobacillus casei*), no se observaron diferencias significativas para ninguno de los nueve AGL cuantificados, en ambos tipos de quesos experimentales, y en el ensayo 1 se observó un aumento pero aislado, sólo en la concentración de ácido mirístico y en el queso E2. Por otro lado, se encontraron algunas diferencias en determinados AGL en los quesos testigo en algunos de dichos ensayos 2, 4 y 7, si bien las mismas no respetaron un patrón definido. Curiosamente, en el queso E1 del ensayo 6, donde a los 60 días se observaron



concentraciones significativamente mayores que en los quesos T correspondientes ( $P > 0,05$ ), ningún AGL individual aumentó su concentración en forma estadísticamente significativa con respecto a los 3 días, tiempo en el cual no existían diferencias entre quesos T, E1 y E2, lo que pone en evidencia la gran variabilidad encontrada en los perfiles de AGL entre las diferentes réplicas de este ensayo, lejos de corroborar un nivel de lipólisis efectivamente mayor. En el ensayo 5 se encontraron mayores niveles de AGL de cadena corta (caproico, caprílico y cáprico) en la variedad E1, por lo que podría pensarse en un mayor desarrollo de aroma y sabor en quesos debido a la presencia de la cepa *Lactobacillus acidophilus* C. Sin embargo, los aumentos observados fueron muy bajos en valor absoluto, y de esta manera no se alcanzaron concentraciones que permitieran asegurar un cambio en el aroma o sabor de los quesos elaborados con dicha cepa (Deeth y Fitzgerald, 1995). Además, este efecto no se repitió en el otro tipo de queso experimental (E2).

Finalmente, cuando la combinación de tres cepas probióticas se ensayó mediante su agregado a quesos en el SLG (queso E2/ensayo 8), se encontró una liberación significativa de ácidos caproico, mirístico, palmítico, esteárico y oleico durante la maduración. Dado que estos, a excepción del ácido caproico, representan una fracción importante del total de AGL, se explicaría el único aumento significativo del grado general de lipólisis observado en quesos experimentales a lo largo de la maduración, correspondiente al queso E2 del ensayo 8. Esto resulta, además, un indicio de que estas cepas podrían modificar tanto el nivel como el perfil de lipólisis del queso Pategrás. Sin embargo, esto sólo sería cierto cuando 1) el agregado del fermento probiótico se realizara previa incubación en el SLG, y 2) se ensayara la combinación de las tres cepas, las cuales no tuvieron un impacto apreciable cuando se utilizaron de manera individual. Además, a excepción del ácido caproico, los demás AGL (de cadena larga) no contribuyen de manera significativa al desarrollo de aroma y sabor en quesos.

Para analizar en detalle la composición en AGL de los diferentes tipos de queso se aplicó un análisis estadístico multivariado (ACP), que permite realizar un análisis exploratorio a nivel de cada uno de los AGL. Las primeras funciones extraídas del ACP (los CP) explican por sí mismas el mayor porcentaje de la variabilidad total del sistema, y se representan gráficamente como vectores en un sistema de dos componentes gráficos. En nuestro caso, tanto cuando el ACP se aplicó a todas las muestras de queso, incluyendo aquellas de 3 y 60 días de maduración, como cuando se aplicó sólo en quesos de 60 días, el porcentaje de la variabilidad total del sistema explicada por los dos

primeros CP fue similar: 82,5% y 83,9% para PC1, y 8,0% y 6,4% para PC2, respectivamente en ambos casos. Además, las cargas factoriales correspondientes a cada variable original (los AGL individuales), fueron prácticamente las mismas en ambos ACP. Esta elevada similitud significa que cada AGL afectó los perfiles globales de AGL de igual forma a 3 y a 60 días, y confirma la hipótesis planteada anteriormente de que la liberación de AGL se realizó de manera no selectiva. De acuerdo a las cargas factoriales de cada AGL sobre los dos primeros CP extraídos, concluimos que los ácidos mirístico y palmítico resultaron responsables de la mayor variabilidad observada entre las muestras, mientras que los que menos influyeron fueron aquellos de cadena corta y media (desde C<sub>6:0</sub> hasta C<sub>12:0</sub>). Es importante destacar que, en Argentina, se han encontrado diferencias estacionales significativas, en las concentraciones de los ácidos palmítico y estearico entre leches de verano e invierno (Paez y col., 2005). Debido a que en la presente tesis los diferentes ensayos se realizaron a lo largo de más de dos años, y que de acuerdo a las cargas factoriales el ácido palmítico obtuvo la mayor carga factorial a lo largo del eje CP1, el efecto de las variaciones estacionales puede haber resultado un importante factor no controlado de variabilidad en el contenido de AGL entre muestras, que reste aún más importancia al efecto del agregado de fermentos probióticos.

Un análisis de clusters empleando CP1 como variable, realizó una agrupación de muestras de acuerdo al tiempo de maduración. Sin embargo, dicha asociación no fue categórica, ya que aproximadamente una de cada cinco muestras de 60 días se agrupó junto con las de 3 días. Además, un análisis de clusters realizado teniendo en cuenta CP2, no agrupó en absoluto las muestras de acuerdo al tiempo de maduración.

Por otro lado, de acuerdo a la cepa utilizada y al tipo de agregado del fermento probiótico, en el gráfico de coordenadas donde se visualizan los puntajes asignados a cada muestra para CP1 y CP2, no se observaron separaciones entre quesos experimentales (entre sí: E1 vs. E2, ni con respecto a los quesos sin probióticos: E1/E2 vs. T), sino más bien una agrupación entre los tres tipos de queso (T, E1 y E2) del mismo ensayo, remarcando el efecto de factores no controlados entre elaboraciones realizadas en días diferentes, como fuente de variabilidad.

Con referencia a los antecedentes de quesos probióticos, prácticamente todos los trabajos encontrados en bibliografía estudian la viabilidad de las bacterias probióticas durante la maduración. Asimismo, gran parte de ellos realizan una caracterización mas o menos profunda de los perfiles proteolíticos de los quesos y algunos análisis sensoriales,

principalmente de aceptabilidad. Sin embargo, la mayoría de los estudios no tiene en cuenta los perfiles de AGL. Curiosamente en Cheddar, la variedad más utilizada para el desarrollo de quesos probióticos (Dinakar y Mistry, 1994; Stanton y col., 1998; Gardiner y col., 1998, 1999 y 2002; Daigle y col., 1999; Lynch y col., 1999; Mc Brearty y col., 2001; Darukaradhy y col., 2006; Phillips y col., 2006; Ong y col., 2006 y 2007a y b), no existen antecedentes del estudio del perfil de AGL, para ninguno de los trabajos previamente citados. Probablemente, esto se deba a la baja actividad lipolítica atribuida a las bacterias probióticas en general. Los escasos antecedentes encontrados relativos al estudio de la lipólisis en quesos probióticos, correspondieron a queso Crescenza (Gobbetti y col., 1998), y dos variedades menos conocidas, elaboradas con leche de cabra y de oveja: Queijo de Cabra (Gomes y Malcata, 1998) y Canestrato Pugliese (Corbo y col., 2001), respectivamente. En dichos trabajos, el estudio de la lipólisis se realizó de manera simple, sin la aplicación de técnicas de análisis multivariado, y fue siempre complementario a otras determinaciones analizadas con más detalle, tales como el estudio de la viabilidad de los fermentos probióticos en los quesos, la proteólisis y la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, especialmente ácidos láctico y acético cuando se estudiaron bifidobacterias.

Gobbetti y col. (1998) no encontraron diferencias en la concentración de AGL entre quesos Crescenza elaborados con cepas de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium longum* (solas y en combinación), con respecto a quesos testigo sin dichas bacterias, a pesar de haberse encontrado en bifidobacterias una marcada actividad esterasa sobre derivados  $\beta$ -naftil-ésteres de C<sub>4:0</sub>, C<sub>6:0</sub> y C<sub>8:0</sub>. También puede suponerse que la lipólisis fue baja debido a que se trata de un queso blando y el tiempo de estudiado fue muy corto (14 días). Sin embargo, aún durante este breve período las cepas probióticas ensayadas evidenciaron, por otro lado, una notable actividad proteolítica en los quesos. Gomes y Malcata, 1998 no encontraron diferencias en la lipólisis en quesos elaborados con leche de cabra utilizando *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus*. Ambas cepas mantuvieron una viabilidad aceptable durante la maduración de los quesos y, a diferencia de los niveles de AGL, la proteólisis sí resultó afectada, especialmente por la generación de péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos, en concordancia con los resultados obtenidos por Gobbetti y col. (1998) para queso Crescenza. Finalmente, Corbo y col. (2001) no encontraron diferencias significativas en las concentraciones de AGL en quesos Canestrato Pugliese elaborados con *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* y

con ambas cepas en combinación, con respecto al queso elaborado en forma tradicional. Por otro lado, en el mismo trabajo se determinó la actividad lipasa en extractos acuosos de quesos, donde tampoco hubo diferencias entre testigos y experimentales, a pesar de haberse encontrado previamente actividades esterasa y lipasa en bifidobacterias. Esto puede deberse a que las actividades enzimáticas de estas bacterias estén reprimidas en el queso, ya sea debido a las características fisicoquímicas de este alimento, o bien por una dificultad en el acceso al sustrato (Hickey y col., 2007). Los autores atribuyeron a los hongos y otros microorganismos contaminantes, un rol probablemente muy importante en la lipólisis durante la maduración del queso Canestrato Pugliese.

En general, podemos sintetizar que, así como las bacterias lácticas del fermento primario utilizado no contribuyeron de manera significativa a la lipólisis durante la maduración del queso Pategrás, tampoco se observó una liberación de AGL en forma significativa debida al empleo de bacterias probióticas, para ambas formas de agregado de dichos cultivos adjuntos durante la elaboración. Todos los quesos presentaron, de esta manera, una lipólisis suave a los 60 días de maduración, de acuerdo a las características de esta variedad. Nuestros resultados concuerdan con los encontrados para otras variedades de quesos probióticos, elaborados tanto con leche de vaca (Gobbetti y col., 1998), cabra (Gomes y Malcata, 1998) y oveja (Corbo y col., 2001). A pesar de que en bacterias lácticas y probióticas se han hallado los equipos enzimáticos necesarios para la hidrólisis de triglicéridos, es probable que dicha actividad se vea inhibida en el queso, ya sea por un difícil acceso al sustrato o bien por las condiciones fisicoquímicas reinantes dentro de esta matriz alimentaria (Hickey y col., 2007).

## **5. Contenido de colesterol**

En la Argentina, un 46% de las defunciones son consecuencia de enfermedades cardiovasculares, siendo los hombres más susceptibles que las mujeres. En relación a este hecho, un 30-40% de la población tiene niveles elevados de colesterol en sangre (Taranto y col., 2005), por lo que en la actualidad las dietas tienden a reducir al mínimo la ingesta de esta sustancia. En este sentido, si bien se han desarrollado varios métodos físicos y químicos para la reducción del contenido de colesterol en diferentes alimentos (Lee y col., 1999; Micich, 1990), los procedimientos biológicos que involucran la utilización de probióticos reciben cada vez mayor atención por parte de productores y consumidores (Psomas y col., 2003). La capacidad de reducir el colesterol sérico que

poseen algunas cepas de bacterias lácticas y bifidobacterias, es muy interesante para su aplicación en el área médico-nutricional (Taranto y col., 2005).

En el presente estudio, se realizaron determinaciones a fin de comprobar una posible reducción de la concentración de colesterol, debida a la presencia de cultivos probióticos, durante la maduración de quesos Pategrás. Se ensayó una cepa de cada grupo probiótico, correspondientes a los ensayos 1 (*Lactobacillus acidophilus* A), 2 (*Lactobacillus paracasei*) y 4 (*Bifidobacterium lactis*).

El fundamento de la presente determinación, se basó en el hecho de que los numerosos mecanismos propuestos para la reducción de los niveles de colesterol en animales, podrían también estar presentes, teóricamente, en una matriz alimentaria donde las bacterias probióticas se encuentran viables y metabólicamente activas. Si bien no están claros los mecanismos involucrados en la reducción de los niveles de colesterol en sangre, se atribuye un papel importante a la deconjugación de ácidos biliares *in vivo*, lo que limitaría su absorción intestinal (Reynier y col., 1981; Corzo y Gilliland, 1999). Taranto y col. (1998, 2000) obtuvieron resultados promisorios en ratones, utilizando una cepa de *Lactobacillus reuteri* a muy baja dosis, mejorando además la relación entre lipoproteínas plasmáticas de baja y alta densidad. Estos mecanismos, que involucran una acción probiótica *in vivo*, han sido reproducidos, por otro lado, en modelos *in vitro*. Psomas y col. (2003) utilizaron, entre otros trabajos donde se ensayaron diferentes microorganismos, cepas de levaduras aisladas de heces de infantes y de queso Feta, bajo las condiciones encontradas normalmente en el tracto gastrointestinal humano. Los autores lograron de esta manera la asimilación de colesterol *in vitro*. No obstante, una búsqueda bibliográfica exhaustiva no permitió encontrar ningún trabajo orientado a determinar cambios en el contenido de colesterol en el propio alimento probiótico, de manera tal que nuestro trabajo resulta novedoso en este sentido.

Los resultados obtenidos en quesos Pategrás elaborados sin adición de cultivos probióticos no mostraron, como era previsible, ningún cambio significativo en la concentración de colesterol, entre el comienzo y el final del período de maduración. Asimismo, en quesos experimentales, los niveles de colesterol a los 60 días de maduración resultaron iguales que a los 3 días, lo que indica que las cepas probióticas ensayadas no pueden metabolizar este compuesto en el medio ambiente del queso Pategrás.

Llegados a este punto, sin embargo, es importante recordar que cada cepa probiótica cumple solo uno o unos pocos de todos los criterios específicos conocidos.

En este contexto, de las tres cepas comerciales estudiadas en cuanto a su posible metabolización del colesterol en queso Pategrás, a ninguna de ellas se le ha atribuido dicha propiedad probiótica *in vivo*. Por ende, los resultados actuales no pueden extrapolarse a otras cepas probióticas que sí posean tal propiedad, con las cuales sería interesante la realización de estudios análogos en el futuro.

Otro mecanismo citado en la bibliografía plantea una probable incorporación del colesterol en la membrana celular de *Lactobacillus acidophilus* durante su crecimiento (Noh y col., 1997). De ocurrir en el queso, este cambio no sería detectado por el método empleado en el presente estudio para la determinación de colesterol, ya que el mismo sería extraído de las membranas celulares y cuantificado como si se encontrara libre. Sin embargo, el colesterol estaría formando parte de las membranas celulares de las bacterias probióticas y, de no producirse la lisis de estas durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal, no podría ser absorbido en el organismo.

## 6. Transformación de azúcares

En queso Cheddar se han encontrado concentraciones de lactosa de entre el 0,8% y el 1% antes de la etapa de salado de la cuajada. Este pequeño porcentaje es, por lo general, desdoblado rápidamente a glucosa y galactosa durante los primeros días de elaboración, debido principalmente a la actividad del fermento primario (McSweeney y Fox, 2004). En el queso Pategrás, que de acuerdo a su proceso de elaboración es un queso semicocido con un contenido de humedad no muy diferente al del queso Cheddar, se encuentran normalmente concentraciones de lactosa similares en esta etapa. En el presente trabajo, un elevado consumo de este azúcar fue claramente evidenciado por un correcto grado de acidificación del queso en las etapas iniciales de la maduración, de acuerdo a los valores de pH obtenidos un día después de finalizado el proceso de salado (3 días). La actividad  $\beta$ -galactosidasa, responsable de la hidrólisis de la lactosa, ha demostrado ser inducible en cepas de *Lactobacillus acidophilus*, de acuerdo al medio de crecimiento (De Vuyst, 2000). De esta manera, la mayor reducción inicial del pH en quesos experimentales del ensayo 1, podría estar relacionada con una mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa inicial de la cepa *Lactobacillus acidophilus* A.

En quesos elaborados sólo con cepas de *Streptococcus thermophilus* como fermento primario, se espera encontrar concentraciones de galactosa relativamente elevadas. Esto se debe a que la mayoría de las cepas de esta especie fermentan rápidamente la lactosa, con producción de glucosa y galactosa, pero posteriormente

utilizan sólo la primera como fuente de carbono fermentable, mientras que la galactosa se acumula en el queso (McSweeney y Fox, 2004; Hutkins y Morris, 1987; Mukherjee y Hutkins, 1994). El empleo de determinadas cepas de *Streptococcus thermophilus*, aisladas en laboratorio y capaces de utilizar la galactosa, ha permitido reducir significativamente tanto la concentración de este azúcar como el pardeamiento no enzimático en queso Mozzarella de 28 días de maduración, en relación a quesos Mozzarella comerciales, donde se encuentran concentraciones de galactosa de hasta el 0,8% (Mukherjee y Hutkins, 1994).

No obstante, en el presente estudio, los valores de galactosa encontrados en quesos Pategrás maduros fueron muy bajos aún en quesos sin adición de bacterias probióticas, no existiendo diferencias apreciables con respecto a los quesos experimentales. En los quesos T de los 8 ensayos se encontraron, como ya vimos, poblaciones elevadas de flora NSLAB, especialmente en etapas avanzadas de la maduración. Es muy probable que los lactobacilos, constituyentes principales de esta compleja microflora, hayan sido en este caso responsables de la metabolización de la galactosa.

El queso Mozzarella se trata de un alimento con alto tenor de humedad y, por lo tanto, con un elevado contenido de lactosa inmediatamente luego de su manufactura. Dentro de este contexto, en queso Cottage, un producto con un contenido de humedad que llega al 80%, Blanchette y col. (1996) encontraron un 17% del contenido inicial de lactosa a los 29 días de maduración. Se ha observado que, aún al utilizar cepas de *Streptococcus thermophilus* galactosa positivas para la manufactura de queso Mozzarella, la galactosa se mantenía en concentraciones apreciables, ya que su liberación es continua mientras se encuentre lactosa presente en el medio (Hutkins y Morris, 1987; Thomas y Crow, 1984).

Otro factor a tener en cuenta es el período de maduración, que en quesos blandos es menor que en quesos semiduros, por lo que resulta improbable el desarrollo de una flora NSLAB en niveles suficientes para metabolizar la galactosa residual.

De esta manera, al tratarse el Pategrás de una variedad de queso semiduro, con menor contenido de humedad que los quesos blandos y un período de maduración que puede duplicar fácilmente el de la mayoría de las variedades de aquéllos, no resulta sorprendente la ausencia de glucosa o lactosa residuales a los 60 días de maduración.

Con respecto a las bacterias probióticas se sabe que, salvo excepciones, la mayoría de los lactobacilos (se trate o no de cepas probióticas) son capaces de metabolizar la galactosa (De Vuyst, 2000). Sin embargo, no se han encontrado trabajos centrados en la

evolución de la concentración de galactosa durante la maduración de quesos con adición de lactobacilos probióticos. Con respecto a las bifidobacterias, en cambio, se ha postulado que su actividad  $\beta$ -galactosidasa es responsable en quesos de un mayor consumo inicial de la lactosa, con una mayor producción de galactosa al comienzo de la maduración, tanto en variedades semiduras (Cheddar; Daigle y col., 1999) como blandas (Crescenza; Gobbetti y col., 1998). Asimismo, una elevada actividad  $\beta$ -galactosidasa fue también encontrada en Canestrato Pugliese, una variedad de queso duro elaborada con leche de oveja (Corbo y col., 2001). Gobbetti y col. (1998) observaron, no obstante la concentración inicial más elevada de galactosa en quesos con bifidobacterias, una mayor reducción en su concentración con respecto a los en quesos control durante la maduración; este efecto se atribuyó al metabolismo de las bifidobacterias y la microflora endógena. En queso Cheddar no se observó una reducción, sin embargo, aún a las 12 semanas de maduración, si bien los valores no superaron los 0,8 g Kg de queso<sup>-1</sup> (Daigle y col., 1999).

En el presente trabajo, el hecho de que las poblaciones de los fermentos probióticos, adicionados como cultivos adjuntos en los quesos Pategrás experimentales, hayan permanecido elevadas a lo largo de toda la maduración, estaría asegurando la casi completa metabolización de la galactosa. Una posible contribución de la flora NSLAB, no determinada en quesos experimentales, durante la maduración de los mismos, no puede ser descartada. De cualquier manera, las poblaciones NSLAB en quesos T fueron siempre menores que las de bacterias probióticas en quesos experimentales, de modo que en estos últimos, la metabolización de la galactosa residual podría haberse dado probablemente en etapas mas tempranas de la maduración.

## **7. Análisis sensoriales**

Los quesos Pategrás elaborados sin adición de fermentos probióticos presentaron buenas características sensoriales, tanto de aspecto, aroma y sabor como de textura, cuando fueron ensayados en un análisis sensorial descriptivo por un panel entrenado. En efecto, la buena puntuación asignada al “aspecto de la masa” está de acuerdo con la ausencia de ojos, que no deberían estar presentes en quesos Pategrás elaborados con cultivos iniciadores de adición directa en tina y sin recurrir al uso de bacterias propiónicas como fermentos adjuntos (Zalazar y col., 1999). Asimismo, la intensidad del color del queso resultó moderada, característica de variedades semiduras, las cuales tienen períodos de maduración y contenidos de humedad intermedios entre quesos



blandos, de mayor humedad y maduración breve (mas claros), o duros, con menor contenido de humedad y maduración mas prolongada (más oscuros). Asimismo, el aroma, el gusto ácido y el gusto a crema tuvieron puntuaciones intermedias, mientras que el gusto residual resultó muy poco persistente, conforme al sabor suave atribuido al queso Pategrás (Zalazar y col., 1999).

En referencia a la descripción sensorial de atributos de textura, los quesos T presentaron una elasticidad y una capacidad de la masa para ligarse (cohesividad) moderadas, mientras que las irregularidades de la masa al cortarla fueron también intermedias. En general, estos resultados no presentan discrepancias con las características fisicoquímicas de esta variedad de queso (Zalazar y col., 1999).

La aceptabilidad de un alimento puede definirse como una actitud positiva hacia el alimento y/o su consumo real por parte del consumidor. Puede determinarse por la preferencia o agrado de un ítem específico, y no resulta indispensable realizar la comparación con otro producto (Resurrección, 1998). El test de aceptabilidad de los consumidores lleva a cabo una estimación en función de las propiedades sensoriales del producto, y se realiza normalmente sobre un panel reducido de personas. Cuando se llevan a cabo ensayos de este tipo, debe tenerse en cuenta que los consumidores presentan, por naturaleza, una elevada heterogeneidad de acuerdo a factores tales como sexo, edad, locación geográfica, raza y nacionalidad, por lo que un elevado número de personas es necesario para obtener un grado de confianza aceptable en los resultados (Drake, 2007). Las grandes empresas utilizan entre 100 y 500 personas cuando requieren tomar decisiones importantes en cuanto a la comercialización de un producto. Obviamente, los estudios de investigación no poseen, por lo general, financiamiento suficiente o la disponibilidad de dicha cantidad de gente. No obstante, existe un amplio consenso en cuanto a que una encuesta sobre al menos 50 participantes, resulta adecuada para obtener conclusiones confiables cuando se estudia el gusto o la preferencia (Lawless y Heymann, 1999). En el presente trabajo, la cantidad de personas encuestadas (114) fue de más del doble que dicho mínimo establecido. Por otro lado, este ensayo por sí solo no garantiza el éxito comercial a gran escala en el mercado, debido a que la presentación, el precio final y la publicidad son algunos de muchos factores que pueden influenciar notoriamente las ventas. Sin embargo, sus resultados resultan de utilidad como punto de partida para el desarrollo de un producto nuevo (Resurrección, 1998).

La aceptabilidad de los quesos Pategrás elaborados en forma tradicional se ensayó (junto a diferentes quesos experimentales) en tres días diferentes. Es importante destacar que los promedios ponderados, obtenidos a partir de la escala hedónica utilizada, resultaron muy similares entre los quesos T de los tres ensayos, lo que indica que el grado de aceptabilidad fue constante para productos elaborados en días diferentes. Los puntajes fueron muy levemente inferiores a 7, que en la escala empleada corresponde a la opción “me gusta moderadamente”. De la misma manera, analizando los histogramas de frecuencia de aceptabilidad, la moda recae en la opción “me gusta moderadamente” en dos de los ensayos, mientras que en el restante corresponde a “me gusta mucho”. Sin embargo, en este último ensayo, así como en uno de los anteriores, la curva de frecuencia de distribuciones fue bimodal, con un máximo menor en “me disgusta poco”. Esto pone en evidencia la presencia de dos grupos diferentes de consumidores dentro de la población encuestada. No obstante, ésta fue la misma para los tres ensayos, requisito importante para la validez de los resultados obtenidos en este tipo de análisis (Resurrección, 1998).

Con respecto a los quesos experimentales, prácticamente no presentaron diferencias con respecto a los quesos Pategrás elaborados en forma tradicional, tanto en los atributos sensoriales descriptivos, analizados por el panel sensorial entrenado, como en los ensayos de aceptabilidad, realizados a través de la encuesta sobre 114 personas.

Las cepas ensayadas en los análisis sensoriales descriptivos fueron *Lactobacillus acidophilus* A y C (ensayos 1 y 5), *Lactobacillus paracasei* (ensayo 2), *Bifidobacterium lactis* (ensayo 4) y el fermento probiótico mixto (ensayo 8). Ninguna de las cepas, ya se trate de miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* o la combinación del ensayo 8, produjo cambios notables en los quesos experimentales con relación a quesos T. A pesar de las pocas diferencias significativas encontradas en algunos casos aislados, todos los puntajes para un determinado atributo se mantuvieron dentro de un rango limitado, de 2 unidades como máximo, dentro de la escala utilizada (1-9). Esto fue válido tanto para atributos de apariencia, aroma y sabor, como para aquellos de textura.

En los análisis sensoriales de aceptabilidad se estudiaron las mismas cepas que en los análisis sensoriales descriptivos, a excepción de *Lactobacillus acidophilus* C (ensayo 5). Se encontraron diferencias muy pequeñas con relación a los quesos testigo en la aceptabilidad media calculada. De esta manera, todos los quesos probióticos, tanto E1 como E2, fueron catalogados, al igual que los quesos T, entre las opciones “me gusta poco” y “me gusta moderadamente”. Al igual que los quesos Pategrás tradicionales,

aquéllos con probióticos presentaron una elevada “aceptabilidad positiva” (definida como la sumatoria de casos correspondientes a los diferentes niveles de “me gusta...”), con porcentajes similares entre ambos tipos. Finalmente, salvo diferencias muy sutiles, los histogramas de frecuencia de aceptabilidad fueron similares entre quesos con y sin adición de fermentos probióticos.

Es necesario destacar que, debido a limitaciones experimentales, no era posible repetir para las determinaciones sensoriales todos las cepas ensayadas en quesos destinados a análisis fisicoquímicos. De este modo, una de las cepas descartadas para la fabricación de quesos destinados al análisis sensorial fue *Lactobacillus acidophilus* B (ensayo 3), la única que produjo un descenso del pH estadísticamente significativo en quesos de 60 días de maduración. Por esta razón, hubiera probablemente acusado puntajes más bajos en atributos de aroma, sabor y textura, así como peores resultados en el ensayo de aceptabilidad. Sin embargo, los ensayos sensoriales se planificaron priorizando la obtención de resultados positivos para los quesos experimentales, antes que la determinación de diferencias significativas debidas a defectos en el producto, y por esta razón dicha cepa no fue, en este caso, seleccionada para su análisis.

Los ensayos sensoriales realizados en quesos probióticos con adición de diversas cepas de bifidobacterias arrojaron resultados muy diversos. Por un lado, Dinakar y Mistry (1994) no encontraron diferencias entre quesos Cheddar con y sin adición de bifidobacterias, luego del análisis de atributos de aroma, sabor (tipo e intensidad), apariencia y textura, para lo cual postularon que la actividad de las bifidobacterias es muy baja durante la maduración de los quesos, dado que de otra manera la producción de ácido acético en queso se hubiese visto reflejada en una disminución de los puntajes asignados al sabor. De la misma manera, en otro trabajo realizado en queso Cheddar, un panel no fue capaz de distinguir quesos con y sin bifidobacterias, de acuerdo a sus características organolépticas (Daigle y col., 1999). Sin embargo, Mc Brearty y col. (2001) encontraron un desarrollo de aroma en etapas más tempranas de la maduración en quesos Cheddar cuando los mismos se elaboraron con adición de la cepa probiótica *Bifidobacterium lactis* Bb-12, lo que indicaría una maduración acelerada debido a la presencia de bifidobacterias. Por otra parte, se encontró un efecto negativo en los puntajes relativos a textura en quesos experimentales, lo cual se atribuyó a una mayor velocidad de acidificación durante el proceso de elaboración. No obstante, todos los quesos de este estudio, tanto testigos como experimentales, tuvieron puntajes para aroma, sabor y textura que superaron los mínimos requeridos para la comercialización

del queso Cheddar (Mc Brearty y col., 2001). En Crescenza, un queso blando de corto período de maduración, la adición de cepas de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium longum* (solas y en combinación) produjo modificaciones muy leves en la evaluación sensorial, no encontrándose diferencias para atributos de apariencia y textura (Gobbetti y col., 1998). Sólo los quesos con *Bifidobacterium bifidum* agregado en forma individual difirieron en forma negativa de los quesos testigo en cuanto a aroma, lo cual se relacionó con la mayor cantidad de ácido acético encontrada en los mismos. En otra variedad de quesos blandos, Cottage, los consumidores prefirieron de manera significativa tanto el producto elaborado en forma tradicional, como con el agregado de *Bifidobacterium infantis* en un sustrato previamente fermentado hasta pH 5,5 antes de la elaboración de quesos, mientras que cuando dicho sustrato se fermentó a pH 4,5 la aceptabilidad de los quesos probióticos disminuyó significativamente (Blanchette y col., 1996). El queso Gouda es un producto con características muy similares al queso Pategrás, el cual es también llamado “Queso Gouda Argentino” por el Código Alimentario Argentino (2006). A diferencia del presente trabajo de tesis, Gomes y col. (1995) reportan un detrimento notorio de la calidad sensorial en quesos Gouda con adición de *Bifidobacterium sp.* cepa Bo. En este trabajo se encontraron altos niveles de bacterias probióticas en los quesos a lo largo de la maduración, en relación a la presencia de un hidrolizado de leche que actúa como factor de crecimiento de las bifidobacterias. Sin embargo, aún en bajos niveles, este factor bifidogénico se relacionó con una elevada generación de ácido acético, y de este modo con la alteración de las características sensoriales normales del queso Gouda. Finalmente, un panel de 13 jueces evaluó muestras de queso Canestrato Pugliese con y sin adición de bifidobacterias, no encontrando diferencias significativas entre ambos para atributos de apariencia, color, características mecánicas, aroma, sabor y textura. Estos resultados resultaron concordantes con la ausencia de diferencias entre ambos tipos de queso, en lo referente a la proteólisis y lipólisis, durante la maduración (Corbo y col., 2001).

En nuestro trabajo no se realizó la determinación de ácidos láctico y acético en quesos con bifidobacterias; sin embargo, los mismos tuvieron valores normales de pH y atributos sensoriales comparables con los quesos testigo, a diferencia de los resultados obtenidos por Gomes y col. (1995) para queso Gouda. De este modo, habiéndose verificado una alta carga de bifidobacterias a lo largo de la maduración, concluimos que se trata de una cepa comercial con una limitada capacidad para sintetizar ácidos

orgánicos, o bien que dicha actividad no se hizo presente en los quesos a lo largo de la maduración, debido a las condiciones ambientales presentes en la matriz alimentaria.

Con respecto a la adición de diversas cepas de lactobacilos probióticos en quesos y su influencia sobre las características sensoriales, nuevamente el Cheddar resulta la variedad más estudiada. (Gardiner y col., 1998 y 2002; Lynch y col., 1999).

Gardiner y col. (1998 y 2002) no detectaron una influencia significativa del agregado de diversas cepas de *Lactobacillus paracasei*, sobre parámetros de aroma, sabor y textura en queso Cheddar, mientras que una cepa probiótica de *Enterococcus faecium* determinó que quesos Cheddar resultaran con mejor aroma y sabor que los quesos testigo correspondientes, si bien las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas (Gardiner y col., 1999). Por otro lado, Lynch y col. (1999) determinaron una mayor percepción en el aroma, y sabores amargo y a crema más intensos en quesos Cheddar con adición de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* y *Lactobacillus plantarum*, lo cual se relacionó con una aceleración en la maduración de los quesos, al igual que lo reportado posteriormente por Mc Brearty y col. (2001) para quesos Cheddar con incorporación de bifidobacterias. En el estudio llevado a cabo por Lynch y col. (1999), resultó interesante que los dos fermentos probióticos ensayados afectaron los perfiles sensoriales de los quesos de manera muy similar. El Soda y col. (2000) reportaron un mayor sabor amargo más pronunciado en queso Cheddar con adición de lactobacilos como fermentos adjuntos, lo cual se relacionó con la proteólisis secundaria, a través de la producción de péptidos amargos por parte del complejo sistema de peptidasas presente en las cepas de lactobacilos utilizadas.

Dentro de variedades semiduras, encontramos trabajos realizados sobre quesos Pikantne (Songisepp y col., 2004) y queso Blanco, un queso semiduro de origen turco (Kasimoğlu y col., 2004). En queso Pikantne se ensayó una cepa de *Lactobacillus fermentum* con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, mediante su agregado en la leche junto con el fermento primario o bien directamente sobre la cuajada luego de separar el suero. Los quesos experimentales obtenidos por ambas metodologías mostraron puntajes para aroma y sabor algo menores que el queso testigo, pero ambos tipos fueron comparables (Songisepp y col., 2004). La variante donde el cultivo probiótico se adicionó junto al fermento primario en la leche de elaboración, fue la que obtuvo calificaciones más altas, demostrando en este caso una influencia de la metodología de adición sobre el desarrollo de las características sensoriales, que no fue observado en el presente estudio. En queso Blanco, Kasimoğlu y col. (2004)

encontraron diferencias de aroma y sabor en quesos elaborados sin y con una cepa probiótica de *Lactobacillus acidophilus*, y madurados de dos formas diferentes. Los puntajes fueron significativamente mayores en quesos con probióticos, para la misma forma de maduración (envasado al vacío o en salmuera). Sin embargo, los quesos testigo envasados al vacío tuvieron puntajes mayores que los probióticos mantenidos en salmuera, lo que indica que las condiciones de maduración pueden ser tanto o más importantes que la presencia de la cepa probiótica. En este trabajo, las diferencias encontradas en los parámetros sensoriales se atribuyeron a diferencias en el nivel de proteólisis, factor mucho más importante que la lipólisis en este tipo de queso (Kasimoğlu y col., 2004). Dentro de los quesos blandos con incorporación de lactobacilos probióticos, Buriti y col. (2005) encontraron que una de dos variantes del queso fresco Minas elaboradas con adición de *Lactobacillus acidophilus*, fue descrita como más agradable que los quesos controles del mismo ensayo en una encuesta de aceptabilidad de consumidores, si bien no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes quesos. Por otro lado, cuando ambos quesos probióticos fueron comparados con tres marcas comerciales de queso fresco Minas, estos últimos resultaron mucho más populares (Buriti y col., 2005).

En quesos con adición simultánea de lactobacilos y bifidobacterias probióticas, Gomes y Malcata (1998) reportaron altos puntajes en la evaluación de aroma en Queijo de Cabra con *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* cepa Ki. La adición de hidrolizados de leche y los niveles de adición del inóculo del fermento primario fueron las variables más significativas con relación al desarrollo de aroma. A diferencia de un trabajo anterior sobre queso Gouda con adición de bifidobacterias (Gomes y col., 1995), el agregado de hidrolizados de leche no afectó negativamente la textura, aroma y sabor del Queijo de Cabra. Las mejoras en el aroma se atribuyeron a una mayor proteólisis secundaria, en quesos con mayor contenido de péptidos pequeños y aminoácidos libres. Asimismo, la presencia de elevadas concentraciones relativas de estos compuestos en los quesos se relacionó con una mayor intensidad en el sabor residual (Gomes y Malcata, 1998). Ong y col. (2007b) elaboraron quesos Cheddar de manera tradicional y con la incorporación de dos cepas de *Bifidobacterium*, dos cepas del grupo casei y dos cepas de *Lactobacillus acidophilus*, todas en forma individual (6 ensayos) y en dos combinaciones de tres cepas (2 ensayos con una cepa de cada grupo en cada uno). A excepción de una de las cepas de *Lactobacillus acidophilus* ensayada en forma

individual, los panelistas sensoriales detectaron los quesos probióticos significativamente diferentes de los quesos testigo.

Por otro lado, la aceptabilidad del queso con una cepa de *Lactobacillus casei* fue significativamente menor que para quesos testigo, siendo el gusto amargo y el gusto agrio los principales defectos encontrados. La presencia de bifidobacterias resultó en puntajes más altos asignados al gusto a vinagre pero, sin embargo, los panelistas no fueron capaces de detectar las diferencias en las concentraciones de ácido acético entre los diferentes tipos de queso. En este trabajo, al igual que en la presente tesis, no se encontraron correlaciones positivas entre parámetros fisicoquímicos y puntajes asignados a atributos sensoriales, a excepción de una mayor percepción de sabor amargo en los quesos con el menor porcentaje de sal en la humedad del queso (Ong y col., 2007b).

Como puede resumirse, al igual que en los quesos con adición de bifidobacterias, cuando se ensayaron cepas probióticas de lactobacilos, ya sea solos o en combinación con aquéllas, los resultados sensoriales obtenidos fueron muy dispares, con modificación o no de atributos de aroma, sabor y textura, en forma muy variable entre distintas variedades de quesos y entre cepas diferentes. Esto remarca el hecho, previamente mencionado, de que cada sistema cepa probiótica-queso debe ser analizada por separado, no siendo válidas las extrapolaciones tanto de la misma cepa a otras variantes de queso diferentes, como a otras cepas probióticas, aún del mismo género, en el mismo tipo de queso (Corbo y col., 2001; McBrearty y col., 2001).

De cualquier manera, un factor común a los trabajos analizados es que, cuando se produjeron modificaciones en los perfiles sensoriales, las variaciones fueron en general pequeñas, no llegando muchas veces a ser detectadas por el consumidor promedio. En el presente estudio, en concordancia con la mayor parte de los mencionados hasta aquí, ninguna cepa probiótica produjo alteraciones sensoriales notables con respecto al queso Pategrás tradicional. Ya que esto fue válido para ambas formas de adición durante la elaboración de quesos, aquella más conveniente sería la ensayada en quesos E1, debido a su sencillez. De esta manera, sería factible la producción de quesos Pategrás probióticos que tendrían virtualmente la misma popularidad entre los consumidores que el producto tradicional comercializado actualmente, con el valor agregado del consumo de microorganismos que poseen un efecto positivo sobre la salud.

## **6. Conclusiones**



En el presente trabajo de Tesis se logró el desarrollo tecnológico adecuado para la incorporación exitosa de diversas cepas de bacterias probióticas en queso Pategrás Argentino, la variedad de queso semiduro más comercializada en nuestro país, y para el cual no existían, sin embargo, antecedentes del agregado de tales fermentos adjuntos. Se ensayaron siete bacterias probióticas diferentes en ensayos individuales: tres cepas comerciales de *Lactobacillus acidophilus*, tres lactobacilos pertenecientes al grupo casei (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*) y una cepa de *Bifidobacterium bifidum*. A excepción de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, aislada en el INLAIN, se trató en todos los casos de fermentos comerciales ampliamente utilizados por la industria láctea. Además, se realizó una experiencia combinando tres cepas probióticas (una de cada grupo) seleccionadas en base a los resultados obtenidos en los ensayos individuales.

La viabilidad de los cultivos probióticos en el medio ambiente del queso mostró variaciones de acuerdo al tipo de cepa utilizada, siendo en general los niveles de viabilidad celular para el grupo de *Lactobacillus casei* > *Lactobacillus acidophilus* > *Bifidobacterium lactis*. De cualquier manera, aún *Bifidobacterium lactis* mantuvo niveles muy superiores a los mínimos recomendados para un alimento probiótico (aproximadamente  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> o g<sup>-1</sup>), durante todo el período de maduración estudiado. El empleo de una combinación de 3 cepas (*Lactobacillus casei* + *Lactobacillus acidophilus* C + *Bifidobacterium lactis*) no afectó sensiblemente la viabilidad de cada una de ellas en relación a los ensayos donde se incorporaron como fermento adjunto único.

Los quesos probióticos no tuvieron diferencias significativas con respecto a los quesos testigo en la composición general (proteína total, materia grasa, humedad, sal), pero la determinación de pH reveló una mayor acidificación en quesos experimentales, en tres casos. Sin embargo, dos de esas diferencias sólo fueron evidentes al inicio de la maduración, no verificándose ya a partir de la mitad de este período; ambas correspondieron a quesos con probióticos adicionados tras su incubación en el sustrato lácteo graso. Sólo *Lactobacillus acidophilus* B produjo una mayor acidificación al final de la maduración, para ambas formas de adición a los quesos, lo cual es un resultado negativo dado que puede traducirse en un deterioro del sabor, aroma y/o textura del producto final.

Con respecto a la lipólisis, en todos los quesos al inicio de la maduración se observaron niveles y concentraciones relativas de los distintos AGL analizados,

similares a las encontradas en grasa de leche. Los quesos sin probióticos presentaron, a lo largo de la maduración, aumentos muy leves de los AGL totales, indicando una lipólisis muy suave a los 60 días, característica de esta variedad. Asimismo, ninguna de las cepas probióticas ensayadas produjo aumentos significativos en la lipólisis de los quesos, ni alteró el perfil de AGL típico del queso Pategrás. Dichos resultados, no obstante, eran previsibles dada la muy baja o nula actividad lipolítica que se sabe que poseen estos microorganismos.

Asimismo, el contenido de colesterol, analizado para los ensayos donde se utilizaron (en forma individual) *Lactobacillus acidophilus* A, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis*, no fue menor en ninguno de los dos tipos de quesos experimentales a los 60 días de maduración. Esto permite concluir que las cepas probióticas ensayadas no son capaces de metabolizar este compuesto, al menos en el medio ambiente del queso Pategrás durante su maduración.

Las concentraciones de galactosa en quesos con las cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* A, B y C, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum*, fueron extremadamente bajas a los 60 días de maduración, al igual que en los quesos testigos, no pudiéndose determinar diferencia alguna debida a la presencia de los probióticos. Los azúcares reductores totales, determinados en las mismas muestras, se encontraron en concentraciones iguales a las de galactosa, por lo que se supone que no quedaron residuos de otros azúcares reductores (lactosa, glucosa), en ningún queso al final de la maduración. Dado que se conoce que la mayoría de las cepas de *Streptococcus thermophilus* no utilizan la galactosa, posiblemente este azúcar haya sido metabolizado en gran medida por la flora NSLAB. En quesos testigo, este hecho explicaría su baja concentración, mientras que en quesos con probióticos, probablemente haya sido metabolizada tanto por dichos fermentos como por la flora NSLAB.

Los perfiles sensoriales descriptivos de los quesos con agregado de probióticos mostraron, en general, pocas diferencias respecto de los quesos testigo, tanto cuando se utilizaron bifidobacterias, lactobacilos o la mezcla de tres cepas probióticas. Las diferencias en relación a descriptores de aspecto, aroma y sabor, se encontraron en general para quesos con lactobacilos, especialmente *Lactobacillus paracasei*. Se detectaron diferencias aisladas en los descriptores de textura, siendo positivas para *Lactobacillus acidophilus* A y *Bifidobacterium lactis*, y negativas para *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* B y la combinación de tres cepas probióticas.

La aceptabilidad de los quesos experimentales elaborados con las cepas *Lactobacillus acidophilus* A, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium lactis* y la mezcla de tres cepas en forma liofilizada, y de aquéllos elaborados con *Lactobacillus acidophilus* A y la mezcla de tres cepas en el sustrato lácteo graso, fue positiva en alrededor de un 80% de los casos, al igual que para los quesos testigo. El mínimo y el máximo registrados fueron de 71,0% y 89,4%, respectivamente. De acuerdo a la escala hedónica utilizada, todas las muestras analizadas tuvieron promedios ponderados que indicaron una aceptabilidad intermedia entre las opciones “me gusta poco” y “me gusta moderadamente”, sin diferencias significativas entre quesos sin y con probióticos, ni respecto de la metodología utilizada para su adición. Teniendo en cuenta la elevada aceptabilidad encontrada, podemos suponer que la comercialización de quesos Pategrás con la adición de tales cepas probióticas, no se vería negativamente afectada por el gusto del consumidor promedio, con relación al queso tradicional.

Con respecto a la forma de adición de las bacterias probióticas durante el proceso de manufactura de los quesos, se concluye que el agregado directo del cultivo en forma liofilizada resulta mucho más conveniente, por varios motivos. En primer lugar, las poblaciones celulares obtenidas no fueron, para ninguna de las cepas estudiadas y sus combinaciones, significativamente mayores en los quesos donde se utilizó el sustrato lácteo graso. Además, esta metodología ya resulta lenta y tediosa a escala planta piloto, y dicho problema sería aún más notorio a una escala de producción industrial. Por otro lado, el paso de propagación intermedia requerido incrementa el riesgo de posibles infecciones fágicas, con los graves problemas que esto trae aparejado. Sumado a todo lo anteriormente mencionado, los casos de acidificación excesiva en quesos con probióticos ocurrieron, en general, cuando los mismos se propagaron en el sustrato lácteo graso. Finalmente, no se encontraron diferencias fisicoquímicas en la maduración, en lo referente al nivel y tipo de lipólisis, contenido de galactosa y reducción de los niveles de colesterol, ni características sensoriales mejoradas que justifiquen la utilización de un paso de fermentación intermedia.

Como síntesis, y teniendo en cuenta: i) la gran tendencia al desarrollo de alimentos funcionales que existe actualmente a escala mundial, ii) el gran porcentaje que ocupan los alimentos con probióticos dentro de este mercado, iii) la existencia de un único queso probiótico en nuestro país, y iv) el hecho de que este producto es un queso blando que no se ha caracterizado desde el punto de vista de sus propiedades sensoriales, podemos decir que el trabajo desarrollado en la presente Tesis ha

contribuido significativamente al desarrollo de un producto novedoso, que ha mostrado buenos resultados tras su evaluación tanto desde el punto de vista de la viabilidad de las bacterias probióticas, como del impacto que poseen estas bacterias sobre las transformaciones de la materia grasa durante la maduración. Además ha revelado, así como el queso Pategrás tradicional, buenas características sensoriales y una aceptabilidad media-alta por parte del público en general.

## **7. Apéndice**

**Apéndice 1.** Concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) determinadas por cromatografía gaseosa en cada muestra individual para los ocho ensayos realizados. Promedio de las concentraciones calculadas para tres corridas cromatográficas independientes.

Ensayo	Fecha (réplica)	Queso	Maduración (días)	Concentraciones de AGL (mg/Kq de queso <sup>-1</sup> )									
				C <sub>6:0</sub>	C <sub>8:0</sub>	C <sub>10:0</sub>	C <sub>12:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	Total
1	10-dic-2002 (#1)	T	3	17,5	18,5	41,6	53,9	205,2	611,9	231,5	638,7	87,1	1905,9
			60	31,4	26,6	55,0	71,6	220,0	614,3	262,5	699,2	92,7	2073,3
		E1	3	18,2	18,6	43,7	57,0	212,3	625,2	247,1	683,8	87,6	1993,5
			60	39,4	30,1	64,8	89,7	204,9	647,7	289,0	707,4	84,8	2157,8
		E2	3	13,6	16,2	37,4	49,5	167,7	541,8	220,2	584,1	75,9	1706,4
			60	24,5	21,5	49,2	67,5	245,4	685,1	245,5	720,5	102,1	2161,3
	25-feb-2003 (#2)	T	3	41,8	35,6	84,7	114,4	217,3	720,0	302,9	675,2	55,2	2246,9
			60	31,9	29,4	72,2	98,3	261,5	747,0	302,2	777,4	84,8	2404,8
		E1	3	48,3	38,3	94,9	126,1	207,5	694,8	294,8	658,6	58,4	2221,8
			60	33,1	31,5	73,8	97,4	240,6	707,7	284,8	750,4	72,2	2291,6
		E2	3	27,7	25,8	62,7	80,7	268,1	762,9	298,3	743,8	85,1	2355,1
			60	63,8	58,4	111,5	149,9	327,4	936,5	376,5	1254,8	115,7	3394,4
	18-mar-2003 (#3)	T	3	34,0	29,0	69,4	89,4	223,3	745,8	322,4	903,4	73,5	2490,2
			60	29,4	26,7	64,0	86,9	237,3	740,2	287,6	953,3	76,9	2502,4
		E1	3	34,8	29,2	66,3	85,2	194,0	649,5	280,1	715,3	51,8	2106,1
			60	26,1	25,2	60,0	80,8	218,6	691,3	295,6	945,7	75,5	2418,9
		E2	3	37,1	28,1	64,8	81,6	242,9	771,9	331,0	925,1	82,6	2565,2
			60	23,2	23,2	57,5	78,9	270,6	830,3	325,6	1050,3	89,3	2749,0

**Apéndice 1 (cont.).** Concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) determinadas por cromatografía gaseosa en cada muestra individual para los ocho ensayos realizados. Promedio de las concentraciones calculadas para tres corridas cromatográficas independientes.

Ensayo	Fecha (réplica)	Queso	Maduración (días)	Concentraciones de AGL (mg/Kq de queso <sup>-1</sup> )									Total
				C <sub>6:0</sub>	C <sub>8:0</sub>	C <sub>10:0</sub>	C <sub>12:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	
2	08-abr-2003 (#1)	T	3	22,2	21,4	48,9	62,0	178,0	555,8	220,0	640,2	53,0	1801,8
			60	33,9	27,2	56,7	68,0	258,8	631,2	230,3	738,9	58,7	2103,7
		E1	3	25,4	26,2	66,2	84,0	210,7	617,0	232,1	717,1	63,5	2042,1
			60	30,2	27,0	62,5	76,4	277,6	657,1	233,4	619,1	70,8	2054,1
		E2	3	30,1	27,9	62,7	79,7	191,8	604,6	257,4	609,2	39,4	1902,7
			60	40,4	33,7	77,7	101,7	234,5	668,9	266,9	543,1	42,5	2009,5
	29-abr-2003 (#2)	T	3	26,0	27,7	53,0	75,0	310,6	694,4	237,3	898,4	104,0	2426,6
			60	62,5	44,2	95,9	108,6	425,7	1109,5	428,8	1274,4	108,4	3658,1
		E1	3	26,2	25,6	64,0	75,0	298,0	717,6	234,8	851,3	96,9	2389,5
			60	45,0	38,9	99,2	127,8	293,7	862,2	350,1	882,8	85,2	2785,0
		E2	3	23,8	24,5	59,4	70,6	281,3	698,0	247,3	795,4	87,5	2287,7
			60	46,3	42,3	111,4	141,7	349,8	1023,9	435,5	1024,7	99,3	3274,9
	27-may-2003 (#3)	T	3	18,4	15,2	44,8	49,0	45,5	417,3	202,7	382,0	2,0	1176,9
			60	48,2	35,7	76,3	88,3	342,2	870,4	329,6	1006,6	83,5	2880,9
		E1	3	27,1	25,1	61,8	66,1	385,3	818,3	237,4	985,5	130,2	2736,9
			60	24,2	22,8	61,1	72,8	343,3	773,2	252,0	899,4	128,5	2577,2
		E2	3	17,5	21,1	56,1	61,4	370,8	791,4	237,2	981,7	135,5	2672,6
			60	24,6	23,0	59,1	74,6	334,6	817,1	258,4	921,0	132,4	2644,9

**Apéndice 1 (cont.).** Concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) determinadas por cromatografía gaseosa en cada muestra individual para los ocho ensayos realizados. Promedio de las concentraciones calculadas para tres corridas cromatográficas independientes.

Ensayo	Fecha (réplica)	Queso	Maduración (días)	Concentraciones de AGL (mg/Kq de queso <sup>-1</sup> )									Total
				C <sub>6:0</sub>	C <sub>8:0</sub>	C <sub>10:0</sub>	C <sub>12:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	
3	24-jun-2003 (#1)	T	3	35,0	28,6	66,7	74,2	356,8	779,7	232,4	789,4	110,8	2473,5
			60	50,8	35,2	79,2	87,0	356,7	804,1	292,0	889,8	129,2	2724,0
		E1	3	33,0	29,4	72,0	82,6	301,4	721,6	235,5	744,1	116,2	2335,6
			60	33,5	24,2	55,4	63,9	284,6	688,0	252,0	625,0	96,6	2123,2
		E2	3	25,3	25,5	64,4	71,1	316,1	726,8	231,6	687,0	118,9	2266,5
			60	30,1	24,9	58,5	67,5	399,0	828,2	256,7	653,0	120,2	2438,1
	15-jul-2003 (#2)	T	3	25,0	24,3	62,4	81,1	234,1	704,7	286,1	840,0	106,2	2364,0
			60	31,9	31,9	76,0	102,2	235,2	669,8	248,4	533,7	55,2	1984,2
		E1	3	44,3	34,3	80,2	101,6	253,9	773,3	319,0	813,3	88,5	2508,4
			60	47,9	39,9	86,8	115,7	281,1	829,4	322,8	514,4	52,5	2290,4
		E2	3	45,3	39,3	84,4	106,3	245,2	729,9	287,7	423,5	49,4	2011,0
			60	47,5	39,7	90,3	115,7	270,4	754,9	286,3	424,7	51,9	2081,5
	09-mar-2004 (#3)	T	3	28,6	28,9	73,0	98,3	255,8	838,4	290,7	792,2	97,0	2502,9
			60	56,5	44,2	109,8	151,7	419,1	1266,8	427,3	1107,8	134,7	3717,8
		E1	3	25,6	28,0	79,3	112,3	277,3	850,6	297,2	794,7	101,2	2566,1
			60	51,1	42,0	104,9	142,5	506,5	1297,6	434,6	1027,9	147,9	3754,9
		E2	3	34,0	29,0	67,5	83,8	287,7	853,3	291,2	724,8	105,4	2476,7
			60	42,0	37,9	93,2	121,1	871,1	1563,8	423,0	956,3	212,4	4320,9



**Apéndice 1 (cont.).** Concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) determinadas por cromatografía gaseosa en cada muestra individual para los ocho ensayos realizados. Promedio de las concentraciones calculadas para tres corridas cromatográficas independientes.

Ensayo	Fecha (réplica)	Queso	Maduración (días)	Concentraciones de AGL (mg/Kq de queso <sup>-1</sup> )									Total
				C <sub>6:0</sub>	C <sub>8:0</sub>	C <sub>10:0</sub>	C <sub>12:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	
4	04-nov-2003 (#1)	T	3	34,0	28,6	57,9	77,3	180,8	547,4	204,8	187,4	27,6	1345,8
			60	46,8	37,5	78,7	80,0	291,2	794,2	271,7	515,5	82,2	2197,8
		E1	3	20,3	18,1	41,2	46,6	176,7	529,6	186,5	431,5	78,7	1529,3
			60	25,5	21,5	52,8	67,2	212,8	574,4	195,9	377,4	56,1	1583,7
		E2	3	14,8	14,3	33,8	39,2	179,0	509,8	168,6	397,6	80,2	1437,2
			60	22,8	18,3	42,1	51,8	222,5	576,2	188,1	400,1	69,6	1591,5
	02-dic-2003 (#2)	T	3	18,8	19,0	35,8	47,6	130,3	433,0	171,5	236,5	25,2	1117,6
			60	43,7	32,9	69,3	83,0	271,1	776,0	275,4	626,5	88,7	2266,5
		E1	3	31,9	26,4	55,5	71,7	178,2	581,9	227,6	325,6	35,4	1534,1
			60	41,9	29,8	60,4	68,0	248,1	727,3	252,5	566,3	77,6	2072,0
		E2	3	30,6	25,2	50,6	67,0	155,3	535,8	209,6	241,3	26,3	1341,8
			60	39,0	28,8	62,4	76,1	279,4	730,3	246,2	573,0	77,9	2113,2
	17-feb-2004 (#3)	T	3	27,6	24,4	46,7	56,4	238,0	737,5	254,9	618,6	79,4	2083,3
			60	40,1	28,4	57,7	68,4	341,8	932,4	318,9	796,9	96,6	2681,2
		E1	3	58,5	39,8	82,7	97,8	365,5	996,7	342,3	788,2	82,5	2854,0
			60	22,5	21,9	56,1	74,5	200,3	666,2	235,5	607,4	81,9	1966,3
		E2	3	44,5	30,7	63,0	72,3	321,0	954,2	319,9	733,6	85,3	2624,4
			60	35,0	28,7	59,5	74,0	278,0	836,2	282,9	667,9	75,3	2337,5

**Apéndice 1 (cont.).** Concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) determinadas por cromatografía gaseosa en cada muestra individual para los ocho ensayos realizados. Promedio de las concentraciones calculadas para tres corridas cromatográficas independientes.

Ensayo	Fecha (réplica)	Queso	Maduración (días)	Concentraciones de AGL (mg/Kq de queso <sup>-1</sup> )									
				C <sub>6:0</sub>	C <sub>8:0</sub>	C <sub>10:0</sub>	C <sub>12:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	Total
5	23-mar-2004 (#1)	T	3	34,6	28,9	60,3	73,9	395,8	1051,3	364,0	880,4	133,5	3022,6
			60	35,7	32,1	65,3	83,4	479,0	1089,9	315,7	896,7	133,3	3131,0
		E1	3	34,4	27,8	54,2	62,9	299,4	853,5	290,4	683,1	88,0	2393,7
			60	48,7	36,7	69,0	83,2	513,1	1193,3	404,8	932,1	120,2	3401,2
		E2	3	44,0	31,6	58,9	65,2	359,8	1023,7	372,8	875,2	103,0	2934,1
			60	53,4	37,9	69,5	82,1	496,5	1219,6	405,4	1158,3	143,8	3666,6
	13-abr-2004 (#2)	T	3	17,6	16,9	34,5	37,8	185,7	594,0	243,9	696,1	82,3	1908,8
			60	27,4	21,9	43,2	47,6	479,9	1005,4	298,0	1093,2	160,1	3176,7
		E1	3	24,5	20,1	41,0	45,6	205,7	649,2	258,0	731,8	83,4	2059,4
			60	53,6	37,3	69,3	78,5	440,8	1206,3	429,6	1314,9	147,4	3777,7
		E2	3	30,5	24,9	52,9	60,3	229,5	745,0	320,8	860,1	98,7	2422,7
			60	53,2	34,7	69,2	76,1	401,5	1080,1	408,6	1185,2	136,0	3444,5
	04-may-2004 (#3)	T	3	23,0	25,4	52,5	63,8	231,8	638,2	232,5	776,0	92,4	2135,7
			60	31,6	30,1	62,5	71,9	298,6	742,1	242,7	944,0	107,3	2530,9
		E1	3	23,6	22,5	52,8	61,8	246,8	687,5	273,4	721,5	87,0	2176,9
			60	31,6	27,5	59,8	70,6	254,5	696,1	254,8	663,1	84,6	2142,6
		E2	3	31,5	27,9	66,2	83,5	216,3	706,5	269,3	739,1	81,5	2221,8
			60	29,5	25,7	58,6	77,6	152,3	484,2	198,6	540,6	61,1	1628,3

**Apéndice 1 (cont.).** Concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) determinadas por cromatografía gaseosa en cada muestra individual para los ocho ensayos realizados. Promedio de las concentraciones calculadas para tres corridas cromatográficas independientes.

Ensayo	Fecha (réplica)	Queso	Maduración (días)	Concentraciones de AGL (mg/Kq de queso <sup>-1</sup> )									Total
				C <sub>6:0</sub>	C <sub>8:0</sub>	C <sub>10:0</sub>	C <sub>12:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	
6	18-may-2004 (#1)	T	3	20,9	26,3	69,1	91,4	197,4	605,5	226,1	665,1	84,0	1985,7
			60	24,1	28,0	71,8	96,2	250,6	682,1	240,9	753,4	98,6	2245,7
		E1	3	24,5	26,3	65,2	79,7	268,4	750,4	310,1	776,7	91,4	2392,7
			60	37,3	29,0	69,5	87,4	257,4	734,4	325,3	660,8	84,6	2285,8
		E2	3	32,4	29,3	73,0	98,1	170,3	561,9	234,1	589,2	69,8	1858,0
			60	48,1	34,5	82,9	107,8	251,1	693,5	269,6	723,6	95,5	2306,6
	08-jun-2004 (#2)	T	3	35,0	35,0	85,3	111,4	189,8	612,9	247,0	600,6	79,6	1996,6
			60	36,8	36,7	79,8	107,7	260,3	746,0	283,5	829,7	111,8	2492,4
		E1	3	38,0	32,6	72,3	88,8	254,3	757,5	305,5	717,4	102,0	2368,6
			60	66,3	46,8	98,0	119,5	605,1	1456,6	495,9	1051,8	235,5	4175,4
		E2	3	56,9	48,4	94,0	115,4	427,5	1172,3	383,4	1064,6	156,9	3519,2
			60	240,4	191,0	332,4	407,3	1482,7	3050,9	746,4	2825,1	404,4	9680,7
	03-ago-2004 (#3)	T	3	42,0	36,0	84,5	110,6	209,4	658,1	251,6	545,3	81,6	2019,1
			60	61,0	50,4	114,9	146,0	290,7	795,1	283,0	734,7	109,8	2585,6
		E1	3	30,7	30,1	74,7	86,8	336,6	857,1	287,2	760,9	135,3	2599,3
			60	92,6	77,6	188,3	213,6	647,2	1475,1	470,0	1434,9	207,8	4807,0
		E2	3	14,7	19,2	54,9	77,1	148,0	481,8	202,6	437,0	69,4	1504,7
			60	51,2	40,7	108,2	138,8	324,9	801,4	298,1	676,1	119,5	2558,9

**Apéndice 1 (cont.).** Concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) determinadas por cromatografía gaseosa en cada muestra individual para los ocho ensayos realizados. Promedio de las concentraciones calculadas para tres corridas cromatográficas independientes.

Ensayo	Fecha (réplica)	Queso	Maduración (días)	Concentraciones de AGL (mg/Kq de queso <sup>-1</sup> )									
				C <sub>6:0</sub>	C <sub>8:0</sub>	C <sub>10:0</sub>	C <sub>12:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	Total
7	24-ago-2002 (#1)	T	3	30,9	27,0	66,3	83,9	215,7	599,7	239,9	624,4	115,6	2003,4
			60	35,1	35,9	85,1	109,6	403,9	883,4	328,1	791,4	158,6	2831,1
		E1	3	38,0	31,3	75,4	90,3	243,4	702,4	280,4	633,4	101,3	2195,8
			60	40,9	33,9	84,6	108,5	357,1	897,9	369,5	803,0	146,4	2841,9
		E2	3	42,9	39,9	98,3	132,8	435,0	1002,0	327,6	925,2	173,8	3177,6
			60	47,7	38,8	92,8	124,9	526,4	1224,6	409,1	1120,2	190,7	3775,2
	14-set-2004 (#2)	T	3	14,4	19,3	49,7	62,8	204,0	592,7	237,9	562,9	82,1	1825,8
			60	31,2	32,9	82,9	109,5	223,4	633,3	250,7	719,8	103,8	2187,5
		E1	3	13,9	19,7	54,7	74,8	191,0	602,5	225,3	542,6	92,8	1817,4
			60	35,9	33,9	80,2	103,3	343,3	880,6	277,0	730,4	124,4	2609,0
		E2	3	17,6	19,9	55,9	74,6	132,3	444,7	189,1	421,7	63,1	1419,0
			60	24,1	23,2	61,9	80,8	209,0	568,8	256,9	531,6	95,1	1851,4
	05-oct-2004 (#3)	T	3	22,7	23,2	58,0	73,3	209,9	596,2	238,9	593,6	98,8	1914,6
			60	33,2	34,4	84,0	109,6	313,6	758,4	289,4	755,6	131,2	2509,3
		E1	3	25,9	25,5	65,0	82,6	217,2	652,5	252,9	588,0	97,1	2006,6
			60	38,4	33,9	82,4	105,9	350,2	889,2	323,2	766,7	135,4	2725,4
		E2	3	30,3	29,9	77,1	103,7	283,6	723,3	258,4	673,5	118,5	2298,3
			60	35,9	31,0	77,3	102,8	367,7	896,7	333,0	825,9	142,9	2813,3

**Apéndice 1 (cont.).** Concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) determinadas por cromatografía gaseosa en cada muestra individual para los ocho ensayos realizados. Promedio de las concentraciones calculadas para tres corridas cromatográficas independientes.

Ensayo	Fecha (réplica)	Queso	Maduración (días)	Concentraciones de AGL (mg/Kq de queso <sup>-1</sup> )									
				C <sub>6:0</sub>	C <sub>8:0</sub>	C <sub>10:0</sub>	C <sub>12:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	Total
8	30-nov-2004 (#1)	T	3	17,7	18,3	44,2	56,7	215,9	631,1	308,4	688,6	120,2	2101,0
			60	25,6	22,3	52,6	68,8	225,0	689,1	311,8	733,4	122,9	2251,6
		E1	3	16,0	17,4	43,6	56,9	183,2	582,1	261,1	577,8	99,8	1837,7
			60	27,9	26,3	66,8	84,9	238,1	652,6	309,2	650,5	116,9	2173,2
		E2	3	19,9	20,6	53,7	69,6	227,7	621,0	300,7	616,3	130,0	2059,5
			60	26,7	25,6	70,4	93,7	325,2	792,1	390,0	724,9	144,7	2593,3
	14-dic-2004 (#2)	T	3	24,7	21,8	50,2	62,9	196,7	612,8	263,6	631,5	96,8	1961,0
			60	26,5	25,4	58,6	79,2	221,1	674,1	282,7	725,7	107,0	2200,3
		E1	3	19,0	18,3	45,2	58,0	191,1	602,6	258,0	581,3	95,3	1868,9
			60	32,7	29,1	71,6	96,1	265,0	760,6	311,6	725,3	115,4	2407,4
		E2	3	22,7	22,2	52,8	65,9	268,9	694,8	311,3	678,3	122,3	2239,3
			60	54,2	43,7	103,4	132,5	360,6	968,8	401,3	862,7	127,2	3054,5
	12-abr-2005 (#3)	T	3	32,6	25,2	53,2	69,2	197,7	674,1	293,8	665,9	67,8	2079,5
			60	27,3	22,4	49,6	66,9	249,5	747,6	299,9	806,2	90,4	2359,7
		E1	3	24,3	21,2	47,3	61,4	199,7	652,6	267,1	722,0	89,3	2085,0
			60	20,4	20,0	43,7	63,4	218,6	691,1	253,1	789,6	97,6	2197,6
		E2	3	14,7	15,2	36,4	48,3	175,9	537,0	230,8	635,4	82,5	1776,2
			60	24,4	19,0	40,7	53,6	271,1	698,8	277,6	694,5	89,4	2169,0

## **8. Bibliografía**

1. Abd El-Gawad, I.A.; El-Sayed, E.M.; Hafez, S.A.; El-Zeini, H.M. y Saleh, F.A. (2005) *The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet*. Int. Dairy J. 15: 37-44.
2. Adachi, J.A.; Ostrosky-Zeichner, L.; DuPont, H.L. y Ericsson, C.D. (2000) *Empirical antimicrobial therapy for traveller's diarrhoea*. Clin. Infect. Dis. 31: 1079-1083.
3. Adamsson, I.; Edlund, C. y Nord, C.E. (2000) *Microbial ecology and treatment of Helicobacter pylori infections: review*. J Chemotherapy, 12: 5-16.
4. Adlerberth, I.; Cerquetti, M.; Poilane, I.; Wold, A. y Collignon, A. (2000) *Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract*. Microb. Ecol. Health D. 11: 223-239.
5. Albenzio, M.; Corbo, M.R.; Rehman, S.U.; Fox, P.F.; De Angelis, M.; Corsetti, A.; Sevi, A. y Gobbetti, M. (2001) *Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey*. Int. J. Food Microbiol. 67: 35-48.
6. Anderson, J.W. y Hanna, T.J. (1999) *Impact of nondigestible carbohydrates on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease*. J. Nutr. 129: 1457S-1466S.
7. AOAC (1990) *Official method 985.35 - Minerals in ready-to-feed milk-based infant formula - Atomic absorption spectrophotometric method*. En: *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, Vol. II* (Ed.: Heilrich, K.) AOAC, Arlington, Virginia, Estados Unidos, p. 1110.
8. Aso, Y. y Akazan, H. (1992) *Prophylactic effect of a Lactobacillus casei preparation on the recurrence of superficial bladder cancer*. Urol. Int. 49: 125-129.
9. Banks, J. M. (2003) *Cheddar-Type cheeses*. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 1* (Eds.: Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.). Academic Press, Reino Unido, p. 356-363.
10. Barbut, F. y Petit, J.C. (2001) *Epidemiology of Clostridium difficile-associated infections*. Clin. Microbiol. Infect. 7: 405-410.
11. Batt, C.A.; Erlandson, K. y Bsat, N. (1995) *Design and implementation of a strategy to reduce bacteriophage infection of dairy starter cultures*. Int. Dairy J. 5: 949-962.
12. Bergamini, C. (2006) *influencia de la adición de bacterias probióticas sobre el perfil de proteólisis de quesos semiduros*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
13. Bergogne-Bérézin, E. (2000) *Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhoea*. Int. J. Antimicrob. Ag. 16: 521-526.
14. Bertazzoni Minelli, E.; Benini, A.; Marzotto, M.; Sbarbati, A.; Ruzzenente, O.; Ferrario, R.; Hendriks, H. y Dellaglio, F. (2004) *Assessment of novel probiotic Lactobacillus casei strains for the production of functional dairy foods*. Int. Dairy J. 14: 723-736.

15. Billman, G.E.; Kang, J.X. y Leaf, A. (1997) *Prevention of ischemia-induced cardiac sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids in dogs*. *Lipids* 32: 1161-1168.
16. Bitman, J. y Wood, D.L. (1990) *Changes in milk fat phospholipids during lactation*. *J. Dairy Sci.* 73: 1208-1216.
17. Blanchette, L.; Roy, D.; Bélanger, G. y Gauthier, S.F. (1996) *Production of Cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria*. *J. Dairy Sci.* 79: 8-15.
18. Boudraa G.; Touhami, M.; Pochart, P.; Soltana, R.; Mary, J.Y. y Desjeux, J.F. (1990) *Effect of feeding yogurt versus milk in children with persistent diarrhea*. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 11: 509-512.
19. Boylston, T.D.; Vinderola, C.G.; Ghodduzi, H.B. y Reinheimer, J.A. (2004) *Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards*. *Int. Dairy J.* 14: 375-387.
20. Bradley, R.L.; Arnold, E.; Barbano, D.M.; Semerad, R.G.; Smith, D.E. y Vines, B.K. (1993) *Cap. 15: Chemical and physical methods*. En: *Standard methods for the examination of dairy products* (Ed.: Marshall, R.) American Public Health Association (APHA), Washington, Estados Unidos, p. 433-531.
21. Brashears, M.M. y Gilliland, S.E. (1995) *Survival during frozen and subsequent refrigerated storage of Lactobacillus acidophilus cells as influenced by the growth phase*. *J. Dairy Sci.* 78: 2326-2335.
22. Brouns, F.; Kettlitz, B. y Arrioni, E. (2002) *Resistant starch and the butyrate revolution*. *Trends Food Sci. Tech.* 13: 251-261.
23. Buriti, F.C.A.; da Rocha, J.S. y Saad, S.M.I. (2005) *Incorporation of Lactobacillus acidophilus in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage*. *Int. Dairy J.* 15: 1279-1288.
24. Candioti, M.; Hynes, E.; Meinardi, C.; Sabbag, N. y Zalazar, C. (2000) *Uso de fermentos seleccionados directos en la elaboración de queso Cremoso Argentino*. *Industria lechera* 80: 18-25.
25. Castillo, I.; Requena, T.; Fernandez de Palencia, P.; Fontecha, J. y Gobetti, M. (1999) *Isolation and characterization of an intracellular esterase from Lactobacillus casei subsp. casei IFPL731*. *J. Appl. Microbiol.* 86: 653-659.
26. Centro de la Industria Lechera Argentina (2007). Buenos Aires, Argentina. [Documento de Internet]. <http://www.cil.org.ar>.
27. Champagne, C.P.; Gardner, N.J. y Roy, D. (2005) *Challenges in the addition of probiotic cultures to foods*. *Crit. Rev. Food Sci.* 45: 61-84.
28. Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L. y Collins, J.K. (1998) *Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods*. *Int. J. Dairy Technol.* 51: 123-136.
29. Chich, J.-F.; Marchesseau, K. y Gripon, J.-C. (1997) *Intracellular esterase from Lactococcus lactis subsp. lactis NCDO 763: purification and characterization*. *Int. Dairy J.* 7: 169-174.
30. Choisy, C.; Desmazeaud, M.J.; Gripon, J.C.; Lamberet, G. y Lenoir, J. (1997) *La biochimie de l'affinage*. En: *Le fromage* (Eck, A. y Gillis, J.C.) Tec & Doc Lavoisier, Paris, Francia, p. 86-105.



31. Ciarlet, M. y Estes, M.K. (2001) *Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells*. Curr. Opin. Microbiol. 4: 435-441.
32. Código Alimentario Argentino (2006) *Cap. VIII: Alimentos lácteos. Artículo 630 – (Dec. 111, 12.1.76) p. 82-83.* [Documento de Internet]. <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm>.
33. Collins, Y.F.; McSweeney, P.L.H. y Wilkinson, M.G. (2003) *Evidence for a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese during ripening*. J. Dairy Res. 70: 105–113.
34. Collins, Y.F.; McSweeney, P.L.H. y Wilkinson, M.G. (2004) *Cap. 14.3: Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese*. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects* (Eds.: Fox, P.F.; McSweeney, P.; Cogan, T. y Guinee, T.) Academic Press, Estados Unidos, p. 373-389.
35. Conrad, P.B.; Miller, D.P.; Cielenski, P.R. y de Pablo, J.J. (2000) *Stabilization and preservation of Lactobacillus acidophilus in saccharide matrices*. Cryobiology 41: 17–24.
36. Corbo, M.R.; Albenzio, M.; De Angelis, M.; Sevi, A. y Gobbetti, M. (2001) *Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria*. J. Dairy Sci. 84: 551-561.
37. Corcoran, B.M.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F. y Stanton, C. (2004) *Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances*. J. Appl. Microbiol. 96: 1024–1039.
38. Corzo, G. y Gilliland, S.E. (1999) *Measurement of bile salt hydrolase activity from Lactobacillus acidophilus based on disappearance of conjugated of bile salts*. J. Dairy Sci. 82: 466–471.
39. Crittenden, R.; Laitila, A.; Forsell, P.; Matto, J.; Saarela, M.; Matilla-Sandholm, T. y Myllarinen, P. (2001) *Adhesion of bifidobacterias to granular starch and its implications in probiotic technologies*. Appl. Environ. Microb. 67: 3469–3475.
40. Crowell, P.L. y Elson, C.E. (2001) *Cap. 3: Isoprenoids, health and disease*. En: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods* (Ed: Wildman, R.E.C.). CRC Press, Estados Unidos, p. 31-53.
41. Curry, B. y Crow, V. (2003a) *Lactobacillus spp. - General Characteristics*. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 3* (Eds.: Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Academic Press, Reino Unido, p. 1479-1484.
42. Curry, B. y Crow, V. (2003b) *Lactobacillus spp. - Lactobacillus casei group*. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 3* (Eds.: Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Academic Press, Reino Unido, p. 1488-1494.
43. Czerucka, D. y Rampal, P. (2002) *Experimental effects of Saccharomyces boulardii on diarrheal pathogens*. Microbes Infec. 4: 733–739.
44. Daigle, A.; Roy, D.; Bélanger, G. y Vuillermard, J.C. (1999) *Production of probiotic cheese (Cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by Bifidobacterium infantis*. J. Dairy Sci. 82: 1081-1091.
45. Darukaradhya, J.; Phillips, M. y Kailasapathy, K. (2006) *Selective enumeration of Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium spp., starter lactic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria from Cheddar cheese*. Int. Dairy J. 16: 439-445.

46. Dave, R.I. y Shah, N.P. (1997) *Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures*. Int. Dairy J. 7: 537-545.
47. de Llanos, R.; Querol, A.; Pemán, J.; Gobernado, M. y Fernández-Espinar, M.T. (2006) *Food and probiotic strains from the Saccharomyces cerevisiae species as a possible origin of human systemic infections*. Int. J. Food Microbiol. 110: 286–290.
48. De Vuyst, L. (2000) *Technology aspects related to the application of functional starter cultures*. Food Technol. Biotech. 38: 105-112.
49. Deborde, C. (2003). *Propionibacterium spp.* En: *Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 4* (Eds.: Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Academic Press, Reino Unido, p. 2330-2339.
50. Deeth, H.C. y Fitzgerald C.H. (1995) *Lipolytic enzymes and hidrolytic rancidity in milk and milk products*. En: *Advanced Dairy Chemistry Vol. II* (Ed.: Fox, P.F.) Elsevier Applied Science, United Kingdom, p. 247 - 308
51. Deeth, H.C. y Touch, V. (2000) *Methods for detecting lipase activity in milk and milk products*. Aust. J. Dairy Technol. 55: 153–168.
52. Desjardins, M-L.; Roy, D. y Toupin, C. (1990) *Uncoupling of growth and acids production in Bifidobacterium ssp.* J. Dairy Sci. 73: 1478-1484.
53. Dinakar, P. y Mistry V.V. (1994) *Growth and viability of Bifidobacterium bifidum in Cheddar cheese*. J. Dairy Sci. 77: 2854-2864.
54. DiSilvestro, R.A. (2001) *Cap. 8: Flavonoids as antioxidants*. En: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods* (Ed: Wildman, R.E.C.). CRC Press, Estados Unidos, p. 137-142.
55. Drake, M.A. (2007) *Invited Review: Sensory Analysis of Dairy Foods*. J. Dairy Sci. 90: 4925–4937.
56. Dufossé, L.; Latrassé, A. y Spinnler, H.E. (1994) *Importance des lactones dans les arômes alimentaires: structures, distribution, propriétés sensorielles et biosynthèse*. Sci. Aliment. 14: 17–50.
57. Dunne, C.; Murphy, L.; Flynn, S.; O’Mahony, L.; O’Halloran, S.; Feeney, M.; Morrissey, D.; Thornton, G. y col. (1999) *Probiotics; from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials*. Anton. Leeuw. 76: 279–292.
58. El-Soda, M.; El-Wahab, H.A.; Ezzat, N.; Desmazeaud, M.J. e Ismail, A. (1986) *The esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli. II. Detection of esterase system of Lactobacillus helveticus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus lactis and Lactobacillus acidophilus*. Lait 66: 431–443.
59. El Soda, M.; Madkor, S.A. y Tong, P.S. (2000) *Adjunct cultures: Recent developments and potential significance to the cheese industry*. J. Dairy Sci. 83: 609–619.
60. El-Zayat, A.I. y Osman, M.M. (2001) *The use of probiotics in Tallaga cheese. Egypt. J. Dairy Sci.* 29: 99-106.

61. Fallico, V.; McSweeney, P.L.H.; Siebert, K.J.; Horne, J.; Carpino, S. y Licitra, G. (2004) *Chemometric analysis of proteolysis during ripening of Ragusano cheese*. J. Dairy Sci. 87: 3138-3152.
62. Farnworth, E.R. (2001) *Cap. 25: Probiotics and prebiotics*. En: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods* (Ed: Wildman, R.E.C.) CRC Press, Estados Unidos, p. 407-422.
63. Faulks, R.M. y Southon, S. (2001) *Cap. 9: Carotenoids, metabolism and disease*. En: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods* (Ed: Wildman, R.E.C.) CRC Press, Estados Unidos, p. 143-156.
64. Favier, C.F.; Vaughan, E.E.; de Vos, W.M. y Akkermans, A.D.L. (2002) *Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 219-226.
65. FIL-IDF (1980). *Latte e derivati del latte: Guida alle tecniche di campionamento. Norma internazionale 50A. International Dairy Federation*, Bruselas, Bélgica, p. 222-272.
66. FIL-IDF (1982). *Formaggio e formaggio fuso. Determinazione della materia secca. Metodo di riferimento N° 4 A. International Dairy Federation*, Bruselas, Bélgica, p. 184-188.
67. FIL-IDF (1993). *Latte. Determinazione del tenore in azoto. Metodo di riferimento N° 20 B. International Dairy Federation*, Bruselas, Bélgica, p. 74-107.
68. FIL-IDF (1997). *Lait produits laitiers. Determination de la teneur en matiere grasse. Guide de directives generales appliquees aux methodes butyrometriques. Norme FIL Internationale 152A:1997*, Bruselas, Bélgica.
69. Fletouris, D.J.; Botsoglou, N.A.; Psomas, I.E. y Mantis, A.I. (1998) *Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and capillary gas chromatography*. J. Dairy Sci. 81: 2833-2840.
70. Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization (2001) *Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Hotel Amerian Córdoba Park, Córdoba, Argentina.
71. Fox, P.F. (2003) *Cheese - Biochemistry of cheese ripening*. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 1* (Eds.: Roginsky, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Academic Press, Reino Unido, p. 320-326.
72. Fox, P.F.; Law, J.; McSweeney, P. y Wallace, J. (1993). *Biochemistry of cheese ripening*. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects* (Ed.: Fox, P.F.) Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, p. 389-438.
73. Fox, P.F.; Lucey, J.A. y Cogan, T.M. (1990) *Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening*. Crit. Rev. Food Sci. 29: 237-253.
74. Fox, P.F. y McSweeney, P.H.L. (2004) *Cap. 1: Cheese: an overview*. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects* (Eds.: Fox, P.F.; McSweeney, P.; Cogan, T. y Guinee, T.) Academic Press, Estados Unidos, p.1-18.
75. Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. y Lynch, C.M. (1998) *Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese*. Aust. J. Dairy Technol. 53: 83-89.

76. Fox, P.F.; Singh, T.K. y McSweeney, P.L.H. (1995) *Cap. 1: Biogenesis of flavour compounds in cheese*. En: *Chemistry of Structure/Function Relationships in Cheese* (Eds.: Malin, E.L. y Tunick, M.H.) Plenum Publishing Corp., Estados Unidos, p. 59–98.
77. Frank, J.F.; Christen, G.L. y Bullerman, L.B. (1993) *Cap. 8: Tests for groups of microorganisms*. En: *Standard methods for the examination of dairy products* (Ed.: Marshall, R.) American Public Health Association (APHA), Washington, Estados Unidos, p. 271–286.
78. Freitas, A.C.; Pintado, A.E.; Pintado, M.E. y Malcata, F.X. (1999) *Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and lipolysis – preliminary screening*. *Int. Dairy J.* 9: 593–603.
79. Fuller, R. (1989) *Probiotics in man and animals*. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
80. Furrle, E.; Senok, A.C.; Frank, D.N. y Sullivan, K.E. (2006) *Pondering probiotics*. *Clin. Immunol.* 121: 19-22.
81. Gardiner, G.E.; Bouchier, P.; O`Sullivan, E.; Kelly, J.; Collins, J.K.; Fitzgerald, G.; Ross, R.P. y Stanton, C. (2002) *A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture*. *Int. Dairy J.* 12: 749-756.
82. Gardiner, G.E.; Ross, R.P.; Collins, J.K.; Fitzgerald, G. y Stanton, C. (1998) *Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived Lactobacillus paracasei strains*. *Appl. Environ. Microb.* 64: 2192-2199.
83. Gardiner, G.E.; Ross, R.P.; Wallace, J.M.; Scanlan, F.P.; Jägers, P.P.; Fitzgerald, G.F.; Collins, J.K. y Stanton, C. (1999) *Influence of a probiotic adjunct culture of Enterococcus faecium on the quality of Cheddar cheese*. *J. Agr. Food Chem.* 47: 4907-4916.
84. Garro, M.S.; Valdez, G.F. de; Oliver, G. y Giori, G.S. de (1999) *Starter culture activity in refrigerated fermented soymilk*. *J. Food Protect.* 62: 808-810.
85. Gibson, G.R.; Berry Ottaway, P. y Rastall, R.A. (2000) *Prebiotics: New developments in functional foods*. Chandos Publishing Ltd., Cambridge, Reino Unido.
86. Gibson, G.R. y Fuller, R. (2000) *Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use*. *J. Nutr.* 130: 391S-395S.
87. Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. (1995) *Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics*. *J. Nutr.* 125: 1401–1412.
88. Gobbetti, M.; Corsetti, A.; Smacchi, E.; Zocchetti, A. y De Angelis, M. (1998) *Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria*. *J. Dairy Sci.* 81: 37-47.
89. Gobbetti, M.; Fox, P.F.; Smacchi, E.; Stepaniak, L. y Damiani, P. (1996) *Purification and characterization of a lipase from Lactobacillus plantarum 2739*. *J. Food Biochem.* 20: 227–246.
90. Gobbetti, M.; Smacchi, E. y Corsetti, A. (1997) *Purification and characterization of a cell surface-associated esterase from Lactobacillus fermentum DT41*. *Int. Dairy J.* 7: 13–21.

91. Goldin, B.R.; Gualtieri, L. y Moore, R.P. (1996) *The effect of Lactobacillus GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat*. Nutr. Cancer 25: 197-204.
92. Gomes, A.M.P. y Malcata, F.X. (1998) *Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation*. J. Dairy Sci. 81: 1492-1507.
93. Gomes, A.M.P. y Malcata, F.X. (1999) *Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics*. Trends Food Sci. Tech. 10: 139-157.
94. Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X.; Klaver, F.A.M. y Grande, H.J. (1995) *Incorporation and survival of Bifidobacterium sp. strain Bo and Lactobacillus acidophilus strain Ki in a cheese product*. Neth. Milk Dairy J. 49: 71-95.
95. Gomes, A.M.P.; Vieira, M.M. y Malcata, F.X. (1998) *Survival of probiotic microbial strains in a cheese matrix during ripening: simulation of rates of salt diffusion and microorganism survival*. J. Food Eng. 36: 281-301.
96. Gopal, P.K. (2003) *Lactobacillus spp. - Lactobacillus acidophilus*. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 3* (Eds.: Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Academic Press, Reino Unido, p. 1484-1488.
97. Grönlund, M.M.; Lehtonen, O.P.; Eerola, E. y Kero, P. (1999) *Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after Cesarean delivery*. J. Pediatr. Gastr. Nutr. 28: 19-25.
98. Guarino, A.; Canani, R.B.; Spagnuolo, M.I. (1997) *Oral bacteria therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea*. J. Pediatr. Gastr. Nutr. 25: 516-519.
99. Guarner, F.; Perdigon, G.; Corthier, G.; Salminen, S.; Koletzko, B. y Morelli, L. (2005) *Should yoghurt cultures be considered probiotic?* Brit. J. Nutr. 93: 783-786.
100. Hagen, M.; Narvhus, J.A. (1999) *Production of ice cream containing probiotic bacteria*. Milchwissenschaft 54: 265-268.
101. Harmsen, H.J.M.; Wildeboer-Veloo, A.C.M.; Raangs, G.C.; Wagendorp, A.A.; Klijn, N.; Bindels, J.G. y Welling, G.W. (2000) *Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods*. J. Pediatr. Gastr. Nutr. 30: 61-67.
102. Hata, Y.; Yamamoto, M.; Ohni, M.; Nakajima, K.; Nakamura, Y. y Takano, T. (1996) *A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects*. Am. J. Clin. Nutr. 64: 767-771.
103. Havenaar, R. y Huis in't Veld, J.H.J. (1992) *Probiotics: A General View*. En: *The Lactic Acid Bacteria, Vol. I: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease* (Ed.: Wood, B.J.B.). Elsevier Applied Science, Reino Unido, p.151-170.
104. He, F.; Morita, H.; Hashimoto, H.; Hosoda, M.; Kurisaki, J.; Ouwehand, A.C.; Isolauri, E.; Benno, Y. y Salminen, S. (2002) *Intestinal Bifidobacterium species induce varying cytokine production*. J. Allergy Clin. Immun. 109: 1035-1036.
105. Heller, K.J. (2001) *Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms*. Suppl. Am. J. Clin. Nutr. 73: 374S-379S.

106. Heller, K.J.; Bockelmann, W.; Schrezenmeir, J. y de Vrese, M. (2003) *Cap. 8: Cheese and its potential as a probiotic food*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E.R.). CRC Press, Estados Unidos, p. 203-225.
107. Henriksson, A.; Welin, A. y Harvey, M. (2002) *New efficacious probiotic cultures for application in dairy products*. Simposio de la Federación Internacional de Lechería (IDF): "Congrilait". París, Francia, 24-27 de setiembre 2002.
108. Hickey, D.K.; Kilcawley, K.N.; Beresford, T.P. y Wilkinson, M.G. (2007) *Lipolysis in Cheddar cheese made from raw, thermized, and pasteurized milks*. *J. Dairy Sci.* 90: 47-56.
109. Hood, S.K.; Zottola, E.A. (1988) *Effect of low pH on the ability of Lactobacillus acidophilus to survive and adhere to human intestinal cells*. *J Food Sci.* 53: 1514-1516.
110. Hopkins, M.J. y Macfarlane, G.T. (2002) *Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with Clostridium difficile infection*. *J. Med. Microbiol.* 51: 448-454.
111. Hornef, M.W.; Wick, M.J.; Rhen, M. y Normark, S. (2002) *Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses*. *Nat. Immunol.* 3: 1033-1040.
112. Huebner, J.; Wehling, R.L. y Hutkins, R.W. (2007) *Functional activity of commercial prebiotics*. *Int. Dairy J.* 17: 770-775.
113. Hughes, D.B. y Hoover, D.G. (1995) *Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk*. *J. Dairy Sci.* 78: 268-276.
114. Hull, R.R.; Roberts, A.V. y Mayes, J.J. (1984) *Survival of Lactobacillus acidophilus in yoghurt*. *Aust. J. Dairy Technol.* 39: 164-166.
115. Hunter, E.A.; McNulty, D.A. y Banks, J.M. (1997) *Statistical design and analysis of experiments in cheese technology*. *Lebensh. Wiss. Technol.* 30: 121-128.
116. Hussein, S.A. y Kebary, K.M.K. (1999) *Improving viability of bifidobacteria by microentrapment and their effect on some pathogenic bacteria in stirred yoghurt*. *Acta Aliment. Hung.* 28: 113-131.
117. Hutkins, R.W. y Morris, H.A. (1987) *Carbohydrate metabolism by Streptococcus thermophilus: A review*. *J. Food Prot.* 50: 876-884.
118. Hynes, E.; Bach, C.; Lamberet, G.; Ogier, J.-C.; Son, O. y Delacroix-Buchet, A. (2003) *Contribution of starter lactococci and adjunct lactobacilli to proteolysis, volatile profiles and sensory characteristics of washed-curd cheese*. *Lait* 83: 31-43.
119. Hynes, E. y Bergamini, C.V. (2004) *Sección V - Cap. 2: Rol de las NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria) en la maduración de quesos*. En: *Avances en Microbiología, Bioquímica y Tecnología de Quesos* (Eds.: Reinheimer, J.A. y Zalazar, C.A.) Ediciones UNL, Santa Fe, Argentina, p. 245-265.
120. Hynes, E.; Ogier, J.-C. y Delacroix-Buchet, A. (2001) *Proteolysis during ripening of miniature washed-curd cheeses manufactured with different strains of starter bacteria and a Lactobacillus plantarum adjunct culture*. *Int. Dairy J.* 11: 587-597.
121. IDF (1992) *Norme générale de composition pour les laits fermentés. Norme FIL Internationale 4, 163*, Bruselas, Bélgica.

122. Ishida, Y.; Nakamura, F.; Kanzato, H.; Sawada, D.; Hirata, H.; Nishimura, A.; Kajimoto, O. y Fujiwara, S. (2005) *Clinical effects of Lactobacillus acidophilus strain L-92 on perennial allergic rhinitis: a double-blind, placebo-controlled study*. J. Dairy Sci. 88: 527-533.
123. Isolauri, E.; Kaila, M.; Mykkänen, H.; Ling, W.H. y Salminen, S. (1994) *Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis*. Digest. Dis. Sci. 39: 2595-2600.
124. Isolauri, E.; Kirjavainen, P. V. y Salminen, S. (2002a) *Probiotics—a role in the treatment of intestinal infection and inflammation*. Gut 50: iii54–iii59.
125. Isolauri, E.; Rautanen, T.; Juntunen, M.; Sillanaukee, P. y Koivula, T. (1991) *A human Lactobacillus strain (Lactobacillus Casei sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children*. Pediatrics 88: 90-97.
126. Isolauri, E.; Rautava, S.; Kalliomäki, M.; Kirjavainen, P. y Salminen, S. (2002b) *Role of probiotics in food hypersensitivity*. Curr. Opin. Allergy Cl. 2: 263–271.
127. Isolauri, E.; Salminen, S. y Ouwehand, A. (2004) *Probiotics*. Best Pract. Res. Cl. Ga. 18: 299-313.
128. Jiang, T.; Mustapha, A. y Savaiano, D.A. (1996) *Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing Bifidobacterium longum*. J Dairy Sci. 79: 750-757.
129. Kalliomäki, M.; Salminen, S.; Arvilommi, H.; Kero, P.; Koskinen, P. e Isolauri, E. (2001) *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial*. Lancet 357: 1076-1079.
130. Kamaly, K.M.; Takayama, K. y Marth, E.H. (1990) *Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of Streptococcus lactis, Streptococcus cremoris, and their mutants*. J. Dairy Sci. 73: 280–290.
131. Karahadian, G. y Lindsay, R.C. (1987) *Integrated roles of lactate, ammonia and calcium in texture development of mold surface-ripened cheeses*. J. Dairy Sci. 70: 909–918.
132. Kasimoğlu, A.; Göncüoğlu, M. y Akgün, S. (2004) *Probiotic white cheese with Lactobacillus acidophilus*. Int. Dairy J. 14: 1067-1073.
133. Keshavarzian, A.; Farhadi, A. y Mutlu, E.A. (2002) *New developments in the treatment of inflammatory bowel disease*. Expert Opin. Inv. Drug. 11: 365-385.
134. Khalid, N.M. y Marth, E.H. (1990) *Lactobacilli – their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review*. J. Dairy Sci. 73: 2669–2684.
135. Kirjavainen, P.V. y Gibson, G.R. (1999) *Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota*. Ann. Med. 31: 288-292.
136. Kopp-Hoolihan, L. (2001) *Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review*. J. Am. Diet. Assoc. 101: 229-241.
137. Krasaekoopt, W.; Bhandari, B. y Deeth, H. (2003) *Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt*. Int. Dairy J. 13: 3-13.
138. Kunz, C. y Rudloff, S. (2006) *Health promoting aspects of milk oligosaccharides*. Int. Dairy J. 16: 1341–1346.
139. Landa, M.C.; Frago, N. y Tres, A. (1994) *Diet and the risk of breast cancer in Spain*. Eur. J. Cancer Prev. 3: 313-320.

140. Lankaputhra, W.E.V.; Shah N.P. y Britz M.L. (1996) *Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide*. *Milchwissenschaft* 51: 65-70.
141. Larsen, B. y Monif, G.R.G. (2001) *Understanding the bacterial flora of the female genital tract*. *Clin. Infect. Dis.* 32: e69–e77.
142. Lawless, H.T. y Heymann, H. (1999) *Consumer field tests and questionnaire design*. En: *Sensory Evaluation of Food*. Chapman and Hall, New York, Estados Unidos, p. 480–514.
143. Lee, D.K.; Ahn, J. y Kwak, H.S. (1999) *Cholesterol removal from homogenized milk with  $\beta$ -cyclodextrin*. *J. Dairy Sci.* 82: 2327–2330.
144. Lee, S.Y. y Lee, B.H. (1990) *Esterolytic and lipolytic activities of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* LLG*. *J. Food Sci.* 55: 119–122.
145. Lewis, S.J. y Freedman, A.R. (1998) *Review article: the use of biotherapeutic agents in the prevention and treatment of gastrointestinal disease*. *Aliment. Pharm. Therap.* 12: 807-822.
146. Limsowtin, G.K.Y.; Broome, M.C. y Powell, I.B. (2003) *Lactic acid bacteria, taxonomy*. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 3* (Eds.: Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Academic Press, Reino Unido, p. 1470-1478.
147. Linskens, R.K.; Huijsdens, X.W.; Savelkoul, P.H.M.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. y Meuwissen, S.G.M. (2001) *The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics*. *Scand. J. Gastroentero.* 36(suppl. 234): S29-S40.
148. Liu, S.-Q.; Holland, R. y Crow, V.L. (2001) *Purification and properties of intracellular esterases from *Streptococcus thermophilus**. *Int. Dairy J.* 11: 27–35.
149. Lloyd, M. (2003) *Mucosal immunity*. *Pediatrics* 111: 1595–1600.
150. Lourens-Hattingh, A. y Viljoen, B.C. (2001) *Yogurt as probiotic carrier food*. *Int. Dairy J.* 11: 1-17.
151. Lynch, C.M.; Muir, D.D.; Banks, J.M.; McSweeney, P.L.H. y Fox, P.F. (1999) *Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar cheese ripening*. *J. Dairy Sci.* 82: 1618-1628.
152. Mackay, A.D.; Taylor, M.B.; Kibbler, C.C. y Hamilton-Miller, J.M. (1999) **Lactobacillus endocarditis* caused by a probiotic organism*. *Clin. Microbiol. Infec.* 5: 290-292.
153. Mahoney, M. y Henriksson, A. (2003) *The effect of processed meat and meat starter cultures on gastrointestinal colonization and virulence of *Listeria monocytogenes* in mice*. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 255-261.
154. Malin, M.; Suomalainen, H.; Saxelin, M. e Isolauri, E. (1996) *Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG**. *Ann. Nutr. Metab.* 40: 137-145.
155. Manning, T.S. y Gibson, G.R. (2004) *Prebiotics*. *Best Pract. Res. Cl. Ga.* 18: 287–298.



156. Mc Brearty, S.; Ross, R.; Fitzgerald, G.; Collins, J.; Wallace, J. y Stanton, C. (2001) *Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality*. Int. Dairy J. 11: 599-610.
157. McLean, N.W. y Rosenstein, I.J. (2000) *Characterisation and selection of a Lactobacillus species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis*. J. Med. Microbiol. 49: 543-552.
158. McSweeney, P.L.H. (2004) *Cap. 14.1: Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview*. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects* (Eds.: Fox, P.F.; McSweeney, P.; Cogan, T. y Guinee, T.) Academic Press, Estados Unidos, p.347-360.
159. McSweeney, P.L.H. y Fox, P.F. (2004) *Cap. 14.2: Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate: introduction and overview*. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects* (Eds.: Fox, P.F.; McSweeney, P.; Cogan, T. y Guinee, T.) Academic Press, Estados Unidos, p. 361-371.
160. McSweeney, P.L.H. y Sousa, M.J. (2000) *Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review*. Lait 80: 293-324.
161. Meile, L.; Ludwig, W.; Rueger, U.; Gut, C.; Kaufmann, P.; Dasen, G.; Wenger, S. y Teuber, M. (1997) *Bifidobacterium lactis sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk*. Syst. Appl. Microbiol. 20: 57-64.
162. Merrill, A.H. Jr. y Schmelz, E-M. (2001) *Cap. 23: Sphingolipids: mechanism-based inhibitors of carcinogenesis produced by animals, plants, and other organisms*. En: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods* (Ed: Wildman, R.E.C.) CRC Press, Estados Unidos, p. 377-392.
163. Metchnikoff, E. (1907). *Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction*. En: *The prolongation of life: Optimistic studies* (Ed.: Heinemann, W.) Reino Unido, p. 161-183.
164. Meydani, S.N. y Ha, W.K. (2000) *Immunologic effects of yogurt*. Am. J. Clin. Nutr. 71: 861-872.
165. Micanel, N.; Haynes, I.N. y Playne, M.J. (1997) *Viability of probiotic cultures in commercial Australian yogurts*. Aust. J. Dairy Technol. 52: 24-27.
166. Micich, T.J. (1990) *Behaviors of polymer supported digitonin with cholesterol in the absence and presence of butter oil*. J. Agr. Food Chem. 38: 1839-1843.
167. Midolo, P.D.; Lambert, J.R.; Hull, R.; Luo, F. y Grayson, M.L. (1995) *In vitro inhibition of Helicobacter pylori NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria*. J. Appl. Bacteriol. 79: 475-479.
168. Milesi, M.M.; Candioti, M. y Hynes, E. (2006) *Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheesemaking and ripening*. Lebensm. Wiss. Technol. 40: 1427-1433.
169. Mitchell, S.L. y Gilliland, S.E. (1983) *Pepsinized sweet whey medium for growing Lactobacillus acidophilus for frozen concentrated cultures*. J. Dairy Sci. 66: 712-718.
170. Mitsuoka, T. (1990) *Bifidobacteria and their role in human health*. J. Ind. Microbiol. 6: 263-267.

171. Mitsuoka, T. (1992) *Intestinal flora and ageing*. Nutr. Rev. 50: 438-46.
172. Moio, L.; Dekimpe, J.; Etievant, P.X. y Addeo, F. (1993) *Volatile flavour compounds of water buffalo Mozzarella cheese*. Ital. J. Food Sci. 5: 57-68.
173. Molimard, P. y Spinnler, H.E. (1996) *Compounds involved in the flavor of surface mould-ripened cheeses: origins and properties*. J. Dairy Sci. 79: 169-184.
174. Möller, C. y de Vrese, M. (2004) *Review: probiotic effects of selected acid bacteria*. Milchwissenschaft, 59: 597-601.
175. Moreau, M.C. (2000). *Flore intestinale, prébiotique et effets sur la réponse immunitaire intestinale à IgA*. Arch. Pédiatrie 7: 247-248.
176. Mukai, T.; Asasaka, T.; Sato, E.; Mori, K.; Matsumoto, M. y Ohori, H. (2002) *Inhibition of binding of Helicobacter pylori to the glycolipid receptors by probiotic Lactobacillus reuteri*. FEMS Immunol. Med. Mic. 32: 105-110.
177. Mukherjee, K.K. y Hutkins, R.W. (1994) *Isolation of galactose-fermenting thermophilic cultures and their use in the manufacture of low browning Mozzarella cheese*. J. Dairy Sci. 77: 2839-2849.
178. Mykkänen, H.; Laiho, K. y Salminen, S. (1998) *Variations in faecal bacterial enzyme activities and associations with bowel function and diet in elderly subjects*. J. Appl. Microbiol. 85: 37-41.
179. Nebra, Y.; Jofre, J. y Blanch, A.R. (2002) *The effect of reducing agents on the recovery of injured Bifidobacterium cells*. J. Microbiol. Meth. 49: 247-254.
180. Nelson, J.H.; Jensen, R.G. y Pitas, R.E. (1977) *Pregastric esterase and other oral lipases – a review*. J. Dairy Sci. 60: 327-362.
181. Nielsen, E.M.; Schlundt, J.; Gunvig, A. y Jacobsen, B.L. (1994) *Epithelial, mucus and lumen subpopulations of Escherichia coli in the large intestine of conventional and gnotobiotic rats*. Microb. Ecol. Health D. 7: 263-273.
182. Noh, D.O.; Kim, S.H. y Gilliland, S.E. (1997) *Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of Lactobacillus acidophilus ATCC 43121*. J. Dairy Sci. 80: 3107-3113.
183. Noomen, A. (1977) *Noordhollandse Meshanger cheese: a model for research on cheese ripening. 2. The ripening of the cheese*. Neth. Milk Dairy J. 31: 75-102.
184. Olivecrona, T.; Vilaro, S. y Bengtsson-Olivecrona, G. (1992) *Indigenous enzymes in milk. II. Lipases in milk*. En: *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1: Proteins* (Ed: Fox, P.F.) Elsevier Applied Science, United Kingdom, p. 292-310.
185. Ong, L.; Henriksson, A. y Shah, N.P. (2006) *Development of probiotic Cheddar cheese containing Lactobacillus acidophilus, Lb. casei, Lb. paracasei and Bifidobacterium spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid*. Int. Dairy J. 16: 446-456.
186. Ong, L.; Henriksson, A. y Shah, N.P. (2007a) *Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of Lactobacillus acidophilus, Lb. paracasei, Lb. casei or Bifidobacterium sp*. Int. Dairy J. 17: 67-78.

187. Ong, L.; Henriksson, A. y Shah, N.P. (2007b) *Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with Lactobacillus acidophilus, Lb. casei, Lb. paracasei or Bifidobacterium sp.* Int. Dairy J. 17: 937-945.
188. O'Riordan, K. y Fitzgerald, G.F. (1998) *Evaluation of bifidobacteria for the production of antimicrobial compounds and assessment of performance in Cottage cheese at refrigeration temperature.* J. Appl. Microbiol. 85: 103-114.
189. Oterholm, A.; Ordal, Z.J. y Witter, L.D. (1970) *Purification and properties of glycerol ester hydrolase (lipase) from Propionibacterium shermanii.* Appl. Environ. Microb. 20: 16-22.
190. Ouwehand, A.C.; Isolauri, E.; He, F.; Hashimoto, H.; Benno, Y. y Salminen S. (2001) *Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants.* J. Allergy Clin. Immun. 108: 144-145.
191. Ouwehand, A.C. y Vesterlund, S. (2003) *Health aspects of Probiotics.* IDrugs 6: 573-580.
192. Paez R.; Taverna M. y Cuatrin A.L. (2005) *Caracterización de la lipólisis y del perfil de ácidos grasos libres en leche cruda de silo de la Cuenca Central Argentina.* Revista Industria Lechera 738: 26-31.
193. Palframan, R.; Gibson, G.R. y Rastall, R.A. (2003) *Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides.* Lett. Appl. Microbiol. 37: 281-284.
194. Parker, R.B. (1974) *Probiotics, the other half of the antibiotics story.* Anim. Nutr. Health 29: 4-8.
195. Pastorino, A.J.; Hansen, C.L. y McMahon, D.J. (2003) *Effect of pH on the chemical composition and structure-function relationships of cheddar cheese.* J. Dairy Sci. 86: 2751-2760.
196. Pérez López, C. (2001) *Cap. 10: Análisis de la varianza y la covarianza. El modelo lineal general MLG.* En: *Técnicas estadísticas con SPSS* (Ed.: Capella, I.) Pearson Educación S.A., Madrid, España, p. 357-404.
197. Perotti, M.C.; Bernal, S.M.; Meinardi, C.A. y Zalazar, C.A. (2005) *Free fatty acids profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters.* Int. Dairy J. 15: 1150-1155.
198. Phillips, M.; Kailasapathy, K. y Tran, L. (2006) *Viability of commercial probiotic cultures (L. acidophilus, Bifidobacterium sp.; L. casei, L. paracasei and L. rhamnosus) in Cheddar cheese.* Int. J. Food Microbiol. 108: 276-280.
199. Piatkiewicz, A. (1987) *Lipase and esterase formation by mutants of lactic acid streptococci and lactobacilli.* Milchwissenschaft 42: 561-564.
200. Pidcock, K.; Heard, G.M. y Henriksson, A. (2002) *Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami.* Int. J. Food Microbiol. 76: 75-81.
201. Pinchuk, I.V.; Bressollier, P.; Verneuil, B.; Fenet, B.; Sorokulova, I.B.; Mégraud, F. y Urdaci, M.C. (2001) *In vitro anti-Helicobacter pylori activity of the probiotic strain Bacillus subtilis 3 is due to secretion of antibiotics.* Antimicrob. Agents Ch. 45: 3156-3161.

202. Piveteau, P. (1999) *Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: a review*. Lait 79: 23–41.
203. Playne, M.J.; Bennett, L.E. y Smithers, G.W. (2003) *Functional dairy foods and ingredients*. Aust. J. Dairy Technol. 58: 242-264.
204. Potter, S.M.; Baum, J.A.; Teng, H.; Stillman, R.J.; Shay, N.F. y Erdman, J.W.Jr. (1998) *Soy proteins and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women*. Am. J. Clin. Nutr. 68: 1375S-1379S.
205. Prasad, J.; McJarrow, P. y Gopal, P. (2003) *Heat and osmotic stress responses of probiotic Lactobacillus rhamnosus HN001 (DR20) in relation to viability after drying*. Appl. Environ. Microb. 69: 917–925.
206. Pripp, A.H.; Stepaniak, L. y Sørhaug, T. (2000) *Chemometrical analysis of proteolytic profiles during cheese ripening*. Int. Dairy J. 10: 249-253.
207. Psomas, E.I.; Fletouris, D.J.; Litopoulou-Tzanetaki, E. y Tzanetakis, N. (2003) *Assimilation of cholesterol by yeast strains isolated from infant feces and Feta cheese*. J. Dairy Sci. 86: 3416–3422.
208. Rao, C.V.; Sanders, M.E.; Indranie, C.; Simi, B. y Reddy, B.S. (1999) *Prevention of indices of colon carcinogenesis by the probiotic Lactobacillus acidophilus NCFM in rats*. Int. J. Oncol. 14: 939-944.
209. Ray, B. (2001) *Cap. 5: Microbial Growth Characteristics*. En: *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press, Estados Unidos, p. 27-63.
210. Reddy, B.S. y Rivenson, A. (1993) *Inhibitory effect of Bifidobacterium longum on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-Amino-3-methylimidazo[4,5]quinoline, a food mutagen*. Cancer Res. 53: 3914-3918.
211. Reilly, S.S. y Gilliland, S.E. (1999) *Bifidobacterium longum survival during frozen and refrigerated storage as related to pH during growth*. J. Food Sci. 64: 714–718.
212. Renaud, S.; DeLorgeril, M.; Delaye, J.; Guidollet, J.; Jacquard, F.; Mamelle, N.; Martin, J.L.; Monjaud, I.; Salen, P. y Toubol, P. (1995) *Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease*. Am. J. Clin. Nutr. 61: 1360S-1367S.
213. Resurrección, A.V.A. (1998) *Cap. 2: Sensory test methods*. En: *Consumer sensory testing for product development* (Ed.: Resurrección, A.V.A.) Aspen Publication, Gaithersburg, Estados Unidos, p. 9-42.
214. Reuter, G. (1997) *Present and future of probiotics in Germany and in Central Europe*. Bioscience and microflora 16: 43-51.
215. Reynier, M.O.; Montet, J.C.; Gerolami, A.; Marteau, C.; Crotte, C.; Montet, A.M. y Mathieu, S. (1981) *Comparative effects of cholic, chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on micellar solubilization and intestinal absorption of cholesterol*. J. Lipid Res. 22: 467–473.
216. Rizkalla, S.W.; Luo, J.; Kabir, M.; Chevalier, A.; Pacher, N. y Slama, G. (2000) *Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion*. Am. J. Clin. Nutr. 72: 1474-1479.

217. Rogelj, I.; Bogovic Matijasic, B.; Majhenic, A.C. y Stojkovic, S. (2002) *The survival and persistence of Lactobacillus acidophilus LF221 in different ecosystems*. Int. J. Food Microbiol. 76: 83–91.
218. Ross, R.P.; Desmond, C.; Fitzgerald, G.F. y Stanton, C. (2005) *Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods*. J. Appl. Microbiol. 98: 1410-1417.
219. Ross, R.P.; Fitzgerald, G.; Collins, K. y Stanton, C. (2002) *Cheese delivering biocultures – probiotic cheese*. Aust. J. Dairy Technol. 57: 71-78.
220. Roy, D. (2005) *Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products*. Lait 85: 39-56.
221. Roy, D.; Mainville, I. y Mondou, F. (1998) *Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese*. Int. Dairy J. 7: 785-793.
222. Salminen, S. y Ouwehand, A.C. (2003) *Probiotics, applications in dairy products*. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 4* (Eds.: Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Academic Press, Reino Unido, p. 2315-2322.
223. Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. y Lee, Y-K. (1999) *Probiotics: how should they be defined?* Trends Food Sci. Tech. 10: 107-110.
224. San Clemente, C.L. y Vadehra, D.V. (1967) *Instrumental assay of microbial lipase at constant pH*. Appl. Microbiol. 15: 110–113.
225. Sanders, M.E. (2004) *Probiotics Basics. California Dairy Research Foundation and Dairy & Food Culture Technologies*. [Documento de Internet]. <http://www.usprobiotics.org/basics>.
226. Sanders, M.E. y Huis in't Veld, J.H.J. (1999) *Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labelling issues*. Anton. Leeuw. 76: 293-315.
227. Sanders, M.E.; Walker, D.C.; Walker, K.M.; Aoyama, K. y Klaenhammer, T.R. (1996) *Performance of commercial cultures in fluid milk applications*. J. Dairy Sci. 78: 943-955.
228. Sanz, M.L.; Gibson, G.R. y Rastall, R.A. (2005a) *Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro*. J. Agr. Food Chem. 53: 5192–5199.
229. Sanz, M.L.; Polemis, N.; Morales, V.; Corzo, N.; Drakoularakou, A.; Gibson, G. R. y Rastall, R.A. (2005b) *In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides*. J. Agr. Food Chem. 53: 2914–2921.
230. Shah, N.P. (2000) *Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods*. J. Dairy Sci. 83: 894-907.
231. Shah, N. (2003) *Bifidobacterium spp. - Applications in fermented milks*. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 1* (Eds.: Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Academic Press, Reino Unido, p. 147-151.
232. Shah, N.P. y Lankaputra, W.E.V. (2003) *Bifidobacterium spp. - Morphology and Physiology*. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 1* (Eds.: Rogisnski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Academic Press, Reino Unido, p. 141-146.

233. Shakeel-ur-rehman; Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Madkor, S.A. y Farkye, N.Y. (2001) *Alternatives to pilot plant experiments in cheese-ripening studies*. Int. J. Dairy Technol. 54: 121-126.
234. Shanahan, F. (2002) *Crohn's disease*. Lancet 359: 62-69.
235. Songisepp, E.; Kullisaar, T.; Hütt, P.; Elias, P.; Brilene, T.; Zilmer, M. y Mikelsaar, M. (2004) *A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity*. J. Dairy Sci. 87: 2017-2023.
236. Spiller, G.A. y Spiller, M. (2001) *Cap. 29: Colon cancer: dietary fiber and beyond*. En: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods* (Ed: Wildman, R.E.C.) CRC Press, Estados Unidos, p. 377-392.
237. Stanton, C.; Gardiner, G.; Lynch, P.B.; Collins, J.K.; Fitzgerald, G. y Ross, R.P. (1998) *Probiotic cheese*. Int. Dairy J. 8: 491-496.
238. Su, P.; Henriksson, A.; Tandianus, J.E.; Park, J.H.; Foong, F. y Dunn, N.W. (2005) *Detection and quantification of Bifidobacterium lactis LAFTI B94 in human faecal samples from a consumption trial*. FEMS Microbiol. Lett. 244: 99-103.
239. Szajewska, H. y Mrukowicz, J.Z. (2001) *Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhoea in infants and children: a systematic review of published randomised, double-blind, placebo-controlled trials*. J. Pediatr. Gastr. Nutr. 33: S17-S25.
240. Talwalkar, A. y Kailasapathy, K. (2003) *Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria*. Aust. J. Dairy Technol. 58: 36-39.
241. Tannock, G.W. (1999) *Analysis of the intestinal microflora: A renaissance*. Anton. Leeuw. 76: 265-278.
242. Taranto, M.P.; Medici, M.; Perdigón, G.; Ruíz Holgado, A.P. y Valdez, G.F. (1998) *Evidence for hypocholesterolemic effect of Lactobacillus reuteri in hypercholesterolemic mice*. J. Dairy Sci. 81: 2336-2240.
243. Taranto, M.P.; Médici, M.; Perdigon, G.; Ruiz Holgado, A.P. y Valdez, G.F. (2000) *Effect of Lactobacillus reuteri on the prevention of hypercholesterolemia in mice*. J. Dairy Sci. 83: 401-403.
244. Taranto, M.P.; Médici, M. y Valdez, G.F. de (2005) *Alimentos funcionales probióticos*. Química Viva 1(año 4): 26-34.
245. Thomas, T. (1987) *Cannibalism among bacteria found in cheese*. New Zeal. J. Dairy Sci. 22: 215-219.
246. Thomas, T.D. y Crow, V.L. (1983) *Mechanism of D(-)-lactic acid formation in Cheddar cheese*. New Zeal. J. Dairy Sci. 18: 131-141.
247. Thomas, T.D. y Crow, V.L. (1984) *Selection of galactose-fermenting Streptococcus thermophilus in lactose-limited chemostat cultures*. Appl. Environ. Microbiol. 48: 186-191.
248. Thomas, T.D.; McKay, L.L. y Morris, H.A. (1985) *Lactate metabolism by Pediococci isolated from cheese*. Appl. Environ. Microb. 49: 908-913.
249. Tissier, H. (1906) *Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin*. CR. Soc. Biol. 60: 359-361.

250. Tuomola, E.M.; Ouwehand, A.C. y Salminen, S.J. (1999) *The effect of probiotic bacteria on adhesion of pathogens to human intestinal mucus*. FEMS Immunol. Med. Mic. 26: 137-142.
251. Urbach, G. (1997) *The flavour of milk and dairy products. II. Cheese: contribution of volatile compounds*. Int. J. Dairy Technol. 50: 79-89.
252. Valdez, G.F. de y Giori, G.S. de (1993) *Effectiveness of soy milk as food carrier for Lactobacillus acidophilus*. J. Food Protect. 56: 320-322.
253. Van Niel, C.W.; Feudtner, C.; Garrison, M.M. y Christakis, D.A. (2002) *Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhoea in children: a meta-analysis*. Pediatrics 109: 678-684.
254. Vassal, L. (1996) *La influencia de factores tecnológicos y zootécnicos en la maduración de quesos. I- Factores ligados a la microflora*. Rev. Argent. Lactol. 13: 51-74.
255. Vaughan, E.E.; de Vries, M.C.; Zoetendal, E.G.; Ben-Amor, K.; Akkermans, A.D.L. y de Vos, W.M. (2002) *The intestinal LABs*. Anton. Leeuw. 82: 341-352.
256. Verdini, R.A.; Zorrilla, S.E. y Rubiolo, A.C. (2004) *Characterisation of soft cheese proteolysis by RP-HPLC analysis of its nitrogenous fractions. Effect of ripening time and sampling zone*. Int. Dairy J. 14: 445-454.
257. Villarreal, F. (2002) *Aislamiento y caracterización de lactobacilos intestinales con potencial probiótico*. Tesis de Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
258. Vinderola, C.G.; Costa, G.A.; Regenhardt, S. y Reinheimer, J.A. (2002a) *Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria*. Int. Dairy J. 12: 579-589.
259. Vinderola, C.G.; Mocchiutti, P. y Reinheimer, J.A. (2002b) *Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products*. J. Dairy Sci. 85: 721-729.
260. Vinderola, C.G.; Prosello, W.; Ghiberto, D. y Reinheimer, J.A. (2000) *Viability of probiotic (Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese*. J. Dairy Sci. 83: 1905-1911.
261. Vinderola, C.G. y Reinheimer, J.A. (1999) *Culture media for the enumeration of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus in the presence of yogurt bacteria*. Int. Dairy J. 9: 497-505.
262. Vinderola, C.G. y Reinheimer, J.A. (2000) *Enumeration of Lactobacillus casei in the presence of L. acidophilus, bifidobacterias and lactic starter bacteria in fermented dairy products*. Int. Dairy J. 10: 271-275.
263. Volker, D.H. y Garg, M.L. (2001) *Cap. 22: Omega-3 polyunsaturated fatty acids and rheumatoid arthritis*. En: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods* (Ed: Wildman, R.E.C.) CRC Press, Estados Unidos, p. 353-376.
264. Wang, X. y Gibson, G.R. (1993) *Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine*. J. Appl. Bacteriol. 75: 373-380.

265. Watkinson, P.; Coker, C.; Crawford, R.; Dodds, C.; Johnston, K.; McKenna, A. y White, N. (2001) *Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis*. Int. Dairy J. 11: 455-464.
266. Wildman, R.E.C. (2001a) *Cap. 1: Nutraceuticals: a brief review of historical and teleological aspects*. En: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods* (Ed: Wildman, R.E.C.) CRC Press, Estados Unidos, p. 1-12.
267. Wildman, R.E.C. (2001b) *Cap. 2: Classifying nutraceuticals*. En: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods* (Ed: Wildman, R.E.C.) CRC Press, Estados Unidos, p. 13-30.
268. Williams, A.G.; Noble, J.; Tamman, J.; Lloyd, D. y Banks, J.M. (2002) *Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese*. Int. Dairy J. 12: 841-852.
269. Wolk, A.; Manson, J.E.; Stampfer, M.J.; Colditz, G.A.; Hu, F.B.; Speizer, F.E.; Hennekens, C.H. y Willett, W.C. (1999) *Long-term intake of dietary fiber and decreased risk of coronary heart disease among women*. J. Amer. Med. Assoc. 281: 1998-2004.
270. Xiao, J.Z.; Kondo, S.; Yanagisawa, N.; Takahashi, N.; Odamaki, T.; Iwabuchi, N.; Iwatsuki, K.; Kokubo, S.; Togashi, H.; Enomoto, K. y Enomoto, T. (2006) *Effect of probiotic Bifidobacterium longum BBS36 in relieving clinical symptoms and modulating plasma cytokine levels of japanese cedar pollinosis during the pollen season. A randomized double-blind, placebo-controlled trial*. J. Invest. Allerg. Clin. 16: 86-93.
271. Yvon, M. y Rijnen, L. (2001) *Cheese flavour formation by amino acid catabolism*. Int. Dairy J. 11: 185-201.
272. Zalazar, C.A.; Meinardi, C. y Hynes, E. (1999) *Cap. 3: Los quesos argentinos*. En: *Quesos típicos argentinos: Una revisión general sobre producción y características*. Centro de Publicaciones de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, p. 20-49.
273. Zalazar, C.; Meinardi, C.; Reinheimer, J.A., Ramanzin, M.; Bernal de Zalazar, S. y Rafaghelli, R. (1979) *Evolución de la composición química y de la flora microbiana del queso Pategrás Argentino durante la maduración*. Revista de la Facultad de Ingeniería Química U.N. del Litoral 43: 79-85.
274. Zoetendal, E.G.; Akkermans, A.D.L.; Akkermans-van Vliet, W.M.; de Visser, J.A.G.M. y de Vos, W.M. (2001) *The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract*. Microb. Ecol. Health D. 13: 129-134.
275. Zoetendal, E. G.; Akkermans, A. D.; de Vos, W. M. (1998) *Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human faecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria*. Appl. Environ. Microb. 64: 3854-3859.