

MATERIALES Y MÉTODOS



1- Fermentos

Los fermentos probióticos se seleccionaron del mercado local, de manera de ensayar una muestra representativa de las cepas probióticas que actualmente se ofrecen a la industria láctea. De esa forma se escogieron seis cepas, comercializadas por tres conocidos proveedores de insumos para la industria láctea.

Una cepa de *L. rhamnosus*, perteneciente al cepario del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), aislada de heces de un lactante sano, fue asimismo incluida en este estudio.

Las características de las cepas seleccionadas se describen a continuación:

Cepas comerciales

1. *Lactobacillus acidophilus* A: esta cepa es comercializada por un proveedor local, y según datos aportados por el mismo, cuenta con diversas propiedades probióticas demostradas por estudios *in vitro* e *in vivo*. *L. acidophilus* A es utilizada por industrias lácteas locales en diversos productos probióticos.

2. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*: según datos del proveedor, esta cepa es de origen intestinal humano (infantil), presenta buen crecimiento entre 35-45°C, y ha demostrado estabilidad en un amplio rango de productos como yogur, jugo de fruta y carne procesada, y en condiciones del tracto gastrointestinal. En cuanto a sus propiedades funcionales, ha manifestado inhibición contra *Escherichia coli* O111 y *Listeria monocytogenes* (Pidcock y col., 2002) y protección contra la infección *in vivo* por *Salmonella typhimurium* (Henriksson y col., 2002).

3. *Lactobacillus acidophilus* B: esta cepa es de origen lácteo, presenta buen crecimiento entre 35-45°C, y ha mostrado estabilidad en yogurt, helado y carne procesada, y en condiciones simuladas del estómago y del tracto gastrointestinal, y también en jugo gástrico humano. Según la información suministrada por el proveedor, *L. acidophilus* B tiene la capacidad de adherirse a células intestinales y colonizar el colon, inhibir *Listeria monocytogenes*, tanto en productos como en el tracto gastrointestinal (Henriksson y col., 2002, Mahoney y Henriksson, 2003). También ha demostrado inhibición de *Escherichia coli* O111, y reducción de la incidencia de formación de tumores en ratas (Pidcock y col., 2002). Asimismo, siempre según datos de la empresa, en un estudio realizado en humanos saludables, y controlado con placebo, esta cepa ha demostrado tener un efecto positivo sobre el bienestar general y el potencial de disminuir la severidad de molestias gastrointestinales.

4. *Bifidobacterium lactis*: esta cepa fue aislada de intestino humano, ha mostrado ser resistente y sobrevivir en el tracto gastrointestinal humano (Su y col., 2005), y en productos alimenticios, tales como yogurt y carne procesada (Crittenden y col., 2001, Henriksson y col., 2002, Pidcock y col., 2002). También se ha señalado que la cepa ejerce protección contra la infección por *Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens* (Playne y col., 2003), e inhibe *Escherichia coli* O111 y *Listeria monocytogenes* (Pidcock y col., 2002).

5. *Lactobacillus acidophilus* C: según Playne y col. (2003), esta cepa constituye una de las que registran mayor cantidad de datos clínicos publicados, aunque los mismos son relativamente inciertos, ya que usualmente ha sido coadministrada con una cepa de *Bifidobacterium* de la misma empresa. Entre sus efectos benéficos se encuentran la prevención o alivio de ciertos desórdenes gastrointestinales, como diarreas de diferente etiología y constipación, disminución de la intolerancia a la lactosa, efectos sobre el sistema inmune, inhibición de la formación de tumores, y efecto hipocolesterolémico (Möller y de Vrese, 2004).

6. *Lactobacillus casei*: La inclusión de una cepa de *L. casei* en este estudio se fundamenta por el hecho de la reconocida popularidad de varias cepas de esta especie en diversos productos disponibles en el mercado, como *L. casei* Inmunitas en Actimel, *L. casei* Shirota en Yakult y *L. casei* del CERELA en Leche Bio, entre otros (Sanders y Huis int't Veld, 1999, Taranto y col., 2005). La cepa probiótica ensayada es comercializada a nivel internacional por una prestigiosa firma de insumos para la industria láctea, y hasta el momento se ha incluido en productos lácteos fluidos como el Symbalance (Sanders y Huis int't Veld, 1999).

Cepa del INLAIN

7. *Lactobacillus rhamnosus* F16: Esta cepa ha sido aislada en nuestro Instituto a partir de heces de un lactante sano durante el desarrollo de una tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, en el año 2002, y fue caracterizada en cuanto a sus propiedades tecnológicas y probióticas por medio de estudios *in vitro*. La cepa presentó buen crecimiento a pH 5 y 5,5 en medio de cultivo, y mostró resistencia a sales (NaCl y KCl) en un rango de concentraciones de 1-3%p/v. Asimismo, presentó una excelente viabilidad en leche acidificada a pH 4 y 5, mantenida a 5°C por 30 días, y, además, buena resistencia en solución gástrica de pH 3 a 37°C durante 3 h, y resistencia a la bilis hasta una concentración

de 0,6%. En cuanto a sus propiedades funcionales, fue capaz de inhibir microorganismos patógenos, como *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Villarreal, 2002). En vista de estos antecedentes, y aunque no se trata de una cepa comercial, se la incluyó en el presente estudio a fin de continuar con su caracterización tecnológica.

2- Diseño experimental

Las cepas se emplearon en ocho ensayos de elaboración de queso, siete en forma individual y uno en el que se usó una combinación de tres de ellas, según se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 4. Cepas utilizadas en cada ensayo.

Ensayo	Cepa
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> A
2	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> B
4	<i>Bifidobacterium lactis</i>
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> C
6	<i>Lactobacillus casei</i>
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> INLAIN
8	<i>L. acidophilus</i> C, <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>B. lactis</i> *

* Cepas seleccionadas en base a los resultados obtenidos en los ensayos individuales. Ver página 94.

En cada ensayo se elaboraron en un mismo día tres tipos de quesos: un testigo y dos experimentales:

Queso testigo (T): sin agregado de probióticos.

Queso Experimental 1 (E1): con la incorporación de las bacterias probióticas directamente en forma liofilizada o, en el caso de *L. rhamnosus*, con la adición del *pellet* de un cultivo concentrado.

Queso Experimental 2 (E2): con bacterias probióticas agregadas previa incubación en un sustrato lácteo graso.

Estos quesos fueron elaborados por triplicado en tres días diferentes, obteniéndose por lo tanto 9 quesos en cada ensayo, lo que dio un total de 72 quesos para todo el trabajo.

3- Metodología de adición del fermento probiótico

El estado fisiológico celular de las bacterias probióticas al momento de su incorporación a una matriz alimentaria es un factor que puede influir en la supervivencia de las mismas en el producto durante el período de vida útil (Heller y col., 2003). Teniendo en cuenta este aspecto, en el presente trabajo se estudiaron dos metodologías diferentes para la incorporación del fermento probiótico al queso, dando lugar a los dos tipos de quesos experimentales citados anteriormente.

En el *queso experimental 1*, se ensayó la incorporación directa de las bacterias probióticas junto con el fermento primario. En un erlermeyer estéril se pesó una cantidad suficiente de polvo liofilizado de dichos fermentos tal como para alcanzar una concentración de cada uno en la leche de elaboración de 10^6 UFC mL⁻¹. Luego, se agregó aproximadamente 150 mL de leche de elaboración, ya pasteurizada y enfriada a 37°C, al erlermeyer conteniendo los cultivos. Luego de un tiempo de 10-15 minutos que permitió una completa resuspensión de dichos fermentos en la leche, el contenido del erlermeyer fue adicionado a la tina de elaboración del queso experimental 1.

En el *queso experimental 2*, se estudió la incorporación de las bacterias probióticas utilizando una metodología adaptada de Daigle y col. (1999), que se basa en una preincubación del fermento en un sustrato lácteo, rico en materia grasa y proteínas, antes de su adición a la tina quesera. Esta metodología constituye la aplicación de una fermentación en dos pasos, que ha sido propuesta para incrementar la supervivencia probiótica en los productos (Shah, 2000).

El sustrato lácteo graso (SLG), utilizado para la preincubación de los probióticos, se preparó a partir de 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 provista por Milkaut S.A. (Frank, Santa Fe, Argentina). La crema de leche fue trasladada refrigerada desde la empresa láctea al laboratorio, y el contenido exacto de materia grasa de la crema (aproximadamente 40% p/p), fue determinado cada día (FIL-IDF, 1997).

Para cada queso experimental 2 (volumen de leche: 45 L), se utilizó 1 L de SLG (inóculo aproximado de 2%), que fue preparado el día anterior a la elaboración. De

acuerdo a Daigle y col. (1999), se adoptó para el mismo una composición de 14% p/v de materia grasa y 5,2% p/v de proteínas:

- La cantidad de leche en polvo que se utilizó, se calculó teniendo en cuenta la concentración de proteínas requerida en el SLG y el volumen a preparar, y la cantidad de proteínas presente en el polvo de leche:

$$\text{Masa de leche en polvo para el SLG} = \frac{5,2g(\text{proteínas})}{100mL} \times 1000mL \times \frac{100g}{35,3g} = 147,3g$$

- La cantidad de crema de leche que se utilizó, se calculó teniendo en cuenta la concentración de materia grasa requerida en el SLG y el volumen a preparar, el porcentaje de grasa en la crema, y la cantidad aportada por la leche en polvo:

Masa de crema para el SLG =

$$\left\{ \frac{14g(\text{grasa})}{100mL} \times 1000mL - \left(\frac{1,2g(\text{grasa})}{100g(\text{polvoleche})} \times 147,3g(\text{polvoleche}) \right) \right\} \times \frac{100g}{\%grasa / crema}$$

La cantidad calculada de crema de leche se introdujo en un erlermeyer de 2 L de capacidad, previamente esterilizado. La leche en polvo fue pesada y disuelta totalmente en agua destilada, y posteriormente adicionada al erlermeyer. Finalmente, se adicionó agua hasta alcanzar un volumen final de 1 L. El SLG se pasteurizó a baño maría a 80°C durante 5 minutos, y luego se enfrió rápidamente hasta 37°C.

En un recipiente estéril se pesó la cantidad de fermento liofilizado necesaria para conseguir una concentración en el SLG de 5×10^7 UFC mL⁻¹. El fermento se adicionó en condiciones de esterilidad al SLG y se incubó a baño maría durante 5 h a 37°C, luego de lo cual se mantuvo a 4°C hasta el día siguiente en que se utilizó para la elaboración de los quesos.

La evolución de la población probiótica y la composición del SLG inoculado con cada cepa probiótica ensayada fueron determinadas durante la incubación y el posterior almacenamiento en refrigeración.

La cantidad inicial del fermento probiótico utilizada para los quesos E1 y E2 fue la misma, independientemente de su forma de agregado.

La preparación de los inóculos para E1 y E2 en el ensayo con *L. rhamnosus* fue distinta, debido a que de dicha cepa no se disponía de un cultivo liofilizado. Esta cepa se encontraba conservada en congelador a -20°C, en crioviales con caldo MRS y glicerol

(15% v/v). Por esta circunstancia, en primer lugar, se reactivó la cepa, para lo cual el contenido total de uno de los crioviales fue descongelado y trasvasado a un tubo con 5 mL de caldo MRS, que se incubó a 37°C durante 24 h. Al día siguiente, luego de comprobar un buen crecimiento de la cepa, de acuerdo a la turbidez del medio, y de observar la morfología de las células al microscopio bajo iluminación de contraste de fases (1000x, Microscope Jenamed 2, CARL ZEISS), se realizó una siembra en 5 estrías en placas con MRS-agar para comprobar la pureza del cultivo. Las placas fueron incubadas en microaerofilia a 37°C durante 24 h, luego de lo cual se verificó la presencia de un solo tipo de colonia y se realizó una observación microscópica de las mismas. Paralelamente, se hizo una prueba de crecimiento en leche descremada reconstituida (10% p/v) esterilizada, con el objetivo de determinar la capacidad de la cepa de crecer y coagular la leche, y también con la finalidad de una conservación temporaria de la cepa bajo refrigeración (5°C).

Luego de comprobar la pureza de la cepa, se obtuvo un cultivo concentrado de *L. rhamnosus*, y se determinó su concentración, con la finalidad de establecer la cantidad necesaria de dicho cultivo para inocular la leche de elaboración. Para ello, se realizó un repique del cultivo inoculando 0,2 mL en otro tubo conteniendo 5 mL de caldo MRS, que se incubó 24 h a 37°C, obteniendo un cultivo *over night*. Al día siguiente, varios tubos con 10 mL de caldo MRS se inocularon con 0,4 mL del *over night*, y se incubaron a 37°C. Se determinó la turbidez del cultivo, midiendo la absorbancia a 560 nm del medio inoculado contra un blanco del medio sin inocular. Las mediciones se realizaron a intervalos regulares de 30 minutos luego de 1 h de incubación, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,8. Una vez alcanzado dicho grado de turbidez, se realizó un recuento del caldo en placas con MRS-agar. Para ello, se realizaron diluciones decimales del cultivo concentrado en agua de peptona de caseína al 0,1% p/v, y las diluciones apropiadas fueron sembradas en superficie e incubadas a 37°C durante 48 h en microaerofilia.

Teniendo en cuenta la concentración de bacterias probióticas requerida en la leche de elaboración (10^6 UFC mL⁻¹) y el volumen de la misma para cada queso (45 L), y además, los resultados obtenidos del recuento de *L. rhamnosus* en el cultivo concentrado, se calculó la cantidad de cultivo necesaria para el inóculo, con la siguiente expresión:

$$\text{Vol. de cultivo concentrado (mL)} = \frac{1000000 \text{ UFC}}{\text{mL}} \times 45000 \text{ mL} \times \frac{1}{\text{UFC / mL cultivo}}$$

El cultivo concentrado fue preparado el día anterior a las elaboraciones. Para ello, se inoculó la cantidad necesaria de caldo MRS con un cultivo *over night*, y se incubó en baño maría a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,8. Luego, el cultivo concentrado fue trasvasado en condiciones de esterilidad a tubos Falcon estériles de 50 mL, y centrifugado a 3000 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado, y el *pellet* celular obtenido fue incorporado al sustrato lácteo graso pasteurizado. El *pellet* correspondiente al queso experimental 1, fue resuspendido en 50 mL de leche descremada reconstituida al 10% p/v, previamente esterilizada y se inoculó en la leche de elaboración.

4- Elaboraciones de quesos

El tipo de queso seleccionado para vehiculizar las bacterias probióticas fue el Pategrás Argentino (Art. 630 del Código Alimentario Argentino). Esta decisión se adoptó teniendo en cuenta que existen pocos trabajos sobre la incorporación de bacterias probióticas en quesos semiduros, y que, además, el queso Pategrás es la variedad más popular en nuestro país dentro de este tipo de quesos (pasta semidura). Por otra parte, la tecnología de fabricación no incluye etapas tales como cocción a temperatura elevada, lavado de la cuajada o salado directo, que podrían considerarse agresivas para la población probiótica. Además, el período de maduración de esta variedad, de al menos 30 días, favorecería la obtención de un alimento probiótico de vida útil prolongada.

Las elaboraciones fueron realizadas en la planta piloto del INLAIN, adaptando la tecnología industrial de fabricación del queso Pategrás a la escala piloto (Zalazar y col., 1999).

El contenido de materia grasa en la leche fue establecido a un nivel levemente mayor al valor mínimo establecido en el Código Alimentario (3,0% p/v) (ANMAT, 2006), con el objetivo de facilitar la tarea de estandarización de la misma entre los diferentes tipos de queso, debido al posterior agregado de un sustrato que aportaba 0,3% de materia grasa en uno de los tipos de quesos experimentales elaborados.

Cada día de elaboración, se recibió leche cruda de la planta de Milkaut S.A., ubicada en Franck (Santa Fe, Argentina), la cual fue pasteurizada en tina a 65°C durante 20 minutos, y posteriormente enfriada a 37°C. Se adicionó cloruro de calcio (Merck, Darmstadt, Germany) a una concentración final de 0,02% p/v, con el objetivo de restaurar la concentración de calcio iónico que se ve disminuida por el proceso de pasteurización. Luego, la leche fue dividida en tres alícuotas de 45 L para la elaboración de cada tipo de

queso (T, E1, E2). El contenido de materia grasa en la leche de elaboración fue estandarizado utilizando crema de leche provista por la misma firma, y pasteurizada en el laboratorio en un baño maría a 80°C durante 5 minutos.

En los quesos T y E1, la materia grasa se estandarizó a 3,8% p/v. En el queso E2, la materia grasa se ajustó a 3,5% p/v, ya que el posterior agregado del SLG elevaba el contenido a 3,8% p/v. Por otro lado, en los quesos T y E1, se adicionó la misma cantidad de leche en polvo, previamente disuelta en agua, que la utilizada para la preparación del SLG, con el objetivo de igualar el contenido de sólidos lácteos no grasos en la leche para todos los quesos.

Luego, se agregaron los fermentos primario y adjunto. El fermento primario consistía en un starter comercial compuesto de cepas seleccionadas de *S. thermophilus* (Diagramma S.A., Santa Fe, Argentina). En general, todos los fermentos se adicionaron en una cantidad que permitiera obtener una concentración en la leche de 10^6 UFC mL⁻¹, excepto en los casos que se debió disminuir el inóculo debido a problemas de gran acidificación en el SLG (Ensayos 3, 5 y 8). Para cada uno de los quesos, la cantidad adecuada de fermento primario se pesó en un recipiente estéril, al cual se adicionó posteriormente 150 mL de leche de elaboración, y se mantuvo a 37°C durante 10-15 minutos para lograr una perfecta hidratación y resuspensión del polvo liofilizado, antes de su agregado a la tina de elaboración. En los quesos E1, conjuntamente se agregó el fermento probiótico adjunto. Por último, en el queso E2 se agregó el fermento primario resuspendido en una porción de leche de elaboración, y el fermento probiótico preincubado en el SLG. Antes de su adición a la tina, el sustrato preincubado con los probióticos y mantenido en la heladera, se colocó en un baño maría a 37°C para alcanzar la temperatura de elaboración.

Un gramo de quimosina producida por fermentación de *Kluyveromyces lactis* modificado genéticamente (Maxiren 150, Gist Brocades, France) se dispersó en 25 mL de agua destilada, y se agregó a la leche 15 minutos después de la adición de los fermentos. Luego de la coagulación y cuando la cuajada alcanzó la firmeza adecuada, se procedió al corte. La firmeza se evaluó empíricamente con la ayuda de una espátula, observando la resistencia al corte y la limpieza del mismo. El corte se llevó a cabo manualmente con lira de alambre, en etapas sucesivas, hasta que los trozos de cuajada alcanzaron el tamaño de granos de maíz (aproximadamente 20 minutos). Entre corte y corte, la mezcla suero-partículas de cuajada se mantuvo en agitación suavemente, mientras se elevaba la temperatura a una velocidad de 0,5°C min⁻¹ hasta 45°C. Posteriormente, se continuó agitando completándose unos 15-20 minutos de calentamiento, con el objetivo de reducir

la humedad de los granos de cuajada. Una vez obtenida la humedad del grano adecuada para la obtención de un queso Pategrás, la cuajada fue separada del suero y colocada en moldes cilíndricos de aproximadamente 30 cm de diámetro. Los tres quesos obtenidos fueron apilados y prensados durante 24 h (0,2-0,3 kg cm⁻²). Luego, se salaron en salmuera (NaCl 20% p/v, pH 5,40), durante 24 h, y se maduraron a 12°C y 80% de humedad relativa durante 2 meses.

Los quesos obtenidos fueron de aproximadamente 4 kg, por lo que el tiempo de maduración mínimo es de 45 días según el Código Alimentario Argentino (ANMAT, 2006). En la presente tesis, la maduración del producto se prolongó hasta 60 días, con el objetivo de establecer si las bacterias probióticas permanecían viables por un tiempo más largo, en cuyo caso el alimento probiótico tendría un mayor período de vida útil.

5- Determinaciones analíticas

5.1- Recuentos microbiológicos de los fermentos utilizados

Para lograr una correcta dosificación de los fermentos comerciales en la elaboración de los quesos, se verificó su concentración. Para ello, 1 g del polvo liofilizado se colocó, en condiciones de esterilidad, en un tubo con 10 mL de agua de peptona de caseína al 0,1% p/v (Microquim, Santa Fe, Argentina). Luego de una resuspensión total del fermento, se realizaron diluciones decimales en agua de peptona 0,1% p/v, y se sembraron en superficie las diluciones apropiadas en diferentes medios.

El recuento de *S. thermophilus* fue realizado en APC-Leche (Frank y col., 1993). Por otro lado, también se observaron las características de las colonias de *S. thermophilus* en MRS-agar, para verificar que no interfirieran en el recuento de las bacterias probióticas.

El medio de cultivo para los recuentos de cada cepa probiótica fue seleccionado en base a pruebas preliminares realizadas en este trabajo y a estudios previos sobre el tema (Vinderola y Reinheimer, 1999 y 2000, Vinderola y col., 2002a). De esta manera, fue posible aplicar métodos de recuento diferencial para enumerar cada cepa probiótica ensayada, en presencia del fermento primario, o de otros fermentos probióticos. Si bien los medios de cultivo ensayados no fueron específicos, se verificó la selectividad de los mismos, basada principalmente en la diferente morfología de las colonias de las distintas cepas bacterianas.

De este modo, el recuento de todos los lactobacilos utilizados en forma individual se llevó a cabo en MRS-agar. La cepa de *Bifidobacterium lactis* fue enumerada en MRS con agregado de cloruro de litio (0,2% p/v) y propionato de sodio (0,3% p/v) como agentes selectivos (Vinderola y Reinheimer, 1999).

Los recuentos del fermento primario y de los lactobacilos fueron realizados luego de 48 h de incubación a 37°C en aerobiosis. La incubación de las bifidobacterias se realizó a 37°C en jarra de anaerobiosis durante 72 h.

Asimismo, todas las cepas fueron probadas en APC-Leche, para verificar que no interferían en el recuento de *S. thermophilus*.

5.2- Sustrato lácteo graso

Durante la puesta a punto de la preparación del sustrato lácteo graso se controló la viabilidad de las bacterias probióticas y el grado de acidificación producido por la actividad de las mismas. Los resultados obtenidos fueron utilizados para regular, en los casos en que fue necesario, la concentración del fermento probiótico.

Se realizaron determinaciones del valor de pH y recuentos microbiológicos del fermento probiótico al inicio y a las 2 y 5 h de incubación a 37°C, y al día siguiente (aproximadamente a las 20 h), luego de su almacenamiento en heladera. La muestra para el análisis del SLG se extrajo en condiciones de asepsia, luego de una correcta homogeneización del mismo, realizada por agitación manual.

5.2.1- Análisis microbiológicos

Se realizaron diluciones decimales del SLG en agua de peptona de caseína al 0,1% (Microquim, Santa Fe, Argentina), y alícuotas de 0,1 mL de las diluciones apropiadas fueron sembradas en superficie en diferentes medios según la cepa utilizada.

El medio utilizado para el recuento de los lactobacilos en el SLG, utilizados en forma individual, fue MRS-agar (Britania, Buenos Aires, Argentina), y la incubación se realizó a 37°C, durante 48 h (Vinderola y Reinheimer, 2000).

El recuento de las bifidobacterias se realizó sobre MRS-agar con agregado de cloruro de litio (0,2% p/v) y propionato de sodio (0,3% p/v) (Vinderola y Reinheimer, 1999). La incubación se realizó en jarra de anaerobiosis a 37°C, durante 72 h.

Por último, en el caso del ensayo 8, en el cual se utilizaron tres cepas probióticas, se usó el mismo medio citado para el recuento de las bifidobacterias, pero los lactobacilos fueron enumerados en MRS-agar con agregado de 1,5 mL de bilis 10% a 100 mL de

medio, para una mejor diferenciación de *L. acidophilus* y *L. paracasei* (Vinderola y Reinheimer, 2000).

5.2.2- pH

El valor de pH se determinó en el SLG según el método estándar propuesto por la APHA (Bradley y col., 1993). Para ello, se utilizó un peachímetro Orion (Orion Research Incorporated, Estados Unidos), provisto de un electrodo combinado (vidrio y calomel), que se calibró con soluciones tamponadas de pH 7,00 y 4,00. La determinación se realizó directamente por inmersión del electrodo en un volumen aproximado de 5 mL del SLG. La lectura de pH se realizó una vez estabilizado el valor del mismo, y por duplicado.

5.3- Leche y Crema de leche

La muestra de leche cruda se extrajo inmediatamente antes de la pasteurización, una vez que la agitación y el calentamiento inicial (hasta 40°C) garantizaron una correcta distribución de la materia grasa. Se extrajeron alrededor de 100 mL, que se analizaron inmediatamente.

La muestra de crema de leche se extrajo luego de una agitación suave para no dañar la integridad de los glóbulos grasos.

5.3.1- Materia grasa

El contenido de materia grasa en la leche cruda y en la crema de leche se determinó mediante métodos butirométricos, por duplicado (FIL-IDF, 1997).

Para el análisis de la leche, se introdujeron 10 mL de una solución de ácido sulfúrico de densidad 1,82 (aproximadamente 90% v/v) en el interior de un butirómetro específico para leche. Luego, se colocaron 11 mL de leche, medidos con una pipeta volumétrica específica, y finalmente 1 mL de alcohol isoamílico. Se cerró el butirómetro y se agitó hasta disgregación total del coágulo de caseína. Luego, se llevó a baño maría a 60-65°C durante 10 minutos, y se centrifugó en una centrífuga específica para butirómetros, ajustándose nuevamente la temperatura a 65°C antes de la lectura. Finalmente, se ajustó el tapón hasta hacer coincidir la parte inferior de la capa de grasa con una línea de la escala graduada del butirómetro y se realizó la lectura del porcentaje de materia grasa.

Para el análisis de la crema de leche, se utilizó un butirómetro específico, abierto en sus dos extremos. Se pesó una cantidad de muestra entre 4 y 5 g y se agregaron 10 mL de agua destilada, 10 mL de una solución de ácido sulfúrico de densidad 1,82

(aproximadamente 90% v/v), y 1 mL de alcohol isoamílico. Se cerró el butirómetro y se continuó con el análisis como en el caso de la leche. Finalmente, se leyó en la escala el espacio ocupado por la grasa y este valor se utilizó para el cálculo de la materia grasa en la crema, según la siguiente fórmula:

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

L: lectura en el butirómetro

5: masa de muestra para el cual está graduado el butirómetro.

m: masa (g) de muestra exacta.

5.3.2- pH

El pH de la leche se determinó mediante el método estándar propuesto por la APHA (Bradley y col., 1993), utilizando el mismo instrumental que se mencionó para el análisis del SLG. La determinación se realizó directamente por inmersión del electrodo en una alícuota de leche, y la lectura de pH se realizó una vez estabilizado el valor del mismo en el peachímetro, por duplicado.

5.4- Quesos

5.4.1- Muestreo y conservación de las muestras

El muestreo de los quesos se realizó de acuerdo a la norma 50A de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF, 1980).

El suero y la cuajada se muestrearon durante el moldeo, extrayéndose aproximadamente 30 g de cada uno para el análisis microbiológico. Cada muestra fue colocada en un erlemeyer estéril.

Las muestras de queso para análisis microbiológico y fisicoquímico se extrajeron en varias ocasiones durante la maduración.

En cada día de muestreo, en primer lugar se limpiaba la superficie de los quesos, y se tomaba la muestra para los recuentos microbiológicos en condiciones asépticas y utilizando un calador estéril. Se descartaba la parte más cercana a la corteza, y se colocaban 10 g de queso en un erlemeyer estéril, reservándose en heladera hasta su análisis microbiológico, realizado en el mismo día. Luego, utilizando igual procedimiento que el citado, se tomaban aproximadamente 50 g de queso, que se colocaban en un colector adecuado para los análisis físicos y químicos. La muestra se trituraba mediante una prensa manual, se homogeneizaba rápidamente evitando la pérdida de humedad de la misma, y se

fraccionaba en colectores destinados a los diferentes análisis fisicoquímicos. El contenido de materia grasa, extracto seco, nitrógeno total y el valor de pH, se determinaron inmediatamente. Para los demás análisis, las muestras fueron congeladas a -18°C , hasta su procesamiento.

De acuerdo al diseño del presente trabajo de investigación, la misma unidad experimental (queso) se muestreaba durante todo el período de maduración. Para permitir la conservación del queso y la continuación de la maduración sin que se vea afectada por la contribución a dicho proceso por parte de microorganismos no lácticos indeseables, luego de la toma de muestra, los orificios se rellenaron con parafina en condiciones asépticas.

5.4.2- Análisis microbiológicos

El fermento primario y el fermento probiótico se enumeraron en la cuajada (0 día) y en el queso a los 3, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. También se realizó el recuento de bacterias probióticas en el suero, con el objetivo de determinar si la pérdida de probióticos era significativa.

Para el análisis en suero, se realizaron diluciones decimales del mismo en agua de peptona de caseína 0,1% p/v (Microquim, Santa Fe, Argentina), y alícuotas de 0,1 mL de las diluciones apropiadas se sembraron en superficie en diferentes medios, de acuerdo al fermento analizado.

Para el análisis en los quesos, la muestra tomada en condiciones de asepsia (10 g) fue emulsionada con 90 mL de citrato de sodio estéril (2% p/v) en un recipiente mezclador estéril. Se realizaron diluciones decimales en agua de peptona de caseína al 0,1% y alícuotas de 0,1 mL de las diluciones apropiadas fueron sembradas en superficie en diferentes medios, de acuerdo al fermento analizado.

Para el recuento del starter primario se utilizó APC-Leche, y se incubó a 37°C durante 48 h (Frank y col., 1993). Para el recuento de los probióticos se utilizaron los mismos medios y condiciones de incubación que se describieron para el SLG.

Finalmente, se realizó el recuento de bacterias lácticas no pertenecientes al fermento o NSLAB en MRS-agar, a los 3, 15, 30, 45 y 60 días de maduración, para conocer los niveles alcanzados por este grupo microbiano habitualmente presente en el queso, y comparar la dinámica de esta población adventicia con la evolución del fermento probiótico adjunto en los quesos experimentales.

5.4.3- Composición de los quesos

El contenido de materia grasa, proteínas totales y humedad de los quesos fue determinado en muestras de 3 días de maduración, mientras que el valor de pH fue medido a los 3, 30 y 60 días. El contenido de cloruro de sodio fue analizado a los 30 días, para facilitar la obtención de una muestra representativa, una vez que la concentración de NaCl en el queso fuera más homogénea (Verdini y col., 2004).

pH

La determinación de pH en las muestras de queso se realizó de acuerdo al método estándar de la APHA (Bradley y col., 1993). El instrumental utilizado fue el mismo que el anteriormente descrito. La medición se realizó introduciendo el electrodo directamente en una porción de muestra colocada en un colector adecuado, y compactada de tal modo de permitir un buen contacto entre ambos. La lectura de pH se realizó una vez que se estabilizó el valor del mismo en el peachímetro, por duplicado.

Extracto seco

El extracto seco fue determinado por secado de la muestra a $102 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta pesada constante, de acuerdo a la metodología de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF, 1982), por duplicado.

En primer lugar, se pesó un cristalizador que contenía arena tratada (alrededor de 25 g) y una varilla de vidrio, y que previamente había sido secado en conjunto a la misma temperatura del ensayo. Luego, se colocó una cantidad de muestra de aproximadamente 3 g de queso en el cristalizador y se pesó nuevamente. La muestra se homogeneizó lo mejor posible con la arena con la ayuda de la varilla, cuidando de no perder ningún contenido del cristalizador. Se colocó en estufa a 102°C hasta pesada constante, aproximadamente 5 h, homogeneizando periódicamente para evitar la formación de una capa que dificulte la evaporación. Finalmente, se registró el peso del cristalizador con la muestra seca, y se calculó el contenido de extracto seco de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Extracto seco (\% p/p)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

m_0 : masa (g) del cristalizador con arena y varilla.

m_1 : masa (g) del cristalizador con arena y varilla, y la muestra recién colocada.

m_2 : masa (g) del cristalizador con arena y varilla, y la muestra, luego del secado en estufa hasta pesada constante.

Materia grasa

El contenido de materia grasa en el queso fue determinado por un método butirométrico de acuerdo a la norma de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF, 1997), por duplicado.

Para ello, se utilizó un butirómetro específico para queso. Se pesaron aproximadamente 1,5 g de queso (pesada exacta) y se agregaron 10 mL de una solución de ácido sulfúrico de densidad 1,82 (aproximadamente 90% v/v). Luego se adicionaron lentamente 8 mL de agua destilada y, finalmente, 1 mL de alcohol isoamílico. Se cerró el butirómetro y se continuó la determinación como se explicó previamente. Finalmente, se leyó, en la escala, el espacio ocupado por la grasa y este valor se utilizó para el cálculo de la materia grasa en el queso, según la siguiente fórmula:

$$\text{Materia grasa (\% p/p)} = \frac{L \times 3}{m}$$

L: lectura en el butirómetro

3: masa (g) de queso para el cual está graduado el butirómetro.

m: masa (g) de muestra exacta.

Cloruro de sodio

El contenido de cloruro de sodio fue determinado mediante un método espectrofotométrico (AOAC, 1990).

Se pesó alrededor de 1 g de muestra de queso en un crisol de porcelana, y se secó en estufa a 100°C durante 15 h. Luego, se colocó en una mufla, en la cual se incrementó gradualmente la temperatura hasta alcanzar 500°C. La muestra se mantuvo a dicha temperatura hasta que se obtuvieran cenizas blancas, libres de carbono, lo que usualmente ocurría luego de 3 a 5 h. En este primer paso, en general, se obtuvieron cenizas grisáceas que indican la presencia de partículas de carbono, las cuales se humedecieron con gotas de ácido nítrico 1:1, y se llevaron nuevamente a la mufla hasta cenizas blancas. Posteriormente, las cenizas se disolvieron en el mismo crisol con ácido clorhídrico 1 N, y se trasvasaron a un matraz de 50 mL, que se enrasó con agua destilada. Sobre esta solución se determinó, mediante espectrofotometría de absorción atómica, el contenido de sodio, cuyo resultado se obtuvo como mg/L o ppm de sodio. Con el valor obtenido se calculó la concentración de cloruro de sodio en la humedad del queso de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{SEH (\%p/p)} = \frac{X \text{mgNa}}{L} \times \frac{58,5 \text{mg / meqNaCl}}{23 \text{mg / meqNa}} \times \frac{1 \text{g}}{1000 \text{mg}} \times V_{\text{matraz}}(\text{L}) \times \frac{100 \text{g}}{m(\text{g})} \times \frac{100 \text{g}}{H(\%)}$$

SEH: sal en la humedad.

X: mg/L de sodio presente en la solución analizada por espectrofotometría

58,5: masa equivalente de cloruro de sodio (mg/meq).

23: masa equivalente de sodio (mg/meq).

Vmatraz: volumen del matraz de la solución analizada por espectrofotometría (50 mL).

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

H: porcentaje de humedad del queso.

Nitrógeno total

El contenido de nitrógeno total en las muestras de queso se determinó por duplicado mediante el método de Kjeldahl, de acuerdo a la norma de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF, 1993).

Se tomaron aproximadamente 0,3 g de queso (pesada exacta), que se colocaron en un tubo de digestión. Luego, se adicionaron aproximadamente 3,5 g de sulfato de potasio, 100 mg de dióxido de titanio, y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Para la mineralización de la muestra, se utilizó una unidad digestora para seis tubos, con sistema de aspiración de humos (Digestion System 6, 1007 Digester, Tekator, Suecia). Se realizó la digestión de la muestra a la máxima temperatura del equipo (420°C), hasta que el líquido se tornó transparente y límpido. La destilación de las muestras se realizó en un equipo BÜCHI Distillation Unit B-324 (Suiza). Para ello, cada muestra digerida se transvasó a un tubo especial al cual se le adicionaron 3 gotas de fenoftaleína (1% p/v en alcohol etílico 96%:agua 1:1) y se conectó posteriormente al destilador. En primer lugar, se agregaron automáticamente 70 mL de hidróxido de sodio 40% p/v para la alcalinización del medio, y luego se inició la destilación por arrastre con vapor. Los vapores se recogieron en un erlermeyer con 60 mL de ácido bórico 2% p/v, que tenía adicionado 4 gotas de un indicador con un viraje a pH 4,65, compuesto por azul de metileno (0,1% p/v) y rojo de metilo (0,15% p/v) en alcohol etílico 96%. Finalmente, se realizó en forma manual la titulación del borato de amonio formado, con una solución valorada de ácido sulfúrico aproximadamente 0,1 N, utilizando una microbureta de 5,00 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:

$$\text{Nitrógeno total (\% p/p)} = V_{\text{ácido}}(\text{mL}) \times C_{\text{ácido}}(\text{N}) \times \frac{0,014(\text{g}) \text{Nitrógeno}}{(\text{meq})} \times \frac{100(\text{g})}{m(\text{g})}$$

Vácido: volumen (mL) de la solución de ácido sulfúrico gastada en la titulación.

Cácido: normalidad exacta de la solución de ácido sulfúrico.

0,014: masa equivalente de nitrógeno (g/meq).

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

Para la expresión del resultado en g% p/p de proteínas lácteas, el resultado obtenido se multiplicó por el factor 6,38.

5.4.4- Estudio de la proteólisis

El proceso de proteólisis durante la maduración del queso involucra varias etapas y distintos agentes proteolíticos, por lo que una caracterización pormenorizada sólo puede lograrse mediante la aplicación simultánea de varias metodologías. En efecto, dada la complejidad de este conjunto de reacciones, no puede ser descripto por un único parámetro (Walstra y col., 1999b, Sousa y col., 2001). La electroforesis es la técnica que generalmente se aplica para caracterizar la proteólisis primaria, mientras que la proteólisis secundaria se evalúa mejor mediante la determinación del contenido de nitrógeno de distintas fracciones solubles del extracto del queso, la cuantificación de los grupos amino libres, y el análisis cromatográfico en fase reversa, que proporciona una huella digital de los perfiles peptídicos del queso (Fox y McSweeney, 1998a, Upadhyay y col., 2004).

En el presente trabajo, se utilizaron métodos inespecíficos que dan una idea general de la proteólisis, como el fraccionamiento nitrogenado, y técnicas específicas que resuelven e identifican péptidos producidos durante la maduración del queso, como cromatografía y electroforesis (Upadhyay y col., 2004). La proteólisis se estudió en las muestras de queso al iniciar, al promediar y finalizar la maduración (3, 30 y 60 días), excepto en el ensayo de aminoácidos libres en el que no se procesaron las muestras de 30 días.

Fraccionamiento nitrogenado

Esta metodología, que evalúa el contenido de nitrógeno soluble en diversas fracciones obtenidas a partir del extracto acuoso del queso, refleja el grado de avance y la profundidad de la proteólisis. No se trata de un método específico, ya que no brinda

información sobre la naturaleza de los compuestos nitrogenados y sólo proporciona una idea aproximada de su tamaño (Sousa y col., 2001, Upadhyay y col., 2004). En efecto, los cientos de péptidos presentes en la muestra son fraccionados de acuerdo a su masa molecular, su hidrofobicidad y conformación en las distintas fracciones, e incluso hay solapamientos entre ellas, ya que componentes que se encuentran en la primera fracción también están incluidos en fracciones subsiguientes (Ardö, 1999). Sin embargo, la técnica es útil para comparar el grado de avance de la proteólisis entre muestras de queso.

La técnica se basa en la utilización de distintos agentes precipitantes para obtener un fraccionamiento de los compuestos nitrogenados de las muestras a partir de un extracto crudo del queso en agua o solución tamponada, y luego se determina el nitrógeno en cada fracción mediante el método de Kjeldahl.

En primer lugar, se obtuvo una suspensión del queso en citrato de sodio. Para ello, se tomaron 10 g de la muestra y se homogeneizaron en mortero con 20 mL de solución de citrato de sodio 0,5 M. La suspensión homogénea se trasvasó a un vaso de precipitado adicionando agua destilada hasta completar un volumen de aproximadamente 90 mL. Se agregó gota a gota una solución de HCl 20% v/v a la suspensión, bajo agitación mecánica, hasta alcanzar pH 4,6. Una vez que dicho valor se estabilizó, se centrifugó a 900 g durante 10 minutos, obteniéndose dos fracciones, una soluble y otra insoluble.

La fracción insoluble se destinó al estudio electroforético y hasta su posterior análisis se conservó congelada a -18°C.

La fracción soluble se trasvasó a un matraz de 100 mL, se enrasó y se homogeneizó. Se tomaron 10 mL para la determinación del contenido de nitrógeno por el ensayo de Kjeldahl, realizando la digestión y destilación de forma similar a lo explicado para el análisis del nitrógeno total. El contenido de nitrógeno de esta fracción, representa el nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6) (Gripon y col., 1975, Bernal y col., 2001).

Para el cálculo del porcentaje de NS-pH 4,6 en las muestras se utilizó la siguiente expresión:

$$\text{NS-pH 4,6 (\% p/p)} = V_{\text{ácido}}(\text{mL}) \times C_{\text{ácido}}(\text{N}) \times \frac{0,014(\text{g})\text{Nitr.}}{\text{meq}} \times \frac{V_{\text{matraz}}(\text{mL})}{V_{\text{alícuota}}(\text{mL})} \times \frac{100(\text{g})}{m(\text{g})}$$

V_{ácido}: volumen (mL) de la solución de ácido sulfúrico gastada en la titulación.

C_{ácido}: normalidad exacta de la solución de ácido sulfúrico valorada.

0,014: masa equivalente de nitrógeno (g/meq).

V_{matraz}: volumen del matraz = 100 mL.

Valícuota: volumen de suspensión utilizado para la digestión = 10 mL.

m: masa (g) exacta de la muestra utilizada para el análisis.

Luego, se tomaron 15 mL de la fracción anterior, que se colocaron en un vaso de precipitado, al cual se adicionaron lentamente 15 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 24% (bajo agitación). Se dejó en reposo durante 30 minutos y se filtró sobre papel Whatman N° 42. Se tomaron 20 mL para la determinación del contenido de nitrógeno por el método de Kjeldahl. Esta fracción se denominó nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (NS-TCA) (Gripon y col., 1975, Bernal y col., 2001).

Para el cálculo del porcentaje de NS-TCA en las muestras se utilizó la siguiente expresión:

$$V_{\text{ácido}}(\text{mL}) \times C_{\text{ácido}}(\text{N}) \times \frac{0,014(\text{g})\text{Nitr.}}{\text{meq}} \times \frac{V_{\text{totaltrat.}}(\text{mL})}{V_{\text{alícuota}}(\text{mL})} \times \frac{V_{\text{matraz}}(\text{mL})}{V_{\text{trat}}(\text{mL})} \times \frac{100(\text{g})}{m(\text{g})}$$

La expresión es similar a la utilizada para el cálculo de NS-pH 4,6, excepto por tres parámetros:

Vtotaltrat.: volumen total obtenido al mezclar una alícuota de la suspensión del queso y la solución de TCA 24% = 30 mL.

Valícuota: volumen utilizado para la digestión = 20 mL.

Vtrat.: volumen de suspensión del queso utilizado para la precipitación con TCA = 15 mL.

Finalmente, la última fracción que se analizó fue el nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico 2,5% (NS-PTA) (Gripon y col., 1975, Bernal y col., 2001). Para ello, se tomaron 25 mL de la fracción soluble a pH 4,6, que se colocaron en un tubo Falcon, al cual se le adicionaron 12,5 mL de ácido sulfúrico 25% v/v, y se agitó. Luego se adicionaron 12,5 mL de ácido fosfotúngstico (PTA) 10% p/v, y se volvió a agitar, dejando posteriormente en reposo durante 24 h en la heladera (5°C). Al día siguiente, el contenido total del tubo se filtró, y se tomaron 30 mL del filtrado para la determinación del contenido de nitrógeno por Kjeldahl.

Para el cálculo del porcentaje de NS-PTA en las muestras se utilizó la siguiente expresión:

$$V_{\text{ácido}}(\text{mL}) \times C_{\text{ácido}}(\text{N}) \times \frac{0,014(\text{g})\text{Nitr.}}{\text{meq}} \times \frac{V_{\text{totaltrat.}}(\text{mL})}{V_{\text{alícuota}}(\text{mL})} \times \frac{V_{\text{matraz}}(\text{mL})}{V_{\text{trat}}(\text{mL})} \times \frac{100(\text{g})}{m(\text{g})}$$

La expresión es similar a la utilizada para la determinación de NS-TCA, excepto por tres parámetros:

Vtotaltrat.: volumen total obtenido al mezclar una alícuota de la suspensión del queso y la solución de ácido sulfúrico y ácido fosfotúngstico = 50 mL.

Valícuota: volumen utilizado para la digestión = 30 mL.

Vtrat.: volumen de suspensión del queso utilizado para la precipitación con PTA = 25 mL.

El contenido de NS-pH 4,6 incluye proteínas (excluyendo las caseínas), todos los péptidos de hasta 30-35 residuos de aminoácidos, aminoácidos libres y compuestos nitrogenados menores, tales como aminas, úrea y amoníaco. La fracción de NS-TCA está constituida por péptidos medios y pequeños conteniendo entre 2 a 22 residuos de aminoácidos, aminoácidos libres y compuestos nitrogenados menores, como aminas, úrea y amoníaco. Por último, la fracción de NS-PTA contiene compuestos con un peso molecular hasta 600 daltons, que incluyen péptidos muy pequeños, aminoácidos y compuestos nitrogenados menores, excepto aminoácidos dibásicos (lisina, arginina y ornitina) y amoníaco (Ardö, 1999).

Electroforesis

El residuo insoluble a pH 4,6 se analizó por electroforesis. Esta fracción está compuesta principalmente por las caseínas nativas sin degradar y los grandes péptidos producidos por la actividad proteolítica del coagulante y la plasmina (Ardö, 1999, Zalazar y col., 2004).

La electroforesis fue realizada en geles de poliacrilamida con agregado de urea (Urea-PAGE por sus siglas en inglés), ya que esta adición disocia las distintas caseínas de la micela, permitiendo la separación de las mismas según su carga y masa (Upadhyay y col., 2004).

El ensayo se realizó en una cuba vertical Mini-Protean II (BioRad Laboratories, California, Estados Unidos), con una fuente de poder modelo 1000/500 (BioRad Laboratories, California, Estados Unidos), utilizando un sistema de gel discontinuo (Andrews, 1983). La concentración del gel de apilamiento (o concentrador) fue la misma descrita por Andrews (1983) (4%), mientras que la concentración del gel separador fue de 7,5%, menor que la propuesta por dicho autor para el análisis de leche (12%), debido a que en la muestra analizada la concentración de proteínas de suero es despreciable (Ng-Kwi-Hang y Kroeker, 1984). Los geles de apilamiento y de separación fueron preparados

mezclando una solución madre de acrilamida-bisacrilamida 30,8% con buffer Tris-HCl 0,5 M de pH 6,8, y con buffer Tris-HCl pH 8,8 y urea (concentración en el gel 7,5 M), respectivamente. Se utilizó una solución de persulfato de amonio al 10% p/v, preparada inmediatamente antes de su uso, y N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) como iniciador y catalizador, respectivamente, de la reacción de polimerización del gel de acrilamida-bisacrilamida.

Se sembraron 15 µL de muestras preparadas disolviendo 9-10 mg del residuo insoluble a pH 4,6 en 1 mL de buffer de muestra, compuesto por buffer Tris 0,5 M pH 6,8, urea (concentración final en el buffer: 7,5 M) y una punta de espátula de azul de bromofenol.

Las corridas electroforéticas se realizaron en medio alcalino, utilizando como buffer de corrida Tris-glicina pH 8,3, con voltaje constante de 150 Volt, intensidad máxima de 45 mAmpere y potencia de 6,75 Watt. La finalización de la corrida se determinó por la llegada del frente de avance al final de la placa, lo que fue evidenciado por el colorante azul de bromofenol agregado a la muestra.

Para el revelado de las proteínas, los geles fueron sumergidos durante 1 hora en una solución del colorante Coomassie Blue G-250 al 0,2% p/v en ácido acético, etanol y agua (1,6:4:4). Luego se procedió a eluir el exceso de colorante mediante repetidos lavados con solución decolorante, compuesta por ácido acético, etanol y agua (1:2,5:6,5), hasta obtener una clara resolución.

Perfiles peptídicos (HPLC)

Mediante esta metodología se resuelven péptidos o grupos de péptidos, y se obtiene un perfil proteolítico característico de cada muestra. El perfil peptídico representa una “fotografía instantánea” del proceso de proteólisis a un tiempo determinado, que refleja el complejo equilibrio entre la producción de los péptidos y su posterior degradación para dar aminoácidos libres y sus productos metabólicos (Pripp y col., 2000).

La metodología para el análisis de los perfiles peptídicos utilizada en el presente trabajo fue cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, donde la fase estacionaria es no polar y la fase móvil polar. Los péptidos presentan, en general, alta polaridad, por lo que interactúan muy poco con dicha fase estacionaria. Por ello, la fase móvil es suplementada con ácido trifluoroacético, que disminuye la polaridad de los péptidos mejorando la separación cromatográfica. En efecto, al disminuir el pH de la fase móvil a valores menores de 3, los grupos carboxilos de los aminoácidos son llevados a la

forma no disociada. Asimismo, actúa como par iónico bloqueando los grupos básicos de los aminoácidos que al pH ácido de la fase móvil se encuentran cargados (Singh y col., 1999).

El equipamiento utilizado consistió en una bomba cuaternaria, un desgasificador en línea y un detector UV-Visible, todo perteneciente a la serie 200 de Perkin Elmer. Se utilizó una interfase analógica conectada a una computadora para adquirir y procesar los datos cromatográficos con la aplicación Turbochrom® (Perkin Elmer, Norwalk, Estados Unidos). Se utilizó una columna cromatográfica C18, tipo Aquapore OD-300, de 220 x 4,6 mm. Las corridas cromatográficas se llevaron a cabo a una temperatura de 40°C, y longitud de onda de detección de 214 nm. El flujo de fase móvil fue 1 mL/min, y se utilizó un gradiente de elución que se muestra en la tabla 5, siendo lineales todos los cambios. Los solventes utilizados se detallan a continuación (Hynes y col., 2003b):

Solvente A Péptidos.: Agua:Ácido trifluoroacético 1000:1,1.

Solvente B Péptidos.: Acetonitrilo:Agua:Ácido trifluoroacético 600:400:1.

Tabla 5. Gradiente de elución para la separación de los péptidos solubles en agua.

Tiempo total	%A Péptidos	%B Péptidos
1	100	0
10	100	0
90	20	80
91	0	100
95	0	100
96	100	0
106	100	0

El análisis de los perfiles peptídicos se realizó sobre un extracto de queso soluble en agua. Para ello, se pesó 5,00 g de muestra de queso, que se colocó posteriormente en un mortero. Se agregó aproximadamente 15 mL de agua destilada, en forma gradual, disgregando la muestra hasta homogeneización total. Se trasvasó el contenido del mortero a un tubo de centrifuga Falcon de 50 mL de capacidad, enjuagando con 5 mL de agua destilada, e incorporando dicho líquido al tubo. Durante esta operación, se trató de no incorporar la materia grasa al tubo, ya que su presencia dificulta el procedimiento posterior de filtrado. El tubo se colocó en un baño maría a 40°C, y se mantuvo durante 1h, luego de lo cual se centrifugó a 3000 g durante 30 minutos. Luego, se descartó cualquier resto de grasa que hubiere quedado en el tubo con la ayuda de una varilla de vidrio y la fracción

acuosa se trasvasó a un matraz de 25 mL, previo filtrado a través de papel de filtrado rápido. El matraz se enrasó con agua destilada, se homogeneizó, y se colocó en colectores adecuados. Una alícuota de este extracto fue filtrada a través de membranas de 0,45 µm de tamaño de poro (Millex, Millipore, São Paulo, Brazil), y un volumen de 60 µL fue inyectado en el HPLC (Hynes y col., 2003b).

Aminoácidos libres

Los aminoácidos constituyen los productos finales del proceso de proteólisis, pero, a su vez, pueden sufrir transformaciones posteriores que dan origen a una gran variedad de compuestos de sabor y aroma. De esta manera, el contenido de aminoácidos libres en el queso es el resultado del balance entre su producción y su degradación por diversos sistemas enzimáticos (Sousa y col., 2001).

El perfil de aminoácidos libres fue determinado mediante cromatografía líquida de alta performance, utilizando un método de derivatización con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (ACQ). Este compuesto es altamente reactivo y forma rápidamente derivados estables con aminoácidos primarios y secundarios, que son fácilmente separados por cromatografía líquida en fase reversa, y presentan una fuerte fluorescencia a 395 nm. El exceso de reactivo se hidroliza inmediatamente para dar 6-aminoquinolina (AMQ), y otros subproductos, que no interfieren en la determinación cromatográfica. Si bien la metodología de derivatización ha sido optimizada para la utilización de un detector de fluorescencia, también es posible la detección UV, si se tienen en cuenta las limitaciones que presenta. Cabe considerar que la AMQ, eluye en primer lugar y exhibe, a diferencia de la detección por fluorescencia, una gran absorción en UV, pudiendo interferir en la cuantificación del aspártico, que es el primer aminoácido eluido. Asimismo, la sensibilidad de la detección UV es menor a la de fluorescencia, pero igualmente su valor es alto: 0,5 – 1,0 pmol. Por último, durante la detección UV puede existir una deriva en la línea de base, debido a la presencia de un conservante en la fase móvil, lo cual puede disminuirse eliminando dicho compuesto del solvente (Waters AccQ·Tag, 1993).

El equipamiento utilizado fue el mismo que para el análisis de los perfiles peptídicos. Para la separación y cuantificación de los aminoácidos, se utilizó la metodología AccQ·Tag® (Waters Corp.), que consta de insumos (columna, tubos), y reactivos para la derivatización de los aminoácidos, así como los solventes utilizados como fase móvil. Se utilizó una columna Nova-Pak™ C18 de 3,9 mm x 150 mm con un tamaño

de partícula de 4 μm , especialmente certificada para el uso con el método AccQ·Tag, y un guardacolumna C18 de 15 x 3,2 mm, 7 μm (Perkin Elmer).

La temperatura utilizada durante las corridas cromatográficas fue 37°C, la longitud de onda de detección 248 nm (UV), y el flujo 1 mL/min. Los solventes utilizados fueron los siguientes:

Solvente A_{AAL}: solvente A concentrado AccQ·Tag®: Agua bidestilada 2:20. El valor de pH del solvente diluido debe ser $5,02 \pm 0,05$. El solvente concentrado comercial se compone de: acetato de sodio trihidrato 19%, ácido fosfórico 6-7%, trietilamina 1-2%, agua 72-73%.

Solvente B_{AAL}: Acetonitrilo: Agua bidestilada 60:40.

El gradiente de elución utilizado (Tabla 6) fue modificado levemente, a partir del propuesto en el manual del método AccQ·Tag®, según Cohen y Michaud (1994) para optimizar la separación por el uso de guardacolumna y detección UV. Todos los cambios de solvente fueron lineales.

Tabla 6. Gradiente de elución para la separación de los aminoácidos derivatizados.

Tiempo total	%A _{AAL}	%B _{AAL}
0	100	0
0,5	98	2
15	93	7
19	87	13
32	66	32
33	66	32
34	0	100
37	0	100
38	100	0
50	100	0

La muestra utilizada para la evaluación de los aminoácidos libres consistió de un extracto soluble en agua del queso (Giraud y col., 2002), por lo que se utilizó el mismo extracto que el preparado para el estudio de los perfiles peptídicos, y que fue conservado a -18°C hasta su análisis.

Previo a la determinación de aminoácidos en las muestras, se agregó el estándar interno a la misma y se realizó una dilución, de acuerdo a su concentración aproximada de aminoácidos. Para ello, a un volumen entre 300 a 980 μL del extracto soluble de queso se le adicionaron 20 μL de una solución 2,5 mM de ácido α -aminobutírico (Aaba), utilizado

como estándar interno, preparado en HCl 0,1 M, y se agregó agua, en los casos necesarios, hasta completar un volumen final de 1000 μL . De esta manera, la concentración del estándar interno en la solución de la muestra diluida fue de 50 μM . Luego, se homogeneizó y se filtró a través de membranas de 0,45 μm de tamaño de poro (Millex, Millipore, São Paulo, Brazil).

La reacción de derivatización fue realizada de acuerdo al protocolo experimental del método. En un tubo de reacción se incorporaron 20 μL de la solución de la muestra convenientemente diluida, 60 μL de buffer borato provisto por el kit, y 20 μL de reactivo de derivatización (ACQ), previamente reconstituido en acetonitrilo, según las indicaciones del proveedor. El tubo de reacción se tapó con parafilm, se agitó, y luego de 1 minuto a temperatura ambiente, se colocó en un baño a 55°C, durante 10 minutos. Finalmente, 20 μL de esta solución fueron inyectados en el cromatógrafo.

Para la cuantificación de los aminoácidos en las muestras de quesos, se realizaron las curvas de calibrado de cada aminoácido. Para ello, se prepararon soluciones de estándares en un rango de concentración entre 6,25 y 200 μM , a partir de una solución concentrada provista en el kit comercial. Dicha solución contenía los siguientes aminoácidos: ácido aspártico (Asp), serina (Ser), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), histidina (His), arginina (Arg), treonina (Thr), alanina (Ala), prolina (Pro), cisteína (Cys), tirosina (Tir), valina (Val), metionina (Met), lisina (Lis), isoleucina (Ile), leucina (Leu) y fenilalanina (Phe), todos en concentración de 2,5 mM, excepto cistina: 1,25 mM (2,5 mM de cisteína). A todas las soluciones de estándares se agregó un volumen de la solución de estándar interno para alcanzar una concentración final de 50 μM . Cada solución de estándar se derivatizó por triplicado, utilizando la misma metodología que la explicada para la muestra, y 20 μL se inyectaron en el cromatógrafo. Se realizaron las curvas de calibrado para cada aminoácido (relación de concentración de cada aminoácido con el estándar interno vs. relación de área de cada aminoácido con el estándar interno), las cuales se utilizaron para el cálculo de la concentración de los mismos en las muestras de acuerdo a la siguiente fórmula, expresándose el resultado en mg de cada aminoácido por 100 g de queso:

$$A \times B \left(\frac{\mu\text{mol}}{L} \right) \times \frac{1(L)}{1000(\text{mL})} \times \frac{C(\mu\text{L})}{D(\mu\text{L})} \times PM_{AA} \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{mol}} \right) \times \frac{1(\text{mg})}{1000(\mu\text{g})} \times E(\text{mL}) \times \frac{100(\text{g})}{F(\text{g})} = AA(\text{mg}) / 100(\text{g})_{\text{queso}}$$

$$\frac{A \times PM_{AA} \times 25}{D} = AA(\text{mg}) / 100(\text{g})_{\text{queso}}$$

A: relación de concentración de cada aminoácido con respecto a la concentración del estándar interno en la solución de la muestra diluida, obtenida al entrar en la curva de calibrado con la relación de áreas.

B: concentración del estándar interno en la solución diluida de la muestra = 50 $\mu\text{mol/L}$.

C: volumen final de la solución de la muestra diluida = 1000 μL .

D: volumen de extracto de queso utilizado para preparar la solución de la muestra diluida.

E: volumen final del extracto de queso = 25 mL.

F: masa de queso utilizada para la preparación del extracto de queso = 5 g.

6. Análisis estadístico

Los resultados de composición, recuentos microbiológicos, fraccionamiento nitrogenado y contenido de cada AAL se analizaron por análisis de la variancia (ANOVA) de una vía. Cuando hubo diferencia significativa se aplicó el test de comparación de medias LSD (least significant difference) (Pérez López, 2001).

Para la cuantificación de los aminoácidos, se realizaron las curvas de calibrado para cada AA, mediante regresión lineal por el método de cuadrados mínimos (Massart y col., 1988b).

Para el análisis de los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC, que contienen datos numerosos y complejos, además del tradicional examen visual de los mismos, es conveniente aplicar otros métodos para la reducción de la dimensionalidad y comparación simultánea de los cromatogramas (Pripp y col., 2000). El análisis quimiométrico de perfiles peptídicos ha demostrado ser una metodología de gran potencial para mejorar la comprensión del proceso de proteólisis y de los factores que contribuyen al mismo, entre ellos, los fermentos adjuntos incorporados (Sousa y col., 2001). De esta manera, los perfiles peptídicos se estudiaron mediante un método estadístico multivariante de análisis por componentes principales (ACP), cuyos objetivos son la reducción de la dimensionalidad e interpretación de los datos. Esto se logra mediante la transformación del grupo de variables originales observadas para las muestras, en un nuevo grupo de variables denominadas componentes principales, las cuales son ortogonales entre sí. Cada

componente principal (CP_1) es una combinación lineal de las variables originales, y puede expresarse mediante la siguiente ecuación:

$$CP_1 = a_{i1} x_1 + a_{i2} x_2 + \dots + a_{ip} x_p$$

Los coeficientes a_{ij} de cada variable en la ecuación, llamados *loading* o carga factorial, 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. En el ACP se obtienen tantas nuevas variables o componentes principales como el número de variables originales. Sin embargo, los primeros componentes principales extraen la máxima variancia y son suficientes para la interpretación de los datos, logrando una reducción de la multidimensionalidad sin pérdida significativa de información (Massart y col., 1988a, Hair y col., 1999, Pripp y col., 2000). El ACP puede establecer la presencia de correlaciones o la falta de ella entre las muestras o entre las variables y las muestras (Coker y col., 2005).

El ACP es ampliamente aplicado al estudio de los perfiles peptídicos en quesos, con distintas finalidades. Sin embargo, no existe consenso en cuanto a la selección de variables para dicho análisis, la cual es una tarea muy importante para obtener resultados útiles (Hair y col., 1999, Coker y col., 2005). En nuestro trabajo, las variables fueron seleccionadas por comparación visual entre los distintos perfiles cromatográficos, eligiendo aquellos picos que presentaban mayor variación entre los distintos quesos y tiempos de maduración (Pripp y col., 2000). Asimismo, se verificó la presencia de altas correlaciones entre las variables seleccionadas, ya que en caso contrario, no debería aplicarse ACP (Hair y col., 1999). Cada perfil cromatográfico representó una muestra y el área de cada pico seleccionado una variable.

En el análisis de los perfiles peptídicos de los quesos obtenidos, es importante que la variabilidad de aquellos péptidos que más cambian durante la maduración conserve su impacto en el análisis multivariante, de lo contrario se corre el riesgo de obtener una pobre descripción de la proteólisis. De esta manera, se seleccionó la matriz de covariancia para la aplicación del ACP, que estandariza las variables a una media cero, pero conserva su desviación estándar original (Coker y col., 2005). El uso de la matriz de correlación, que estandariza las variables a una media cero y desviación estándar uno, es indicada sobre todo para cuando las variables tienen distintas escalas de medición (Borgognone y col., 2001).

Los perfiles de aminoácidos libres de todas las muestras de quesos elaborados, a los 60 días de maduración, también fueron analizados mediante un ACP.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos).