

RESUMEN



Los alimentos funcionales son productos alimenticios que ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del consumidor, más allá de su básico aporte nutricional. Dentro de este grupo de alimentos se incluyen aquellos con bacterias probióticas incorporadas, los cuales han demostrado una gran expansión en su producción y popularidad en los últimos tiempos. Para que se cumpla el efecto benéfico postulado para las bacterias probióticas, las mismas deben encontrarse viables y en altas concentraciones en el alimento al tiempo de su consumo. El nivel de bacterias probióticas sugerido en un alimento probiótico es de 10^7 UFC g^{-1} o mL^{-1} .

Los alimentos lácteos constituyen uno de los principales productos utilizados como vehículo de bacterias probióticas, siendo los productos fluidos los más difundidos en el mercado. Sin embargo, en comparación con dichos alimentos, diversos estudios han demostrado que el queso representa un medio ambiente menos adverso para lograr una mayor supervivencia probiótica no solamente en el producto, sino también durante el tránsito gastrointestinal. Un mayor contenido de materia grasa, el pH más elevado y una matriz proteica sólida son algunas de las características que se han postulado como beneficiosas para el mantenimiento de la viabilidad probiótica en los quesos. Así, diferentes variedades de queso, como Cheddar, Gouda, Canestrato Pugliese, fresco, etc., han sido empleadas en forma satisfactoria para vehiculizar altas concentraciones de diversas bacterias probióticas. La mayoría de estos trabajos se han focalizado principalmente en la obtención de una elevada población probiótica durante todo el período de vida útil del alimento, lo cual constituye una cuestión primordial. Sin embargo, la influencia de estas bacterias sobre la calidad final del producto es aún poco conocida. El estudio de este último aspecto también resulta fundamental, ya que puede influir en la aceptabilidad del alimento probiótico por parte del consumidor.

Durante la maduración del queso, la cuajada se transforma en queso maduro a causa de una serie de reacciones que provocan cambios en los hidratos de carbono, lípidos y proteínas. La proteólisis, que involucra la degradación de las caseínas a péptidos de diverso tamaño y aminoácidos libres, tiene gran importancia en el desarrollo de la textura del queso, y, además, contribuye directa e indirectamente en la determinación de sus características organolépticas. Diversos agentes proteolíticos participan en este proceso, principalmente el coagulante, la plasmina y las enzimas microbianas. Los lactobacilos y bifidobacterias, que son las bacterias más comúnmente utilizadas como probióticos, han demostrado poseer diversas proteasas y peptidasas, por lo que tienen la capacidad potencial de influir en este proceso.

En el presente trabajo, se evaluó la performance del queso Pategrás para ser utilizado como un nuevo alimento probiótico, estudiando tanto la viabilidad de diferentes cepas probióticas, como su contribución en el proceso de proteólisis del queso durante la maduración.

Para ello, se realizaron ocho ensayos de elaboración de queso Pategrás, utilizando en cada una de ellos un fermento probiótico adjunto diferente: siete cepas en forma individual (*Lactobacillus acidophilus* A, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* B, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus* C, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*) y un fermento mixto compuesto por tres de las cepas anteriormente estudiadas (*L. acidophilus* C, *L. paracasei* y *B. lactis*). Se elaboraron tres tipos de queso por día de elaboración: un testigo (sin probióticos) y dos experimentales: experimental 1 (con adición de probióticos en forma directa como liofilizado) y experimental 2 (con adición de probióticos luego de una preincubación en un sustrato lácteo graso). Para cada ensayo, las elaboraciones se llevaron a cabo por triplicado, en días diferentes. Los quesos fueron madurados a 12°C y 80% de humedad relativa durante 60 días. Se estudió la composición de los quesos: extracto seco, materia grasa, proteínas totales, pH y cloruro de sodio. Además, se determinó la viabilidad del fermento primario y probiótico durante la maduración. Por último, se realizó un minucioso estudio de la proteólisis durante la maduración a través de la determinación del contenido de nitrógeno en fracciones del extracto acuoso del queso soluble en distintos medios, electroforesis de las caseínas, perfiles peptídicos por HPLC y aminoácidos libres.

En general, los quesos probióticos mantuvieron una composición similar a la del queso tradicional, encontrándose únicamente un menor valor de pH en los quesos experimentales de tres ensayos, debido a la actividad acidificante del fermento adjunto. Sin embargo, solamente en un caso las diferencias se presentaron al momento del consumo del producto.

Todas las cepas ensayadas permanecieron, durante el período de maduración estudiado, en concentraciones mayores al nivel sugerido para un alimento probiótico. Las cepas del grupo de *L. casei* (*L. paracasei*, *L. casei* y *L. rhamnosus*) fueron las que demostraron la mayor resistencia en el medio ambiente del queso, seguidas de las cepas de *L. acidophilus*, y finalmente de la cepa de *B. lactis*. El agregado del fermento probiótico directamente en forma liofilizada fue más eficiente que la adición luego de una preincubación, debido a que se obtuvieron similares concentraciones, y la

metodología directa fue más rápida y sencilla. Además, la preincubación involucra un mayor manipuleo, con un consiguiente incremento de la posibilidad de infecciones fágicas. Por último, en algunos ensayos, se produjo una mayor acidificación en los quesos con probióticos agregados luego de la preincubación.

Ninguno de los fermentos probióticos ensayados demostró una contribución significativa a la proteólisis primaria, lo que fue evidenciado por los similares resultados obtenidos en la fracción de NS-pH 4,6 y en los perfiles electroforéticos. De esta manera, todos los fermentos evaluados manifestaron una actividad proteolítica sobre las caseínas intactas muy baja o nula en la matriz alimentaria estudiada. Por el contrario, todas las cepas de lactobacilos ensayadas manifestaron un impacto significativo en la proteólisis secundaria, que fue dependiente de la especie y cepa y, en algunos casos, también de la metodología de adición del fermento probiótico. La contribución de las cepas de *L. acidophilus* fue notablemente más marcada que la de las cepas del grupo de *L. casei*, demostrando un incremento en la cantidad de péptidos pequeños, aminoácidos libres y totales, y modificaciones de los perfiles peptídicos desde el inicio de la maduración. La metodología de adición mostró un impacto importante en la expresión bioquímica de *L. acidophilus* C, tanto cuando fue utilizada en forma individual o en el fermento probiótico mixto. En dichos ensayos, el fermento mostró mayor influencia en los diferentes índices de proteólisis secundaria cuando fue agregado luego de una preincubación, sugiriendo una influencia del medio de crecimiento o del estado fisiológico celular sobre la actividad de las endo y exopeptidasas de dicha cepa.

Entre las cepas del grupo de *L. casei*, *L. casei* demostró una mayor contribución al proceso proteolítico del queso que las cepas de *L. paracasei* y *L. rhamnosus*. Estas últimas cepas únicamente afectaron el nivel de unos pocos aminoácidos libres y los perfiles peptídicos solamente al final de la maduración. Por el contrario, *L. casei* incrementó el nivel de un mayor número de aminoácidos libres y originó modificaciones en los perfiles peptídicos desde los 30 días y hasta el final de la maduración.

La cepa de *Bifidobacterium lactis* estudiada no mostró ninguna influencia en la proteólisis secundaria.

Los resultados obtenidos sugieren que las cepas ensayadas de *L. acidophilus* poseen un amplio rango de peptidasas, las cuales demostraron una gran actividad en el medio ambiente del queso Pategrás. Asimismo, *L. casei* también demostró un equipo peptidolítico importante que influyó en la proteólisis de los quesos. Finalmente, los

resultados obtenidos con *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, y sobre todo con *B. lactis* indican que estas cepas poseen una escasa o nula cantidad de peptidasas capaces de actuar durante la maduración del queso estudiado.

El queso Pategrás demostró ser un producto adecuado para su desarrollo como alimento probiótico ya que fue efectivo en mantener altas poblaciones probióticas en el mismo. Cada fermento probiótico ensayado demostró una influencia particular en la proteólisis, probablemente como consecuencia de sus diferentes equipos enzimáticos y su actividad en la matriz alimentaria.

De esta manera, esta tesis ha contribuido al desarrollo de una nueva variedad de queso probiótico, que se ha caracterizado exhaustivamente, desde el punto de vista del mantenimiento de la viabilidad probiótica y del impacto de este tipo de cultivos en la proteólisis.

ABSTRACT



Functional foods favorably impact on consumer's health beyond their basic nutritional role. Within this category, food products with added probiotic bacteria have recently shown a large increase both in volume of production and popularity among consumers. Probiotic bacteria must remain viable at high levels in the food up to consumption to attempt the claimed health benefit: the suggested level of probiotic bacteria in a probiotic food is 10^7 UFC g^{-1} or mL^{-1} .

So far, mainly dairy foods have been chosen as carriers for probiotic bacteria; among them, fluid products are the most widespread. However, several recent studies have shown that cheese can be a less hostile environment for probiotic bacteria, leading to a higher survival of these microorganisms, not only in the product, but also during the gastrointestinal transit. Higher fat content, increased pH, and a solid protein matrix are some of the characteristics which have been pointed out as favorable for probiotic survival in cheese environment. Thus, it has been shown that several cheese varieties, e.g. Cheddar, Gouda, Canestrato Pugliese, fresco, etc., are able to carry high numbers of different strains of probiotic bacteria for variable periods. Most studies have focused on the maintaining of a high probiotic population during the whole shelf life of the food, which undoubtedly is a main question. Nevertheless, the impact of probiotics on cheese quality has been less explored and remains fairly unknown. The investigation of this aspect is also very important as it can influence on consumer's acceptability of the probiotic food.

The biochemical reactions responsible for the change of curd into cheese are produced during ripening, and include the transformation of carbohydrates, lipids and proteins. Proteolysis consists of the breakdown of caseins into peptides of different molecular mass and free amino acids, and plays an important role in texture and sensory properties of cheese. Different proteolytic agents are involved in this process, mainly coagulant, plasmin and microbial enzymes. Lactobacilli and bifidobacteria, which are the most widely used probiotic bacteria, have been shown to possess several proteolytic and peptidolytic enzymes, and therefore have the potential to influence on proteolysis.

In the present work, the performance of Pategrás Argentino cheese as a new probiotic food was assessed by studying the viability of different strains of probiotic bacteria added into the cheese, and their impact on proteolysis during ripening.

For that purpose, eight cheesemaking trials were carried out. In each trial one probiotic adjunct culture was assayed: seven individual strains (*Lactobacillus acidophilus* A, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* B, *Bifidobacterium*

lactis, *Lactobacillus acidophilus* C, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus*) and a mixed culture of three strains, selected on the basis of the results of the individual trials (*L. acidophilus* C, *L. paracasei* and *B. lactis*). Three cheeses were obtained by cheesemaking day: a control cheese (without probiotics) and two experimental cheeses: experimental 1 (in which probiotics were added directly as a lyophilized culture) and experimental 2 (in which probiotics were added after a preincubation step in a milk-milk fat substrate). Each trial consisted of three different cheesemaking days, i.e. three replicate cheeses of each type were obtained. Cheeses were ripened at 12°C and 80% relative humidity for 60 days. Cheese composition was assessed: dry matter, fat matter and protein content, as well as pH and NaCl. The viability of primary starter and probiotic culture was monitored during ripening, and proteolysis was extensively studied by means of nitrogen fractions, electrophoresis, peptide profiles and quantification of free amino acids.

Overall, the composition of probiotic cheeses was similar to that of control cheeses, with the sole exception of pH for the experimental cheeses of three trials, which was lower than in control cheeses, due to the acidifying activity of the probiotic adjunct culture. However, only in one case the differences in pH value were found at the end of the ripening.

All the tested strains remained at higher level than the minimum required for a probiotic food, during the complete ripening period. The strains of *L. casei* group (*L. paracasei*, *L. casei* y *L. rhamnosus*) were the most resistant to cheese environment, followed by *L. acidophilus* strains, and finally by *B. lactis*. The direct inclusion of the probiotics as a liophilized culture was more efficient than their addition after a preincubation step, as the probiotic number reached in the cheeses was similar, and direct addition was easier and more rapid. Besides, preincubation involves a higher manipulation of the probiotic culture, increasing the risk of phage infections. Finally, when probiotics were added after a preincubation, a higher acidification of the cheeses was verified in some trials.

None of the probiotic cultures assayed showed a significant contribution to primary proteolysis, as described by SN-pH 4.6 and electrophoretic patterns. Thus, there was no evidence of any proteolytic activity of the tested strains on intact caseins in the studied food matrix. On the contrary, all the lactobacilli strains evidenced a significant impact on secondary proteolysis, which was species and strain-dependent, and in some cases, also relied on the methodology of addition of the probiotic culture. The

contribution of the strains of *L. acidophilus* was notably higher than that evidenced by the strains of the *L. casei* group, and consisted of an increase of small peptides and free amino acids in cheeses, as well as changes in the peptide profiles from the beginning of the ripening. The method of probiotic culture addition was significant for the biochemical expression of *L. acidophilus* C, both when it was studied individually and when it was part of the mixed probiotic culture. In both cases, this probiotic culture showed a higher influence on secondary proteolysis when it was included into cheesemilk after a preincubation step, which suggested an effect of the physiological state of the cells or the composition of the growing medium on the peptidolytic activity of *L. acidophilus* C.

Among the strains of the *L. casei* group assayed in this work, *L. casei* showed the highest contribution to cheese proteolysis. *L. paracasei* and *L. rhamnosus* only caused changes in free amino acids and peptide profiles at the end of the ripening.

Bifidobacterium lactis did not evidence any contribution to cheese secondary proteolysis.

Results suggest that *L. acidophilus* strains possess a wide rank of peptidases, which demonstrated a high activity in the environment of the studied cheese model. *L. casei* also showed a significant peptidolytic activity which was verified in the secondary proteolysis of the cheeses made with this strain. Finally, the results obtained for *L. paracasei*, *L. rhamnosus* and especially *B. lactis* point out that these strains have none or undetectable level of peptidolytic activity in the studied food.

Probiotic bacteria were properly delivered in Pategrás cheese, as they maintained high viability levels and showed distinctive effects on the proteolysis process, probably as a consequence of their different enzymatic potential and activity in the food matrix.

Thus, this thesis has contributed to the development of a new type of probiotic cheese, which was comprehensively characterized, focusing both on probiotic bacteria viability and their impact on proteolysis.