

**INDICE**



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

### INTRODUCCIÓN

1- Alimentos funcionales .....	1
2- Probióticos .....	3
2.1- Evolución de la definición .....	3
2.2- El tracto gastrointestinal y la microbiota autóctona .....	5
2.3- Bacterias utilizadas como probióticos .....	8
2.3.1- Lactobacilos .....	8
2.3.2- Bifidobacterias .....	10
2.4- Criterios de selección de bacterias probióticas .....	11
2.4.1- Criterios generales .....	12
Criterios de bioseguridad .....	12
Criterios tecnológicos .....	12
Criterios biológicos .....	13
2.4.2- Criterios específicos o funcionales .....	14
Promoción de la resistencia a la colonización y modulación de la microflora intestinal .....	14
Modulación de la respuesta inmune .....	15
Disminución del nivel de colesterol .....	16
Disminución de la intolerancia a la lactosa .....	16
Actividad anticarcinogénica .....	17
Otros efectos .....	18
2.5- Eficacia de los probióticos .....	18
3- Desarrollo de alimentos probióticos .....	19
3.1- Productos probióticos .....	19
3.2- Productos lácteos como vehículo de bacterias probióticas .....	21
3.3- Factores que afectan la viabilidad de bacterias probióticas en el producto ..	23
3.3.1- Inoculación .....	24
3.3.2- Composición del producto .....	25
Nutrientes .....	25
Acidez .....	26
Aditivos alimentarios .....	26
Oxígeno .....	27
3.3.3- Temperatura de elaboración y almacenamiento .....	27
3.3.4- Interacciones microbianas .....	28
3.4- Metodologías para mejorar la viabilidad .....	29
3.4.1- Selección de cepas ácido-resistentes .....	29
3.4.2- Envases con escasa permeabilidad al oxígeno .....	29
3.4.3- Fermentación en dos pasos .....	30
3.4.4- Microencapsulación .....	30
3.4.5- Adaptación al stress .....	30
3.4.6- Adición de sustancias promotoras del crecimiento .....	31
3.5- Recuento de bacterias probióticas en los productos .....	32
4- Quesos probióticos .....	33
4.1- Ventajas del queso como vehículo de bacterias probióticas .....	33
4.2- Producción y maduración de quesos .....	35
4.2.1- Metabolismo de la lactosa, del lactato y del citrato .....	37

4.2.2- Lipólisis .....	38
4.2.3- Proteólisis .....	38
Coagulante .....	40
Plasmina .....	41
Enzimas microbianas .....	42
Actividad proteolítica de especies bacterianas utilizadas como	45
probióticos .....	
Rol de enzimas microbianas en la proteólisis del queso .....	47
4.3- Antecedentes de desarrollo de quesos probióticos .....	48
4.3.1- Viabilidad de probióticos en el queso .....	49
4.3.2- Influencia de probióticos en la proteólisis durante la maduración ....	55
5- Fundamentos de la elección del tema de estudio .....	57

## OBJETIVOS

2.1- Objetivos generales .....	60
2.2- Objetivos particulares .....	60

## MATERIALES Y MÉTODOS

1- Fermentos .....	61
2- Diseño experimental .....	63
3- Metodología de adición del fermento probiótico .....	64
4- Elaboraciones de quesos .....	67
5- Determinaciones analíticas .....	69
5.1- Recuentos microbiológicos de los fermentos utilizados .....	69
5.2- Sustrato lácteo graso .....	70
5.2.1- Análisis microbiológico .....	70
5.2.2- pH .....	71
5.3- Leche y Crema de leche .....	71
5.3.1- Materia grasa .....	71
5.3.2- pH .....	72
5.4- Quesos .....	72
5.4.1- Muestreo y conservación de las muestras .....	72
5.4.2- Análisis microbiológicos .....	73
5.4.3- Composición de los quesos .....	74
pH .....	74
Extracto seco .....	74
Materia grasa .....	75
Cloruro de sodio .....	75
Nitrógeno total .....	76
5.4.4- Estudio de la proteólisis .....	77
Fraccionamiento nitrogenado .....	77
Electroforesis .....	80
Perfiles peptídicos (HPLC) .....	81
Aminoácidos libres .....	83
6- Análisis estadístico .....	86

**RESULTADOS**

1- Recuentos microbiológicos de los fermentos utilizados .....	89
2- Preparación del sustrato lácteo graso .....	91
2.1- SLG con <i>L. acidophilus</i> A, <i>L. paracasei</i> , <i>B. lactis</i> , <i>L. casei</i> y <i>L. rhamnosus</i> .....	91
2.2- SLG con <i>L. acidophilus</i> B .....	92
2.3- SLG con <i>L. acidophilus</i> C .....	93
2.4- SLG con un fermento probiótico mixto .....	94
3- Composición de los quesos .....	96
4- Análisis microbiológicos .....	101
5- Estudio de la proteólisis .....	108
5.1- Fraccionamiento nitrogenado .....	108
5.2- Electroforesis .....	113
5.3- Perfiles peptídicos .....	114
5.3.1- Ensayo 1: <i>Lactobacillus acidophilus</i> A .....	115
5.3.2- Ensayo 2: <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> .....	117
5.3.3- Ensayo 3: <i>Lactobacillus acidophilus</i> B .....	119
5.3.4- Ensayo 4: <i>Bifidobacterium lactis</i> .....	121
5.3.5- Ensayo 5: <i>Lactobacillus acidophilus</i> C .....	123
5.3.6- Ensayo 6: <i>Lactobacillus casei</i> .....	126
5.3.7- Ensayo 7: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	128
5.3.8- Ensayo 8: fermento probiótico mixto .....	131
5.4- Aminoácidos libres .....	134

**DISCUSIÓN**

1- Preparación del sustrato lácteo graso .....	147
2- Composición de los quesos .....	150
3- Análisis microbiológicos .....	153
4- Proteólisis .....	160
4.1- Fraccionamiento nitrogenado y electroforesis .....	160
4.2- Perfiles peptídicos .....	165
4.3- Aminoácidos libres .....	174

<b>CONCLUSIONES</b> .....	180
---------------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	183
---------------------------	-----

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diferentes tipos de alimentos funcionales.....	2
<b>Tabla 2.</b> Microorganismos usados en productos probióticos .....	8
<b>Tabla 3.</b> Viabilidad de probióticos en quesos: estudios previos.....	53
<b>Tabla 4.</b> Cepas utilizadas en cada ensayo.....	63
<b>Tabla 5.</b> Gradiente de elución para la separación de los péptidos solubles en agua.....	82
<b>Tabla 6.</b> Gradiente de elución para la separación de los aminoácidos derivatizados .....	84
<b>Tabla 7.</b> Concentración de los fermentos, medios de cultivo utilizados y características morfológicas de las colonias .....	89
<b>Tabla 8.</b> Evolución de la población probiótica y valor de pH en el sustrato lácteo graso, en los ensayos 1, 2, 4, 6 y 7 .....	91
<b>Tabla 9.</b> Evolución de la población probiótica y valor de pH en el SLG con <i>L. acidophilus</i> B .....	93
<b>Tabla 10.</b> Evolución de la población probiótica y valor de pH en el SLG con <i>L. acidophilus</i> C .....	94
<b>Tabla 11.</b> Evolución del valor de pH y de la población de <i>L. acidophilus</i> C, <i>L. paracasei</i> y <i>B. lactis</i> en el SLG con un fermento mixto, .....	95
<b>Tabla 12.</b> Composición de los quesos en los ocho ensayos .....	97
<b>Tabla 13.</b> Contenido de nitrógeno en las fracciones solubles a pH 4,6, en ácido tricloroacético 12% y en ácido fosfotúngstico 2,5% en los quesos elaborados .....	109
<b>Tabla 14.</b> Análisis de ANOVA del contenido de aminoácidos libres en los quesos elaborados .....	142

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general de producción de quesos coagulados enzimáticamente .....	35
<b>Figura 2.</b> Esquema del proceso de proteólisis en quesos durante la maduración ....	39
<b>Figura 3.</b> Evolución del pH en los quesos T de todos los ensayos .....	100
<b>Figura 4.</b> Evolución del pH en los quesos E1 de todos los ensayos .....	100
<b>Figura 5.</b> Evolución del pH en los quesos E2 de todos los ensayos .....	101
<b>Figura 6:</b> Evolución del fermento primario, probiótico y NSLAB en los quesos elaborados .....	102
a) Ensayo 1: <i>L. acidophilus</i> A .....	102
b) Ensayo 2: <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> .....	102
c) Ensayo 3: <i>L. acidophilus</i> B .....	103
d) Ensayo 4: <i>Bifidobacterium lactis</i> .....	103
e) Ensayo 5: <i>L. acidophilus</i> C .....	104
f) Ensayo 6: <i>Lactobacillus casei</i> .....	104
g) Ensayo 7: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	105
h) Ensayo 8: Fermento probiótico mixto .....	105
<b>Figura 7.</b> Evolución del contenido de NS-PTA, en los ensayos donde hubo diferencias significativas .....	112
<b>Figura 8.</b> Urea-PAGE de los quesos durante la maduración .....	113

<b>Figura 9.</b> Perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 1.....	115
<b>Figura 10.</b> Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 1. a) Gráfico de <i>scores</i> b) Gráfico de <i>loading</i> .....	116
<b>Figura 11.</b> Perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 2 .....	117
<b>Figura 12.</b> Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 2. a) Gráfico de <i>scores</i> b) Gráfico de <i>loading</i> .....	118
<b>Figura 13.</b> Perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 3 .....	119
<b>Figura 14.</b> Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 3. a) Gráfico de <i>scores</i> b) Gráfico de <i>loading</i> .....	120
<b>Figura 15.</b> Perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 4.....	121
<b>Figura 16.</b> Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 4. a) Gráfico de <i>scores</i> b) Gráfico de <i>loading</i> .....	122
<b>Figura 17.</b> Perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 5.....	124
<b>Figura 18.</b> Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 5. a) Gráfico de <i>scores</i> b) Gráfico de <i>loading</i> .....	125
<b>Figura 19.</b> Perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 6.....	126
<b>Figura 20.</b> Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 6. a) Gráfico de <i>scores</i> b) Gráfico de <i>loading</i> .....	127
<b>Figura 21.</b> Perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 7.....	128
<b>Figura 22.</b> Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 7. a) Gráfico de <i>scores</i> b) Gráfico de <i>loading</i> .....	130
<b>Figura 23.</b> Perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 8.....	131
<b>Figura 24.</b> Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos de los quesos del ensayo 8. a) Gráfico de <i>scores</i> b) Gráfico de <i>loading</i> .....	133
<b>Figura 25.</b> Cromatogramas de las soluciones de estándares de AAL .....	134
<b>Figura 26.</b> Curvas de calibrado de los AAL .....	135
<b>Figura 27.</b> Perfiles de aminoácidos libres de los quesos elaborados.....	137
a) Ensayo 1: <i>L. acidophilus</i> A .....	137
b) Ensayo 2: <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> .....	138
c) Ensayo 3: <i>Lactobacillus acidophilus</i> B .....	138
d) Ensayo 4: <i>Bifidobacterium lactis</i> .....	139
e) Ensayo 5: <i>Lactobacillus acidophilus</i> C .....	139
f) Ensayo 6: <i>Lactobacillus casei</i> .....	140
g) Ensayo 7: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	140
h) Ensayo 8: Fermento probiótico mixto .....	141
<b>Figura 28.</b> Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL de los quesos elaborados. a) Gráfico de <i>scores</i> . b) Gráfico de <i>loading</i> .....	146

**Abreviaturas**

Aaba: ácido  $\alpha$ -aminobutírico.  
AAL: aminoácidos libres.  
AALT: aminoácidos libres totales.  
ACP: análisis por componentes principales.  
ACQ: 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato.  
AG: ácidos grasos.  
AMQ: 6-aminoquinolina.  
APC: agar para recuento en placa. Acrónimo del inglés (*agar plate count*).  
CEP: proteasa de pared. Acrónimo del inglés (*cell-envelope proteinase*).  
CP: componente principal.  
DO: densidad óptica.  
E1: queso experimental 1.  
E2: queso experimental 2.  
LSD: mínima diferencia significativa. Acrónimo del inglés (*least significant difference*).  
MRS-LP: medio MRS con agregado de cloruro de litio y propionato de sodio.  
NSLAB: bacterias lácticas no pertenecientes al fermento. Acrónimo del inglés (*non starter lactic acid bacteria*).  
NS-pH 4,6: nitrógeno soluble a pH 4,6.  
NS-PTA: nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico.  
NS-TCA: nitrógeno soluble en ácido tricloroacético.  
NT: nitrógeno total.  
Prt: proteasa de pared.  
SLG: sustrato lácteo graso.  
T: queso testigo.  
TGI: tracto gastrointestinal.

**Código de tres letras para aminoácidos.**

Ala: alanina.  
Arg: arginina.  
Asp: ácido aspártico.  
Cys: cisteína.  
Glu: ácido glutámico.  
Gly: glicina.  
His: histidina.  
Ile: isoleucina.  
Leu: leucina.  
Lis: lisina.  
Met: metionina.  
Phe: fenilalanina.  
Pro: prolina.  
Ser: serina.  
Thr: treonina.  
Tir: tirosina.  
Val: valina.