

**DISCUSIÓN**



### 1- Preparación del sustrato lácteo graso.

Como se ha mencionado con anterioridad, la metodología de adición del fermento probiótico luego de una preincubación en un sustrato lácteo se ensayó con el objetivo de determinar si podía generarse cierta protección de la viabilidad bacteriana en el queso. En efecto, una de las metodologías propuestas para incrementar la supervivencia probiótica en alimentos fermentados es la fermentación en dos pasos, que consiste en el agregado del fermento probiótico en primer lugar, y luego, en segundo lugar, del fermento primario (Shah, 2000). La metodología utilizada en el presente trabajo es un ejemplo de esta técnica. Si bien la preincubación no se hizo en la leche de elaboración sino en un sustrato especialmente preparado, al momento de su agregado a la leche, las bacterias probablemente se encontraban en una fase estacionaria, la cual ha sido asociada con una mayor tolerancia a las condiciones adversas del medio (Heller y col., 2003).

Las bacterias probióticas estudiadas han demostrado una capacidad de acidificación del medio variable entre una cepa y otra. Todas las cepas permanecieron en altos niveles de viabilidad durante el período de incubación y almacenamiento del SLG, lo que resultó promisorio con respecto a la obtención de similar comportamiento en los quesos. Asimismo, un incremento en los niveles de probióticos durante la preincubación se considera potencialmente beneficioso, ya que representa un mayor inóculo probiótico en el queso (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

Comparando el comportamiento individual de los fermentos, se observó que los lactobacilos demostraron el mayor crecimiento en el SLG. Esto era lógico de esperar debido a que, los lactobacilos de las especies estudiadas, poseen, en general, un sistema proteolítico más completo que las bifidobacterias, lo que les permite degradar las caseínas presentes en el medio y alcanzar un mejor desarrollo celular (Vassal, 1996, Boylston y col., 2004). Sin embargo, dado que solamente se ensayó una cepa de *B. lactis*, no es conveniente extrapolar las conclusiones obtenidas a todas las bifidobacterias, ya que existe una gran variación dentro del género y de cada especie (Boylston y col., 2004, Roy, 2005).

En algunos trabajos previos, se ha utilizado el fermento probiótico directamente como starter en la elaboración de quesos. Por ejemplo, Gomes y col. (1995) han probado distintos inóculos de dos cepas probióticas, *Bifidobacterium* sp. Bo y *L. acidophilus* Ki, para la obtención de un queso Gouda con una acidificación similar al queso tradicional. En la mayor parte de los quesos probióticos, por el contrario, los

fermentos probióticos se han utilizado como adjuntos (Dinakar y Mistry, 1994, Roy y col., 1998, Gardiner y col., 1999a y b, Kasimoğlu y col., 2004, Songisepp y col., 2004, entre otros). Este es el caso de la presente tesis, y por ello se trató de que los probióticos no generaran un aporte significativo a la acidificación durante la elaboración del queso, regulando la cantidad inoculada. Únicamente en el caso de *L. acidophilus* B, se limitó la dosis del fermento primario, considerando que la gran actividad acidificante del adjunto, aún con un inóculo reducido, era suficiente para alcanzar los valores de acidez necesarios durante la fabricación del queso. McBrearty y col. (2001) también propusieron la incorporación de un menor inóculo del fermento primario en el caso de utilizar una cepa probiótica muy acidificante, aunque también alertaron sobre la posibilidad de alterar la proteólisis.

Uno de los factores limitantes de la supervivencia de las bacterias probióticas en productos lácteos ha sido asociado con la presencia de metabolitos con efecto antimicrobiano, como diversos ácidos (Heller, 2001). La sensibilidad de estas bacterias a la acidez ha demostrado ser cepa dependiente (Shah, 2000). Las dos cepas de *L. acidophilus* cuya dosis tuvo que ser regulada por su excesiva actividad acidificante, demostraron un desarrollo mayor al partir de un inóculo menor, probablemente debido a la menor acidificación producida, lo que dio lugar a un medio menos adverso. De esta manera, se comprobó que la utilización de una menor dosis era beneficiosa porque implicaba un costo menor, favorecía el crecimiento de las bacterias probióticas, y disminuía la acidificación del medio.

Como ya se mencionó, las bifidobacterias demostraron el menor crecimiento en forma individual, pero sin embargo produjeron una marcada acidificación. Esta diferencia entre la actividad metabólica y el crecimiento, podría ser consecuencia de una inhibición causada por la alta concentración de ácido láctico y ácido acético, productos del metabolismo de estas bacterias (Desjardins y col., 1990b, Gomes y col., 1995, Blanchette y col., 1996). Sin embargo, también podría ser atribuido a la débil capacidad de crecimiento de las bifidobacterias en leche, debido a la falta de una actividad proteolítica significativa, junto a la escasa cantidad de aminoácidos libres y oligopéptidos presentes (Doleyres y Lacroix, 2005). Por otro lado, a pesar de las condiciones aeróbicas de incubación del sustrato, las bifidobacterias permanecieron viables y activas, sugiriendo que la cepa estudiada es aerotolerante (Boylston y col., 2004).

Las interacciones microbianas, positivas o negativas, son altamente probables en un medio inoculado con varias cepas bacterianas, lo que puede afectar la supervivencia de algunas de ellas (Roy, 2005). En el presente trabajo, los resultados del estudio de un fermento mixto sugirieron una interacción sinérgica entre las distintas cepas probióticas. Así, se observó un crecimiento casi cuatro veces mayor de las bifidobacterias en el SLG en presencia de los lactobacilos, que cuando fueron ensayadas individualmente. Sin embargo, esto ya no fue cierto cuando se utilizó una menor dosis de *B. lactis* (prueba 2, ensayo 8), indicando la importancia del nivel y la relación de concentración entre las diferentes cepas para lograr un efecto sinérgico. En este sentido, Gomes y col. (1998a) han mostrado que una relación 1:1 de *B. lactis* y *L. acidophilus* produjo el mayor desarrollo de las bifidobacterias, mientras que una relación 10:1 generó la mayor concentración de ácido acético. Por otro lado, Sasaki y col. (1968) trabajando con una cepa de lactobacilo y una de bifidobacteria diferentes, determinaron que 10:1 era la relación adecuada para el crecimiento de las bifidobacterias en un cultivo mixto. La influencia positiva de los lactobacilos sobre las bifidobacterias puede ser asociada a la actividad proteolítica de los primeros, que proporcionaría compuestos nitrogenados de pequeño tamaño molecular, los que han demostrado ser promotores del crecimiento de las bifidobacterias (Gomes y col., 1998a, Gomes y Malcata, 1999).

Por otro lado, al disminuir la dosis de lactobacilos, éstos experimentaron un crecimiento superior en presencia del mayor inóculo de bifidobacterias (pruebas 2 y 3, ensayo 8), a pesar de que el medio fue más adverso debido al menor pH generado. De esta manera, también se demostró un efecto positivo de las bifidobacterias sobre los lactobacilos. Similar resultado ha sido atribuido por Gomes y col. (1998a) al efecto buffer generado por la producción de acetato por las bifidobacterias. En un estudio de Vinderola y col. (2002b) sobre las interacciones entre diferentes cepas de *L. acidophilus*, *L. casei* y *Bifidobacterium* spp., se ha demostrado la presencia de inhibición únicamente sobre *L. acidophilus*. Por el contrario, en el presente trabajo, *L. acidophilus* fue la cepa que demostró el mayor incremento en el SLG inoculado con el fermento mixto, comparada con su comportamiento individual.

El estudio de las interacciones microbianas entre todas las especies incorporadas a un queso, es indispensable para desarrollar un alimento con altos niveles de bacterias probióticas (Vinderola y col., 2002b). Los efectos sinérgicos observados en el SLG inoculado con el fermento mixto, revistieron gran importancia en el diseño de un producto con elevada concentración de cada cepa probiótica incorporada.

## 2- Composición de los quesos

En el estudio de cepas probióticas *in situ*, la determinación de la composición global, el valor de pH y la concentración de sal en la humedad de los quesos tienen como objetivo comprobar la existencia de condiciones ambientales similares entre las distintas muestras. Este pre-requisito es indispensable para analizar la influencia de las bacterias probióticas sobre la proteólisis en el queso, ya que diferencias en el medio pueden determinar cambios en esta transformación y enmascarar o potenciar resultados (Hunter y col., 1997, Hynes y col., 2000, Shakeel-Ur-Rehman y col., 2001).

El contenido de humedad y de cloruro de sodio y el valor de pH son factores que tienen gran influencia en la actividad enzimática, incluyendo las proteasas y peptidasas bacterianas (Laan y col., 1998, Gobbetti y col., 1999, Kristiansen y col., 1999, Walstra y col., 1999b, Watkinson y col., 2001, Zalazar y col., 2002, Upadhyay y col., 2004). Asimismo, se ha visto que variaciones en el contenido de materia grasa, pueden modificar la proteólisis de quesos (Fenelon y col., 2000, Michaelidou y col., 2003).

En el presente trabajo, se demostró que el modelo experimental era reproducible y, por lo tanto, adecuado para el estudio de la influencia del fermento adjunto en la proteólisis. Asimismo, la obtención de rangos relativamente pequeños en los parámetros de composición global de los quesos de todos los ensayos, elaborados en un intervalo de tiempo prolongado (2 años), reveló que el procedimiento de fabricación fue correctamente estandarizado y aplicado.

En trabajos previos sobre quesos probióticos, se encontraron variaciones en algunos de los parámetros de la composición global entre quesos testigo y probióticos. Éstas fueron atribuidas a la dificultad de controlar la composición de los quesos en elaboraciones a escala laboratorio (25 y 10 L) (Gardiner y col., 1998, Ong y col., 2007), y en efecto Gardiner y col. (1998) corroboraron que al fabricar los quesos a escala piloto (450 L) utilizando los mismos fermentos, las diferencias desaparecían. En nuestro trabajo, a pesar de que el volumen de leche de elaboración fue relativamente bajo (45L), se obtuvo una buena reproducibilidad.

Solamente se detectaron diferencias en el valor de pH de los quesos de tres ensayos, debido a la actividad acidificante de algunos de los fermentos probióticos estudiados. Las diferencias se presentaron en dos de los ensayos con cepas de *L. acidophilus* (A y B) utilizadas en forma individual, y en el ensayo 8, con el fermento probiótico mixto. En este último caso, la presencia de altas concentraciones de tres cepas probióticas, todas las cuales demostraron actividad acidificante en el SLG,

probablemente generó un efecto aditivo en cuanto a la acidificación del queso. Sin embargo, los cambios en el pH en dos de los ensayos (1 y 8) se produjeron al inicio de la maduración, y luego el pH de quesos testigos y experimentales se igualó, por lo que su influencia en los cambios bioquímicos en el queso no resultaría tan importante. Por el contrario, en el ensayo 3 (*L. acidophilus* B) las diferencias se presentaron al final del período de maduración, lo que podría haber impactado en la actividad de las enzimas presentes y la expresión bioquímica de los fermentos, y, consecuentemente, en la proteólisis (Gobbetti y col., 1999, Upadhyay y col., 2004). El hecho de que la cepa *L. acidophilus* B es muy acidificante ya se conocía de su estudio en el SLG, motivo que llevó a reducir, en los quesos del ensayo 3, la dosis del fermento primario. En consecuencia, si bien se detectaron diferencias significativas entre quesos testigos y experimentales dentro del ensayo 3, los quesos obtenidos mostraron valores de pH similares o ligeramente mayores a los de los otros ensayos.

El pH, además de influir en las actividades enzimáticas (Gobbetti y col., 1999, Watkinson y col., 2001), ha demostrado un gran efecto en la textura del queso, ya que impacta en el estado del calcio en el alimento (Watkinson y col., 2001, Pastorino y col., 2003, Fox y McSweeney, 2004). De esta manera, la obtención de quesos demasiado ácidos podría ser perjudicial para la calidad del producto, ya que ocasionaría características reológicas indeseables (Watkinson y col., 2001, Pastorino y col., 2003).

En varios trabajos previos sobre quesos probióticos, se comprobó que las bacterias probióticas no ejercían ninguna influencia en la composición del queso, incluyendo el pH (Daigle y col., 1999, Gardiner y col., 1999a, Corbo y col., 2001, Kasimoğlu y col., 2004). Por el contrario, otros autores encontraron que el agregado de diferentes bacterias probióticas se reflejaba en una disminución del pH del producto, debido a su capacidad acidificante, que se sumaba a la del fermento primario (Gobbetti y col., 1998, El-Zayat y Osman, 2001, McBrearty y col., 2001, Ong y col., 2006). En uno de estos trabajos en queso Cheddar, la gran actividad acidificante de una cepa de *B. lactis* determinó, además de un pH menor, un mayor contenido de humedad en el queso, debido a la rapidez de la acidificación, que no permitió una correcta eliminación del suero (McBrearty y col., 2001).

En general, el pH de los quesos testigos mostró más variabilidad que el de los quesos con probióticos. Esta característica podría ser consecuencia de una microbiota de composición más variable. En efecto, en los quesos testigo, la población bacteriana dominante fueron las bacterias lácticas del fermento primario, seguidas por la población

de bacterias lácticas no fermento (NSLAB), cuya concentración se incrementó durante la maduración. En quesos elaborados con leche pasteurizada, este grupo microbiano procede generalmente de contaminaciones post-pasteurización o de bacterias que resisten este proceso, y se ha propuesto como el origen de la falta de constancia en la composición y calidad de quesos (Crow y col., 2001, Hynes y Bergamini, 2004). Además, el hecho de que el fermento primario estaba compuesto únicamente por cepas de *Streptococcus thermophilus* que, en general, no tienen la capacidad de metabolizar la galactosa proveniente de la hidrólisis de la lactosa (Axelson, 1998, Ray, 2001c, McSweeney y Fox, 2004), podría haber favorecido el crecimiento y actividad de las NSLAB (Hynes y Bergamini, 2004). En un trabajo sobre queso Pategrás, Zalazar y col. (1979) también observaron una evolución variable del valor de pH en muestras elaboradas en diferentes días.

Los quesos experimentales, a diferencia de los quesos testigo, contenían una elevada población de un fermento adjunto, lo que presumiblemente dio lugar a una mayor homogeneidad en la microbiota desde la elaboración y durante toda la maduración. En efecto, de acuerdo a nuestros resultados las poblaciones del fermento primario y adjunto dominaron el ecosistema del queso, y probablemente consumieron todos los hidratos de carbono fermentables y favorecieron una menor variación de pH (McSweeney y Fox, 2004).

Dentro de los quesos experimentales, en general, el pH de los quesos E2 cambió menos que el de los quesos tipo E1 durante la maduración. Esta observación sugiere que las bacterias probióticas, al ser incorporadas luego de una preincubación, se encuentran más activas al momento de su agregado a la leche de elaboración y podrían metabolizar rápidamente los hidratos de carbono presentes, bajando el pH desde el principio de la maduración (Williams y col., 2002). La  $\beta$ -galactosidasa, responsable de la hidrólisis de la lactosa ha demostrado ser inducible en cepas de *L. acidophilus*, de acuerdo al medio de crecimiento (Gilliland, 1998, De Vuyst, 2000).

El valor de pH del queso, así como otros parámetros, cambia según la zona del producto analizada, de acuerdo a la distancia de la muestra con respecto a la superficie (Noomen, 1977, Fallico y col., 2004, Verdini y col., 2004). Esta variación se produce principalmente por las diferentes concentraciones de sal que se generan en el queso luego del salado. Efectivamente, durante la inmersión en salmuera y luego de este proceso, la sal penetra en el interior de la masa del queso, estableciéndose diferentes condiciones ambientales que influyen en la capacidad de acidificación por parte de las

bacterias lácticas (Noomen, 1977). Si bien, prácticamente toda la lactosa es consumida durante la elaboración, pequeñas cantidades siguen presentes y originan variaciones leves de pH durante la maduración del queso (Fox, 2003). En consecuencia, el pH de un mismo queso puede presentar variaciones espaciales y temporales, lo que también es cierto para réplicas de quesos iguales elaborados en distintos días. La importancia de este parámetro en la calidad del producto y el error asociado a su determinación, han sido a menudo minimizadas o poco estudiadas, y merecerían mayor atención en futuros estudios.

### 3- Análisis microbiológicos

Diferentes bacterias presentes en un mismo medio ambiente pueden experimentar interacciones positivas, negativas o neutras (Ray, 2001a).

La población de *S. thermophilus* no disminuyó durante la maduración, contrariamente a lo evidenciado, en general, por los fermentos mesófilos, que comúnmente se utilizan en trabajos sobre otras variedades de quesos probióticos. En general, los lactococos mueren y posiblemente lisan en el queso durante la maduración, como consecuencia de las condiciones ambientales adversas, como el pH bajo, alto contenido de NaCl, ausencia de carbohidratos fermentables y baja temperatura (Gardiner y col., 1998, Roy y col., 1998, Kasimoğlu y col., 2004, Ong y col., 2007, entre otros). La lisis del fermento primario ha sido señalada como favorable para el crecimiento o la supervivencia de cultivos adjuntos (Thomas, 1987). Sin embargo, otros trabajos, así como los resultados de la presente tesis han demostrado que la utilización de un starter no lítico es perfectamente compatible con el desarrollo de fermentos adjuntos (Vinderola y col., 2000b, Corbo y col., 2001, Hynes y col., 2003a, Milesi y col., 2006). Un mantenimiento similar de la viabilidad de *S. thermophilus* fue observado en queso fresco, con la incorporación de diferentes cepas de bacterias probióticas, durante un período de maduración de 60 días (Vinderola y col., 2000b).

Vinderola y col. (2002b) encontraron que la inhibición de los probióticos sobre el fermento primario era mayor que la situación contraria. En nuestro trabajo, en general no se observaron interacciones negativas del fermento probiótico con el fermento primario, lo que se basó en la similar evolución evidenciada por el mismo en los distintos quesos. Otros autores observaron previamente que el fermento probiótico no impactaba negativamente en la supervivencia del fermento primario (Gobbetti y col.,

1998, Daigle y col., 1999, Vinderola y col., 2000b, Ong y col., 2006, entre otros). Cabe destacar, sin embargo, que en el ensayo con el fermento probiótico mixto se detectó cierta influencia negativa sobre el starter. El incremento inicial, entre 0 y 3 días de maduración, de la población de *S. thermophilus* fue menor en los quesos experimentales que en los quesos testigo y podría ser atribuido a la competencia por nutrientes debido a las altas concentraciones bacterianas presentes (Roy, 2005). Similar resultado fue observado en los quesos tipo E1 del ensayo 4, sugiriendo una influencia negativa de las bifidobacterias sobre los streptococos cuando ambos se encuentran en similar fase de crecimiento.

En queso Canestrato Pugliese, Corbo y col. (2001) encontraron una notoria interacción positiva de dos cepas de bifidobacterias, utilizadas en forma individual o conjunta, sobre la población de *S. thermophilus*. En dicho trabajo, la mayor población (aproximadamente un orden logarítmico) de *S. thermophilus* al final de la maduración en los quesos experimentales fue atribuida a una influencia positiva de las bifidobacterias debido a su actividad  $\beta$ -galactosidasa y peptidasa. En la presente tesis, se observó una muy leve influencia positiva del fermento adjunto cuando se ensayaron las cepas probióticas individualmente. Dicha influencia fue evidenciada por un aumento inicial de la población de *S. thermophilus* ligeramente mayor en los quesos experimentales que en los quesos testigos.

Más allá de estas pequeñas interacciones negativas y positivas, que se observaron fundamentalmente en el incremento inicial de la población de streptococos, la misma se mantuvo constante durante la maduración y fue muy similar en todos los quesos, con las diferencias puntuales que se han comentado en la sección de resultados.

En las muestras con el fermento probiótico mixto, no se observaron grandes interacciones entre las diferentes cepas probióticas presentes, manteniéndose todas en niveles elevados durante toda la maduración. Al igual que lo observado para el fermento primario, solamente pudo verificarse cierta interacción entre las cepas al inicio del almacenamiento del queso, entre 0 y 3 días, pero las concentraciones finales fueron similares a las obtenidas en los ensayos individuales. Por ejemplo, la presencia de las otras cepas probióticas incrementó el aumento inicial de la concentración de *L. paracasei* en los quesos tipo E1, mientras que lo contrario sucedió con *L. acidophilus* en los quesos tipo E2.

En un estudio de Phillips y col. (2006), se encontró que una cepa de *L. acidophilus*, que formaba parte de un fermento probiótico mixto ensayado en queso

Cheddar, mostró un descenso marcado de su población hasta  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  a las 12 semanas, que continuó hasta  $10^3$  UFC  $g^{-1}$  a las 32 semanas. Dicha cepa de *L. acidophilus* coincidía con la estudiada en la presente tesis en el ensayo 5 y 8 (*L. acidophilus* C), aunque los otros probióticos utilizados en el fermento mixto eran distintos (*L. casei* Lc1 y *B. lactis* Bb12). La misma cepa de *L. acidophilus* se mantuvo en niveles de  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  durante 21 días en queso Fresco Minas (Buriti y col., 2005), y de  $10^9$  UFC  $g^{-1}$  en queso Tallaga, utilizada en forma individual o junto a una cepa de *B. lactis* (El-Zayat y Osman, 2001). En el presente trabajo, la cepa en cuestión, se mantuvo en concentraciones de alrededor de  $10^8$  UFC  $g^{-1}$ , tanto cuando fue utilizada en forma individual (ensayo 5), como en forma conjunta con otras dos cepas (ensayo 8).

Por otro lado, la cepa ensayada en el ensayo 3 del presente trabajo (*L. acidophilus* B) también fue caracterizada por otros autores. En queso Cheddar, mostró una disminución importante, cuando fue incorporada con *L. paracasei* y *B. lactis* (Phillips y col., 2006). En otro estudio sobre el mismo tipo de queso, se observó que mantenía una elevada viabilidad durante 6 meses, ya sea utilizada en forma individual o conjunta con otras dos cepas (Ong y col., 2006 y 2007). En un tercer trabajo, también en queso Cheddar, demostró un nivel elevado hasta los 30 días, mientras que a los 60 días la población disminuyó hasta  $10^6$  UFC  $g^{-1}$ , al ser ensayada junto a una cepa de *B. lactis* (Darukaradhy y col., 2006). En la presente tesis, esta cepa fue utilizada únicamente en forma individual, y se obtuvo una viabilidad alrededor de  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  al final del período de maduración.

La cepa de *L. paracasei* estudiada en la presente tesis, también fue utilizada por otros autores en queso Cheddar. Ong y col. (2006 y 2007) observaron el mantenimiento de una alta población de *L. paracasei*, tanto cuando fue incorporada individualmente o con otras dos cepas, durante un período de 6 meses, más prolongado que el ensayado en este trabajo. Asimismo, Phillips y col. (2006), determinaron una concentración de *L. paracasei*, agregada como parte de un fermento mixto, de alrededor de  $10^7$  UFC  $g^{-1}$  a las 10 semanas. En esta tesis, la misma cepa de *L. paracasei* demostró una mejor performance, ya que su concentración a los 60 días en el queso Pategrás fue de alrededor de  $10^9$  UFC  $g^{-1}$ , tanto cuando fue utilizada en forma individual (ensayo 2) como cuando se agregó en el fermento probiótico mixto (ensayo 8).

En cuanto a la cepa de *L. casei* ensayada, también demostró mantener mejor su viabilidad en las condiciones planteadas en esta tesis que en las propuestas en otro trabajo, ya que se obtuvo una concentración de  $10^9$  UFC  $g^{-1}$  al ser agregada

individualmente al queso Pategrás, contra  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  al ser adicionada en queso Cheddar junto a otros dos probióticos, a las 10 semanas de maduración (Phillips y col., 2006).

Finalmente, los datos existentes sobre la cepa de *B. lactis* evaluada en esta tesis consignan que permaneció en un nivel alrededor de  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  durante todo el período de maduración de queso Cheddar (Ong y col., 2006 y 2007), mientras que en esta tesis se observó un nivel levemente inferior. Este último resultado también fue obtenido por Phillips y col. (2006) cuando se agregó en queso Cheddar en forma conjunta con otras dos cepas, mientras que Darukaradhya y col. (2006) observaron una disminución hasta un valor de  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  a los 2 meses de maduración del queso.

Sintetizando, los probióticos estudiados en la presente tesis, en general, demostraron una viabilidad mayor, o al menos igual, a la encontrada en otros modelos casearios, en todos los casos por encima del mínimo requerido para alcanzar el status de alimento probiótico, durante toda la maduración (60 días) (De Vuyst, 2000, Salminen y Ouwehand, 2003).

Las diferencias encontradas en la viabilidad de los probióticos indican que tanto las diferencias ambientales en la matriz alimentaria, como la interacción de los fermentos presentes y el período de maduración son factores importantes en la supervivencia de las bacterias probióticas. Asimismo, el proceso de elaboración de cada tipo de queso también influye en la supervivencia de los probióticos. En este sentido, el stress celular derivado de la manufactura del queso Cheddar es probablemente mayor que el ocasionado en la fabricación de quesos de alta humedad o quesos tipo Pategrás. En efecto, la obtención de queso Cheddar involucra etapas, como molido de la cuajada, cheddarización, salado directo, etc., que los quesos Pategrás o frescos, por ejemplo, no suponen (Banks, 2003). Los resultados del presente trabajo y de otros estudios involucrando cepas similares u otros probióticos reafirman el concepto de que cada alimento probiótico debe desarrollarse como un todo cepa(s)-producto, y que las extrapolaciones de resultados entre cepas o de una misma cepa entre distintos alimentos no son posibles (O'Riordan y Fitzgerald, 1998, Corbo y col., 2001, McBrearty y col., 2001).

El estado fisiológico celular al momento del agregado del fermento al producto ha demostrado ser un factor importante para la resistencia de las bacterias a las condiciones adversas del medio (Bertazzoni Minelli y col., 2004, Leverrier y col., 2005). En el presente trabajo, sin embargo, en general no se encontraron evidencias de que el estado

fisiológico tuviera algún impacto sobre la supervivencia probiótica en el queso, ya que las poblaciones probióticas fueron similares en los quesos, ya sea que fueran agregadas luego de una incubación en un sustrato o incorporadas directamente en forma liofilizada. Si bien la población fue mayor en la mayoría de los quesos E2, esta diferencia resultó significativa solamente en algunos casos, y sólo al comienzo de la maduración. De este modo, la diferencia de población podría ser atribuida únicamente al mayor inóculo real en el queso, dado por el crecimiento demostrado durante la preparación del SLG, o a una protección de la cepa, pero que fue transitoria y duró muy pocos días. Solamente para *L. acidophilus* B, la preincubación demostró una acción protectora sobre la viabilidad de dicha cepa probiótica en el producto. La metodología de adición en una crema fermentada fue propuesta por Daigle y col. (1999) como una estrategia para favorecer el crecimiento de las bifidobacterias estudiadas en dos etapas: en el sustrato y en el queso. En dicho trabajo, solamente se ensayaron dos diferentes inóculos y tiempos de incubación del sustrato, obteniéndose en el queso Cheddar una población de  $5 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup> a las 12 semanas de maduración, pero no se compararon resultados con la adición directa del probiótico.

De los ensayos llevados a cabo en esta tesis, se puede concluir que, en general, la adición en forma directa del cultivo liofilizado fue más eficiente que la adición luego de una preincubación. En primer lugar, se alcanzaron similares niveles de la población probiótica durante la maduración de los quesos. Por otro lado, la preincubación conlleva más etapas de preparación y un mayor manipuleo del cultivo, lo cual además de ser menos conveniente por el trabajo y tiempo requeridos, puede traer aparejado un mayor desarrollo y difusión de bacteriofagos en la industria láctea (Batt y col., 1995). Asimismo, la metodología de adición con preincubación, en general, implicó una mayor acidificación del producto, lo cual puede también afectar negativamente su textura, disminuyendo la aceptabilidad por parte del consumidor (Hynes y col. 1999, Buriti y col., 2005).

El nivel de bacterias probióticas sugerido como necesario en un alimento probiótico es de  $10^7$  UFC g<sup>-1</sup> o mL<sup>-1</sup> (De Vuyst, 2000). En todos los ensayos realizados, se obtuvo una concentración probiótica mayor a dicho nivel en ambos quesos experimentales, por lo que todos los quesos desarrollados pueden ser considerados alimentos probióticos durante todo el período de maduración estudiado.

En la elaboración de un queso, una parte de los fermentos adicionados se pierde en el suero. Ong y col. (2007) determinaron una pérdida de probióticos en el suero

durante la elaboración de queso Cheddar, entre  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> y  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Varias estrategias se han propuesto para evitar estas pérdidas, y garantizar una mayor población probiótica en el queso, como la encapsulación de los fermentos o el agregado del probiótico en una etapa tardía de la elaboración (Dinakar y Mistry, 1994, Gobbetti y col., 1998, Songisepp y col., 2004). Asimismo, Corbo y col. (2001) propusieron acortar el período típico de calentamiento de la cuajada en los moldes de queso Canestrato Pugliese, para evitar una sobreacidificación y mejorar la retención de los cultivos probióticos. Por otro lado, durante el desarrollo de quesos frescos probióticos, la leche de elaboración fue concentrada por ultrafiltración, y las bacterias probióticas se agregaron luego de este paso tecnológico (Roy y col., 1998, Vinderola y col., 2000b). En el presente trabajo, se demostró que es posible adicionar directamente las bacterias probióticas a la leche, sin modificaciones tecnológicas de elaboración, y al mismo tiempo obtener una alta concentración probiótica en los quesos. En efecto, considerando que la transformación casearia es un proceso de concentración y que el suero que se pierde representa aproximadamente el 95% de la humedad original, se puede concluir que los microorganismos se retuvieron mayoritariamente en el gel (92%), lo que fue corroborado por recuentos en el suero. De esta manera, se comprobó que el protocolo de elaboración del queso tipo Pategrás que se utilizó en el presente trabajo resultó apropiado para el desarrollo de un producto probiótico. Estas características son importantes desde el punto de vista de la producción industrial de este tipo de quesos.

En nuestro trabajo, las cepas que demostraron la mayor resistencia al medio ambiente del queso Pategrás fueron las del grupo de *L. casei*, verificándose para las mismas las mayores concentraciones en el queso, tanto cuando fueron utilizadas en forma individual o junto a otros probióticos. Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Vinderola y col. (2000b), que ensayaron en queso fresco diversas combinaciones de a dos o tres cepas probióticas. Estos autores observaron que, mientras en general, las cepas de *L. acidophilus* y bifidobacterias mostraban una disminución de alrededor de un orden logarítmico durante la maduración (60 días), las cepas ensayadas de *L. casei* no presentaban ningún descenso de su población. Otros autores también informaron que las cepas de este grupo mantuvieron altas poblaciones en queso Cheddar (Gardiner y col., 1998, Stanton y col., 1998, Gardiner y col., 2002, Ong y col., 2006 y 2007, Phillips y col., 2006). Por el contrario, no se encontraron estudios que informaran una disminución pronunciada de la población de estos probióticos durante la maduración de quesos. Solamente en dos estudios se observó un leve descenso hasta

niveles de  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  (Stanton y col., 1998, Lynch y col., 1999). Bacterias de este grupo microbiano constituyen generalmente una parte mayoritaria de los lactobacilos adventicios en el queso, la flora NSLAB, que alcanza elevados recuentos al final de la maduración (Hynes y Bergamini, 2004). Más allá de diferencias en el origen de lactobacilos probióticos y NSLAB, es posible que cepas de las especies de este grupo estén adaptadas y sean capaces de proliferar en las condiciones ambientales del queso, lo que podría explicar la alta resistencia observada.

Las cepas de *L. acidophilus* también demostraron una buena adaptación y supervivencia en el producto, pero sus valores promedios fueron un poco menores que los obtenidos para el grupo anterior. Ong y col. (2007) observaron una tendencia similar, al determinar que dos cepas de *L. acidophilus* demostraron mayor disminución en su viabilidad que otros lactobacilos y bifidobacterias estudiadas en la misma experiencia. También, Vinderola y col. (2002a) observaron una mayor sensibilidad de varias cepas de *L. acidophilus* en leche acidificada a pH 4 y 5, al compararla con otras bacterias lácticas y probióticas. En otros trabajos, se han encontrado resultados dispares respecto a la viabilidad de *L. acidophilus*, aún utilizando la misma cepa, en quesos similares o en variedades diferentes (El-Zayat y Osman, 2001, Darukaradhya y col., 2006, Ong y col., 2006, Phillips y col., 2006).

Finalmente, las bifidobacterias alcanzaron la menor concentración probiótica final en el queso. Diversos estudios han demostrado la marcada sensibilidad de las bifidobacterias a ambientes adversos. En efecto, condiciones de aerobiosis, interacciones microbianas, escasez de nutrientes, acidez u otros inhibidores bacterianos han sido indicados como factores condicionantes de la supervivencia de dichas bacterias (Boylston y col., 2004, Roy, 2005). La cepa de *B. lactis* ensayada en esta tesis, si bien mostró valores de viabilidad menores a los de los lactobacilos, se mantuvo por encima del nivel sugerido para un alimento probiótico. Se ha postulado que durante el proceso de maduración, la producción de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, y la generación de un medio más anaerobio debido al metabolismo de las bacterias lácticas, favorecen el mantenimiento de la viabilidad y crecimiento de las bifidobacterias (Boylston y col., 2004, Roy, 2005). Es posible que estos factores hayan influido en la supervivencia de la cepa de *B. lactis* ensayada en este trabajo, especialmente cuando fue utilizada en forma individual en el ensayo 4, en el que se verificó un crecimiento en la segunda parte de la maduración. Por otro lado, también hay que destacar que la tolerancia a las situaciones de stress en el alimento es cepa-dependiente (Boylston y

col., 2004), y por lo tanto pueden encontrarse cepas más resistentes. En efecto, se han demostrado diferentes niveles de supervivencia de distintas cepas de bifidobacterias incorporadas en quesos. Así, Corbo y col. (2001) y McBrearty y col. (2001) demostraron que cepas de *B. bifidum* y *B. lactis* se mantenían en niveles más elevados que una cepa de *B. longum* en queso Cheddar, la cual disminuyó su concentración hasta  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup>. Por otro lado, en queso Cottage y Fresco se obtuvieron resultados negativos con respecto a la viabilidad de varias cepas de bifidobacterias, ya que su población decreció marcadamente a los 30 días de maduración (Blanchette y col., 1996, Roy y col., 1998). Estos resultados vuelven a remarcar la importancia que ejerce la matriz alimentaria sobre la viabilidad probiótica.

El agregado de fermentos probióticos adjuntos fue eficiente para controlar el desarrollo de la flora láctica adventicia en los quesos, lo que, de manera indirecta impactaría favorablemente en la calidad al permitir un mayor control de la microbiota (Gardiner y col., 1999a). El agregado de fermentos adjuntos de lactobacilos ha sido señalado como una estrategia para inhibir el desarrollo de NSLAB (Crow y col., 2001, Hynes y col., 2003c, Milesi y col., 2006), y un adjunto probiótico de *Enterococcus faecium* también fue capaz de disminuir el crecimiento de este grupo microbiano (Gardiner y col., 1999a). Por el contrario, McBrearty y col. (2001) observaron un mayor desarrollo de NSLAB en los quesos con *B. lactis*, que atribuyeron a una mayor proteólisis en estos últimos, lo que a su vez favorecía el desarrollo de la flora láctica adventicia. Los quesos con *B. lactis* estudiados en este trabajo no presentaron una población de NSLAB incrementada. En los quesos testigos, las NSLAB alcanzaron niveles de alrededor de  $5 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup> a los 60 días de maduración, lo que resulta similar a lo informado para quesos semiduros argentinos (Bude Ugarte y col., 2006).

## **4- Proteólisis**

### **4.1- Fraccionamiento nitrogenado y electroforesis**

Durante la maduración de un queso, varios son los agentes proteolíticos que participan en este proceso (Sousa y col., 2001). Las enzimas microbianas de los fermentos adjuntos, entre ellos los fermentos probióticos, son parte del conjunto de proteasas y peptidasas involucradas. Es, precisamente, la contribución de este agente y sus equipos enzimáticos lo que se estudió en el presente trabajo.

El proceso de maduración del queso Pategrás es similar al de otros quesos semiduros, en los cuales actúa en primer lugar el coagulante, que puede encontrarse parcialmente inactivado por la temperatura de cocción de la cuajada, aunque este tratamiento en general es muy suave para producir la destrucción de la enzima. El coagulante actúa principalmente sobre la  $\alpha_{s1}$ -caseína, y su acción es continuada por las enzimas de los fermentos lácticos presentes y las NSLAB. La plasmina no ejerce un rol importante en este tipo de quesos (Zalazar y col., 1999, McSweeney, 2004a).

En los quesos estudiados en esta tesis, se detectó que el nitrógeno soluble en las distintas fracciones estaba dentro del rango obtenido para un gran número de quesos comerciales de pasta semidura (Zalazar y col., 1999).

Se observó, además, que el incremento de NS-TCA fue mayor que el incremento de NS-PTA durante la maduración, lo que sugiere que en el período de maduración estudiado (60 días), la peptidólisis fue más importante a nivel de la producción de péptidos medianos, que de péptidos pequeños y aminoácidos libres. Sin embargo, esta diferencia también puede deberse a una mayor degradación de los compuestos nitrogenados solubles en PTA (Sousa y col., 2001, McSweeney, 2004b).

El menor incremento encontrado en los niveles de NS-pH 4,6 y NS-TCA en la segunda parte de la maduración de los quesos confirma la secuencia más aceptada para describir la proteólisis en este tipo de alimentos: una primera etapa que supone la hidrólisis de las caseínas para dar péptidos grandes y medianos, causada por las proteasas no microbianas y las proteasas de pared de las bacterias lácticas, seguida de una segunda etapa en la que dichos polipéptidos son degradados a péptidos menores y aminoácidos libres, principalmente por las peptidasas de los fermentos, lo que se ve favorecido por la lisis celular (Visser, 1977, Grappin y col., 1985, Rank y col., 1985, McSweeney, 2004a y b). De esta manera, en la primera fase de la maduración (30 días), la mayor importancia de la acción de la quimosina y las proteasas de pared se vería reflejado en una mayor velocidad de incremento de los índices de NS-pH 4,6 y NS-TCA, mientras que en la segunda parte, al cobrar valor las peptidasas de las bacterias lácticas, la velocidad de incremento de estos índices disminuiría.

La situación fue diferente para la fracción de NS-PTA, donde se observaron velocidades variables al inicio y al final de la maduración. Los compuestos nitrogenados que componen esta fracción provienen principalmente de la acción de peptidasas intracelulares (Gripon, 1994, Savijoki y col., 2006).

Ninguno de los fermentos probióticos ensayados demostró una contribución significativa a la proteólisis primaria, lo que fue evidenciado por los perfiles de electroforesis y el contenido de NS-pH 4,6. Hallazgos similares fueron realizados por otros autores. Así, diferentes cepas de lactobacilos y bifidobacterias incorporadas en queso Cheddar no demostraron ningún efecto sobre el contenido de NS-pH 4,6 o NS-Agua, ni en los resultados de la electroforesis de las caseínas (Dinakar y Mistry, 1994, Gardiner y col., 1998 y 1999a). Tampoco se detectó influencia del fermento probiótico en la proteólisis primaria de quesos Gouda (Gomes y col., 1995), fresco Minas (Buriti y col., 2005), y queso de cabra (Gomes y Malcata, 1998). Estos resultados no resultaron sorprendentes, ya que la mayoría de los compuestos nitrogenados solubles en la fracción de NS-pH 4,6 y los cambios observados en la electroforesis de la fracción insoluble a ese pH, han demostrado ser producidos principalmente por acción de la quimosina retenida en la cuajada, y eventualmente por la plasmina, en ciertos tipos de quesos. Sin embargo, también se ha detectado que algunos de los péptidos de NS-pH 4,6 son producidos por la acción del fermento primario (Visser, 1977, Grappin y col., 1985, Rank y col., 1985, Lane y Fox, 1995), y ciertos fermentos probióticos han evidenciado alguna influencia en esta etapa de la proteólisis. Ong y col. (2007) detectaron un incremento del contenido de NS-Agua y una mayor degradación de la  $\alpha_{s1}$ -caseína entre las 12 y 24 semanas de maduración de queso Cheddar con la incorporación de diferentes cepas probióticas, ejerciendo un mayor impacto las cepas de *L. casei* y *L. paracasei*, en comparación con *L. acidophilus* y bifidobacterias. Asimismo, también encontraron un leve pero significativo incremento de la hidrólisis de la  $\beta$ -caseína. Tres de las cepas utilizadas por estos autores, una de cada grupo microbiano, fueron ensayadas también en este trabajo, en el que no demostraron ningún efecto sobre la primera fase de la proteólisis en queso Pategrás, probablemente porque el período de maduración estudiado fue mucho más corto. Otros autores detectaron mayor contenido de NS-pH 4,6 utilizando diversas bifidobacterias en varios modelos de queso: Tallaga (El-Zayat y Osman, 2001), Canestrato Pugliese (Corbo y col., 2001), Crescenza (Gobbetti y col., 1998), y también *L. acidophilus* en queso Blanco Turco (Kasimoğlu y col., 2004).

Al contrario de los resultados observados en la proteólisis primaria, las cepas ensayadas de lactobacilos demostraron un impacto en la proteólisis secundaria, que fue de diferente magnitud según la cepa ensayada. Por el contrario, *B. lactis* no demostró influencia en ninguno de los índices de proteólisis secundaria estudiados.

El contenido de NS-TCA resultó inferior en los quesos E1 del ensayo 7 (con *L. rhamnosus*) en comparación con los quesos T/E2 de la misma prueba al final de la maduración. Este resultado fue acompañado de una leve disminución en las poblaciones de los fermentos primario y probiótico. Los péptidos que componen esta fracción provienen principalmente de la actividad proteolítica del fermento primario, aunque algunos también son producto de la acción del coagulante (Rank y col., 1985). En el resto de los ensayos, el NS-TCA no fue afectado por la adición de los fermentos probióticos. No existen muchos trabajos previos sobre quesos probióticos que hayan evaluado la proteólisis secundaria, y la fracción de NS-TCA ha sido analizada únicamente en tres de los trabajos disponibles. Ong y col. (2007) observaron un incremento significativo en el NS-TCA de queso Cheddar elaborado con la adición de tres cepas probióticas en forma individual (*L. acidophilus* 4962, *L. casei* 279, *B. longum* 1941), mientras que no hubo diferencia en los quesos elaborados con otras tres cepas (*L. acidophilus* L10, *L. paracasei* L26, *B. lactis* B94). Por su parte, Daigle y col. (1999) que incorporaron bifidobacterias en queso Cheddar en una crema fermentada utilizando dos diferentes inóculos y tiempos de incubación, detectaron un incremento de NS-TCA en el ensayo con mayor inóculo y menor tiempo de incubación. Por último, Ong y col. (2006), al utilizar fermentos probióticos mixtos compuestos por tres cepas, verificaron un incremento de NS-TCA con respecto a los testigos luego de 5 meses de maduración.

Finalmente, la fracción del queso que contiene casi todos los aminoácidos libres, y algunos dipéptidos y tripéptidos, el NS-PTA, resultó afectada por el agregado de los fermentos probióticos desde el inicio de la maduración en los ensayos con *L. acidophilus*. Por el contrario, en los ensayos donde se utilizaron cepas del grupo de *L. casei* o la cepa de *B. lactis*, no se encontró ningún impacto sobre este índice de proteólisis secundaria. Estos resultados indican una mayor actividad peptidolítica de las cepas ensayadas de *L. acidophilus*, en comparación con las cepas del grupo de *L. casei* y la cepa de *B. lactis* estudiadas. Se ha encontrado que el NS-PTA proviene principalmente de la acción del fermento primario utilizado, siendo primordial esta actividad microbiana en lo que se conoce como la “profundidad” de la proteólisis del queso (Visser, 1977, Rank y col., 1985, Hynes y col., 2001). Asimismo, diferentes lactobacilos adjuntos han provocado modificaciones en el perfil y en la cantidad de AAL, especialmente cuando su efecto fue estudiado en ausencia de un fermento primario (Lane y Fox, 1995, Lynch y col., 1996, 1997 y 1999, Hynes y col., 2003a). La fracción de NS-PTA está compuesta por péptidos muy pequeños y aminoácidos,

excepto aminoácidos dibásicos (lisina, arginina, ornitina) y amoníaco (Ardö, 1999). Esta fracción es utilizada frecuentemente como un índice de la cantidad de AAL totales en el queso (Gomes y col., 1995, Hynes y col., 2003b, Ong y col., 2006 y 2007).

En los ensayos con las cepas de *L. acidophilus* A y B, los grupos de medias homogéneas revelaron una contribución similar del fermento probiótico al contenido de NS-PTA, ya sea cuando fueron incorporadas directamente en forma liofilizada o luego de una preincubación. Por el contrario, en los ensayos donde se utilizó *L. acidophilus* C, ya sea en forma individual (ensayo 5) o en un fermento mixto (ensayo 8), se notó un impacto diferente del fermento probiótico en la fracción de NS-PTA según la metodología de adición. Las concentraciones de las bacterias probióticas fueron similares en ambos tipos de quesos experimentales, por lo que la mayor influencia de los fermentos agregados luego de la incubación sería solamente atribuible al tipo de inoculación. Si bien no se realizó una curva de crecimiento de las cepas ensayadas, indudablemente las bacterias preincubadas y las que fueron incorporadas directamente liofilizadas se encontraban en diferente estado fisiológico en el momento de su agregado al queso. En este sentido, Williams y col. (2002) verificaron que la fase y la velocidad de crecimiento de una cepa de *L. rhamnosus* influyeron en su producción de aminopeptidasas, siendo menor la misma en cultivos en fase estacionaria tardía o con baja velocidad de crecimiento. De la misma manera, Habibi-Najafi y Lee (1994) observaron que la máxima actividad de dos peptidasas específicas de prolina en cepas de *L. casei* se produjo en la fase logarítmica tardía de crecimiento. Estos autores también establecen que cuando el cultivo entra en la fase de muerte celular, las bacterias pueden lisar y liberar las enzimas intracelulares al medio, con lo cual se produce un incremento en la actividad enzimática.

Por otro lado, se conoce que la composición del medio de crecimiento influye sobre la producción de enzimas del sistema proteolítico de distintas bacterias lácticas. En este sentido, se ha verificado que un medio con alta disponibilidad de aminoácidos, y sobre todo de péptidos pequeños conduce a una menor producción de enzimas proteolíticas y peptidolíticas en *Lactococcus lactis* que un medio pobre en estos compuestos. Esta regulación ha demostrado ser cepa-dependiente (Meijer y col., 1996, Monnet y Gripon, 1997, Savijoki y col., 2006). Los mecanismos de control del sistema proteolítico en lactobacilos han sido menos estudiados. Sin embargo, se han encontrado resultados similares a los mencionados para los lactococos en algunas cepas de *L. helveticus*, *L. delbrueckii* y *L. casei* (Gilbert y col., 1997, Hébert y col., 2000, Savijoki y

col., 2006). Los resultados obtenidos para *L. acidophilus* C, sugieren que la producción de peptidasas por esta cepa pudo haber sido modificada por las condiciones ambientales de desarrollo. La composición de proteínas del SLG fue de 5,2%, menor que el contenido en el queso, de alrededor de 22,0%. Si bien no se analizó el contenido de nitrógeno en fracciones solubles del SLG, es un hecho conocido que la concentración de aminoácidos y péptidos pequeños en la leche, fuente de compuestos proteicos del sustrato, es baja. Por el contrario, en el queso, estos compuestos aumentan durante la maduración, como consecuencia del proceso de proteólisis. De este modo, el SLG representó un medio más escaso en nutrientes nitrogenados de pequeño peso molecular para *L. acidophilus* C, conduciendo eventualmente a una mayor actividad de enzimas proteolíticas y peptidolíticas.

En un trabajo previo se ha observado un incremento del contenido de NS-PTA en queso Gouda y en queso de cabra con *Bifidobacterium* sp. Bo y *L. acidophilus* Ki con respecto al queso control sin probióticos (Gomes y col., 1995, Gomes y Malcata, 1998). Asimismo, Ong y col. (2006 y 2007) han verificado un aumento del NS-PTA en quesos Cheddar con diferentes probióticos adicionados, tanto en forma individual como conjunta (3 cepas). En este último caso, las diferencias se presentaron luego de cuatro meses de maduración, y en el caso de la utilización de las cepas individuales, las bifidobacterias ocasionaron el mayor incremento, por comparación con las cepas del grupo de *L. casei* y *L. acidophilus*. Como se discutió en el caso del NS-pH 4,6, las mismas cepas ensayadas en el presente trabajo, no modificaron el nivel de NS-PTA en queso Pategrás, probablemente como consecuencia del menor tiempo de maduración y otros factores asociados a la matriz alimentaria utilizada.

#### **4.2- Perfiles peptídicos**

La cromatografía líquida en fase reversa (HPLC-RP) permite separar péptidos o grupos de péptidos según su afinidad con la fase estacionaria de la columna, dando lugar a los característicos perfiles o mapas peptídicos. Estos perfiles generalmente se consideran una “huella digital” del proceso proteolítico que tiene lugar en el queso durante la maduración, ya que representan la complejidad de los productos de degradación y la especificidad de las enzimas involucradas (Pripp y col., 2000). La comparación de los cromatogramas obtenidos es una herramienta de gran utilidad para detectar la influencia de diversos factores sobre la proteólisis. Esta comparación era realizada únicamente en forma visual, hasta que se generalizó la aplicación de técnicas

estadísticas multivariantes para un análisis más objetivo de los datos (Pripp y col., 1999). Entre ellas, el análisis por componentes principales (ACP) ha demostrado ser una técnica de gran potencial para el estudio de los perfiles peptídicos con distintas finalidades: diferenciar quesos según su variedad o su tiempo de maduración, analizar la influencia del proceso de elaboración, el uso de leches con distintos tratamientos, el agregado de diferentes fermentos primarios o adjuntos, etc. (Pripp y col., 1999 y 2000, Hynes y col., 2003b, Poveda y col., 2003, Hannon y col., 2004, Coker y col., 2005).

La selección de variables para el ACP es una tarea fundamental ya que impacta directamente en la calidad de los resultados obtenidos. Un requisito del análisis es que las variables estén altamente correlacionadas (Hair y col., 1999, Coker y col., 2005). Asimismo, no deben ser incluidas variables en forma indiscriminada, ya que un número elevado puede significar una relación muestras/variables inadecuada, conduciendo a la sobreestimación del sistema. Si bien el ACP es utilizado como una técnica de resumen de datos, es importante y no excluyente, aplicar una base conceptual para la selección de cualquiera de las variables analizadas (Hair y col., 1999). En la bibliografía se han encontrado diversos métodos propuestos y/o utilizados para la selección de variables, entre los que se encuentran:

- División del cromatograma en intervalos, utilizando como variables la sumatoria de las áreas de los picos en cada intervalo (Noël y col., 1998, Pripp y col., 2006b),
- Selección visual de todos los picos existentes en el cromatograma (Pripp y col., 1999, Poveda y col., 2003, Fallico y col., 2004),
- Utilización del valor de absorbancia a intervalos cortos y definidos de tiempo, como variables para el ACP (Pripp y col., 2006a),
- Selección visual de algunos picos de los cromatogramas (Pripp y col., 2000, Saldo y col., 2002, Hynes y col., 2003b),
- Utilización de una metodología de pre-reducción de datos denominada “fuzzy approach” para procesar objetivamente los perfiles cromatográficos y obtener un número de variables para la aplicación del ACP menor que el número total de los picos del cromatograma. En esta metodología, el cromatograma es dividido en clases de tiempo de retención de acuerdo a una función, dentro de cada una de las cuales cada pico tiene un determinado impacto de acuerdo a su distancia al centro del intervalo, al número de clases definidas y al parámetro de la forma de la función logística ( $a$ ). Este último parámetro depende de otros dos valores, que son definidos por el operador: FR

(flat range) que es un rango definido alrededor de cada clase, y MFR (membership in the flat range) que es el peso mínimo para un pico cuando se encuentra a una distancia específica (que depende del FR) del centro de la clase. La aplicación para procesar los cromatogramas de acuerdo a este método está diseñada de tal manera que tiene en cuenta las variaciones que se producen en el tiempo de retención de los distintos cromatogramas (Piraino y col., 2004, Rossano y col., 2005).

Revisando los distintos trabajos publicados, se observa que en numerosas ocasiones no se han tenido en cuenta conceptos teóricos del análisis factorial. Por ejemplo, es muy común la inclusión indiscriminada de gran cantidad de variables en el análisis de muy pocas muestras, conduciendo a una relación inadecuada muestras/variables, lo que, además, aumenta la probabilidad de que las variables no estén correlacionadas. Por otro lado, la aplicación desarrollada por Piraino y col. (2004) para la pre-reducción de los perfiles peptídicos resulta una interesante alternativa, y fue evaluada para el análisis de los cromatogramas de algunos ensayos de esta tesis. Sin embargo, luego de una serie de pruebas, no fue adoptada para el análisis de los resultados, debido a distintos inconvenientes: en todos los casos, se extraía un mayor número de componentes principales que con la metodología finalmente seleccionada, y en general, la variancia extraída por el primer componente principal no se correspondía conceptualmente con ninguna de las fuentes de variación estudiadas. La mayoría de las correlaciones entre las variables no eran significativas, sobre todo cuando se utilizaba un número elevado de clases de tiempo de retención, y los resultados eran diferentes de acuerdo a los parámetros seleccionados, principalmente el número de intervalos, aunque también influían los parámetros FR y MFR. De este modo, la objetividad del método para la selección de variables se veía disminuida por el impacto verificado de dichos parámetros, que son seleccionados por el operador. Probablemente, se deban profundizar los estudios para establecer cuáles son los valores de los parámetros que se deben seleccionar para obtener los mejores resultados, y tomar criterios que permitan garantizar el uso de la aplicación en forma reproducible. Además, tanto en este método como en el método en el que se divide el cromatograma en intervalos de tiempo de retención se corre el riesgo de incluir juntos dos picos que presentan comportamientos opuestos, y de este modo la influencia de estos picos se contrarrestaría o distorsionaría. En estos mismos métodos, también se encuentra el problema de incluir zonas del cromatograma donde se presentan picos muy pequeños o picos que no son

reproducibles de un cromatograma a otro, volviendo a la desventaja de incorporar variables irrelevantes que pueden afectar negativamente el resultado obtenido.

De esta manera, luego de un estudio preliminar exhaustivo para determinar la metodología de análisis de los perfiles peptídicos se decidió aplicar un ACP a un conjunto de picos seleccionados visualmente en los cromatogramas, que mostraban la mayor variación entre los perfiles en cada ensayo. El número de picos seleccionados se limitó, en todo momento, a una cantidad menor que el número de muestras y, además, se verificó que las variables (picos) presentaran altas correlaciones y que la solución obtenida en el ACP explicara un alto porcentaje de la variancia de dichas variables.

En todos los ensayos, se detectó que la fuente de variación de mayor impacto fue el tiempo de maduración, variabilidad extraída por el primer CP. En particular, resultó más notorio el agrupamiento de las muestras de menor tiempo de maduración (3 días) con respecto a aquellas de la mitad o el final del período de maduración, 30 y 60 días respectivamente. Las muestras de 3 días de todos los tipos de quesos fueron muy similares, mostrando una variabilidad mucho menor que las muestras de 30 y 60 días, que evidenciaron mayor dispersión. Estos resultados no resultan sorprendentes, ya que en los quesos muy jóvenes, el nivel de proteólisis es generalmente bajo y bastante parecido en todos los quesos. En efecto, en la primera etapa de la proteólisis que ocurre en quesos semiduros, es la quimosina la principal responsable de la producción de péptidos (Zalazar y col., 1999), la cual se encuentra en similar proporción en todos los tipos de queso elaborados en esta tesis. Con el paso del tiempo de maduración, empiezan a jugar un papel más importante otros sistemas proteolíticos, especialmente del fermento primario y adjunto (Zalazar y col., 1999, Sousa y col., 2001, McSweeney, 2004b), lo que explica la mayor heterogeneidad entre las diferentes réplicas de elaboración y entre los diferentes quesos según el nivel de actividad proteolítica en los mismos. En forma similar, otros autores también han verificado una distribución de las puntuaciones de muestras generadas por perfiles peptídicos de quesos según el tiempo de maduración a lo largo del eje del CP1 y un incremento en la dispersión de las mismas a mayor tiempo de maduración (Hynes y col., 2003b, Verdini y col., 2004, Sihufe y col., 2005).

Además del tiempo de maduración, en algunos de los ensayos se detectó una segunda fuente de variación importante, que fue el agregado del fermento probiótico y/o la metodología de agregado del mismo. Esta variación fue extraída principalmente por el CP2, aunque en algunas ocasiones también el CP1 explicó parte de esta variabilidad.

En forma similar a los resultados del fraccionamiento nitrogenado, el mayor impacto y por ende las mejores agrupaciones entre los diferentes quesos en el ACP fueron demostradas para los ensayos individuales en los cuales estaba presente una cepa de *L. acidophilus* (ensayos 1, 3 y 5), y también para el ensayo 8, en el cual estaba incluida una cepa de esta especie. Asimismo, una influencia notoria fue detectada en el ensayo 6 con *L. casei*, mientras que *L. paracasei* y *L. rhamnosus* generaron una menor contribución a los perfiles peptídicos, que solamente fue evidente al final de la maduración. Finalmente, *B. lactis* no demostró ninguna contribución a los mapas de péptidos.

En los gráficos obtenidos a partir del análisis multivariante, se observó que los quesos experimentales elaborados con las cepas de *L. acidophilus* A y B, se agruparon por separado con respecto a los quesos testigos, independientemente de la forma de agregado del fermento probiótico. En ambos ensayos, se detectaron picos característicos de cada tipo de queso, testigos y experimentales. De este modo, cada cepa demostró la presencia de una actividad proteolítica y peptidolítica específica, que se diferenció y complementó la actividad del fermento primario. Asimismo, la actividad de las enzimas del sistema proteolítico de estas cepas en los quesos no resultó afectada por el estado fisiológico celular ni por el diferente medio de crecimiento.

Por el contrario, la cepa de *L. acidophilus* C utilizada en forma individual (ensayo 5), demostró una influencia en los perfiles peptídicos bastante más marcada cuando fue incorporada luego de una preincubación que directamente liofilizada. Con esta última técnica de adición, si bien se encontró cierto impacto en los perfiles peptídicos, éste fue mucho menor que al agregar los probióticos en el sustrato lácteo graso. Resultados similares se observaron en el ensayo 8, con el fermento probiótico mixto que incluía la cepa de *L. acidophilus* C. Por un lado, la distribución de los diferentes tipos de quesos en el gráfico de los *scores* fue prácticamente idéntica en ambos ensayos. Por otro lado, se detectó que el fermento probiótico agregado luego de la preincubación generó en los quesos E2 de ambos ensayos, un mayor nivel de ciertos picos, específicamente **f**, **g** y **ñ**. Asimismo, otros dos picos similares (**a** y **b**) demostraron en ambos ensayos un incremento similar durante la maduración, principalmente en los quesos experimentales E1 y E2 de ambos ensayos. Teniendo en cuenta estos resultados y, dado que en los ensayos con *L. paracasei* y *B. lactis* evaluados individualmente se comprobó que su contribución a la formación de péptidos solubles era irrelevante, es altamente probable que la influencia del fermento probiótico detectada en los perfiles peptídicos de los

quesos experimentales del ensayo 8 se deba casi exclusivamente a la acción de proteasas y peptidasas específicas de *L. acidophilus* C. Similar conclusión puede extraerse de los resultados obtenidos en el fraccionamiento nitrogenado. Asimismo, los conceptos discutidos en la sección correspondiente al fraccionamiento nitrogenado también se aplican a las diferencias detectadas por el ACP en los mapas peptídicos: tanto el diferente estado fisiológico celular de los probióticos al momento de su agregado a la leche de elaboración, como la composición del medio de crecimiento podrían ser el origen de los cambios observados en el impacto del fermento probiótico sobre los perfiles peptídicos según la metodología de inoculación (Habibi-Najafi y Lee, 1994, Gilbert y col., 1997, Williams y col., 2002, Savijoki y col., 2006).

Morea y col. (2006) observaron perfiles peptídicos muy similares en quesos Caciocavallo Pugliese con y sin fermentos adjuntos al inicio de la maduración, reconociendo que la proteólisis ocurre en forma gradual, por lo que no podrían ser observadas diferencias en la proteólisis en las primeras fases de este período. Sin embargo, por el contrario, en este trabajo de tesis fue posible detectar la influencia de las cepas de *L. acidophilus* ensayadas en los perfiles peptídicos de quesos desde etapas muy tempranas de la maduración.

La cepa de *L. casei* también demostró una contribución importante en los perfiles peptídicos de los quesos experimentales del ensayo 6, independiente de la forma de agregado. Estos resultados sugieren la presencia de una actividad proteolítica y peptidolítica de esta cepa en los quesos, que generó diferencias en el nivel de ciertos péptidos presentes.

El impacto demostrado en los perfiles peptídicos por parte de los fermentos probióticos puede ser atribuido no solamente a una mayor cantidad de proteasas y peptidasas aportadas por los mismos, sino también a diferencias en los sistemas de transporte de péptidos a través de la membrana celular, que pueden influir en la utilización de los péptidos presentes. En efecto, Picon y col. (2005) verificaron diferencias en los perfiles peptídicos de quesos elaborados con fermentos, que diferían solamente en el sistema de transporte de oligopéptidos (Opp) a través de una mutación puntual.

*L. paracasei* y *L. rhamnosus* demostraron una leve contribución a los perfiles peptídicos, que fue notoria solamente al final de la maduración. El impacto de ambos cultivos fue diferente, ya que en el ensayo 2 con *L. paracasei* los quesos experimentales de 60 días se diferenciaron del resto de las muestras de quesos experimentales de 30

días y testigos de 30 y 60 días, mientras que en el ensayo 7 con *L. rhamnosus* fueron los quesos testigos de 60 días que se agruparon en forma separada del resto. Esta observación refleja el hecho de que los equipos enzimáticos en cada cepa que se ponen en juego durante la maduración de los quesos son diferentes, originando cambios en el proceso de proteólisis.

En el ensayo con *B. lactis*, en el cual no se observó influencia de esta cepa sobre los perfiles peptídicos, se detectaron picos característicos de las muestras de 30 o 60 días (agrupadas en lados opuestos del eje del CP2), lo que refleja probablemente las diferencias en cuanto a su velocidad de producción durante la maduración. En forma similar, Verdini y col. (2004 y 2005) también comprobaron la separación de muestras de acuerdo al tiempo de maduración a lo largo del eje del CP1, mientras que la diferenciación a lo largo del eje del CP2 fue debida principalmente a diferentes velocidades de producción de ciertos péptidos. Se observó, en general, que las muestras de 30 días fueron caracterizadas por los picos más hidrofóbicos, mientras que los menos hidrofóbicos fueron importantes al final de la maduración. Durante la maduración de un queso, pueden producirse péptidos hidrofóbicos, los cuales tienen sabor amargo e influyen negativamente en el *flavour* del producto (Grippon, 1994, Monnet y Grippon, 1997). Una sobreproducción de péptidos amargos o una pobre degradación de los mismos por parte de peptidasas microbianas puede inducir el defecto de sabor amargo en quesos por la falta de un balance adecuado entre proteólisis y peptidólisis (McSweeney, 1997, Fox, 2003, Fallico y col., 2004). En todos los quesos Pategrás elaborados en el ensayo con *B. lactis*, los resultados obtenidos indican que la concentración de péptidos hidrofóbicos disminuye hacia el final de la maduración, favoreciendo la obtención de productos libres del defecto de sabor amargo. Sin embargo, estos resultados deben complementarse con un análisis sensorial de los quesos. Asimismo, en el ensayo con *L. rhamnosus* se obtuvieron similares resultados que en el ensayo con *B. lactis* con respecto a los picos característicos de cada período de maduración. Para otros tipos de quesos, también se ha detectado que durante el proceso de maduración se produce una disminución de la relación entre péptidos hidrofóbicos y péptidos hidrofílicos (Saldo y col., 2002, Picon y col., 2005, Morea y col., 2006).

En los ensayos en que se detectó una influencia notoria del fermento probiótico, se observó que, en general, los péptidos más hidrofóbicos eran más característicos de los quesos testigos (j, p, s, y), mientras que los picos de mayor importancia en los quesos experimentales fueron, siempre en líneas generales, los menos hidrofóbicos (a, b, d, f, g,

k, ñ). Estos resultados son de gran importancia ya que indican que algunas de las cepas probióticas incorporadas podrían disminuir la proporción de péptidos hidrofóbicos en los quesos, influyendo probablemente en forma positiva en el *flavour* del producto. En este sentido, en diferentes estudios se han encontrado enzimas peptidolíticas capaces de degradar péptidos amargos en cepas de lactobacilos (Arora y Lee, 1990, Peterson y col., 1990, Macedo y col., 2000, Martínez-Cuesta y col., 2001).

El fraccionamiento nitrogenado es una metodología de análisis no específica, que refleja principalmente el grado de avance de la proteólisis, mientras que el análisis de los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC es una técnica con mayor especificidad, que expresa mejor la complejidad de este proceso durante la maduración (Ardö, 1999). Asimismo, Sousa y col. (2001) recomiendan esta última metodología, junto con el análisis de los AAL, para el estudio de la influencia de diferentes starters o del agregado de fermentos adjuntos sobre la proteólisis. En el presente trabajo se observó un mayor nivel global de péptidos pequeños y AAL en los quesos experimentales de algunos ensayos mediante el análisis del nivel de nitrógeno en distintas fracciones solubles. Por otro lado, en el análisis multivariante de los perfiles peptídicos, se pudo verificar la influencia específica de los fermentos probióticos incorporados en el nivel de ciertos péptidos presentes, produciendo tanto disminuciones o aumentos en el contenido de los mismos. Aún en el caso en que no se detectaron diferencias significativas en el nivel de NS-PTA (ensayo 6), sí se observaron agrupaciones según el tipo de queso en el gráfico de los *scores* en el ACP de los perfiles peptídicos. Es decir, si bien el nivel global de péptidos pequeños y AAL fue bastante similar, se verificaron diferencias en la calidad de péptidos presentes.

Gardiner y col. (1998) y McBrearty y col. (2001) han estudiado los perfiles peptídicos del NS-pH 4,6 de quesos Cheddar con bacterias probióticas incorporadas mediante HPLC de exclusión molecular. Estos autores no detectaron ningún cambio en dichos perfiles atribuible a los probióticos agregados, concluyendo que los mismos no tuvieron influencia en la proteólisis. Por otro lado, Daigle y col. (1999) describieron mediante RP-HPLC la fracción insoluble en agua de quesos Cheddar con y sin bifidobacterias, detectando una mayor hidrólisis de  $\alpha_{s1}$ -caseína en los quesos probióticos. Finalmente, Corbo y col. (2001) estudiaron los perfiles peptídicos de la fracción de NS-pH 4,6 por RP-FPLC (Reversed-Phase-Fast-Protein Liquid Chromatography), y verificaron una mayor complejidad en los mapas peptídicos de quesos Cheddar con bifidobacterias que en los controles. Los trabajos anteriormente

citados constituyen los únicos estudios publicados en los que se investigó la influencia de los probióticos en los perfiles peptídicos de quesos, y representan una muy escasa proporción del total de información existente sobre quesos probióticos. En ningún caso se aplicó un análisis multivariante a los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC. De esta manera, en el presente trabajo se describió por primera vez el impacto de las bacterias probióticas en los perfiles peptídicos del queso utilizando un ACP, lo que permitió detectar la contribución específica a la producción o hidrólisis de determinados péptidos por los fermentos probióticos incorporados. Asimismo, la herramienta estadística probablemente favoreció la detección de pequeñas diferencias entre perfiles, que la comparación visual de numerosos cromatogramas hace virtualmente imposible.

Sin embargo, es importante destacar que si bien el ACP a perfiles peptídicos de quesos no ha sido utilizado con anterioridad para el estudio de quesos probióticos, sí fue aplicado en otros quesos para el estudio de la influencia de diversos fermentos primarios u otros fermentos adjuntos incorporados. Pripp y col. (1999) estudiaron los perfiles peptídicos de quesos Cheddar miniatura elaborados con diferentes cepas de lactococos por ACP. Estos autores pudieron comprobar una influencia diferente de varias cepas a través de las agrupaciones observadas en el gráfico de los *scores*, que fue similar a los 2 y a los 4 meses de maduración. Similares resultados fueron obtenidos por Pripp y col. (2000) al ensayar las mismas cepas en soluciones de caseinato de sodio bajo condiciones parecidas al queso. Las diferencias detectadas entre las diferentes cepas en estos trabajos fueron atribuidas a diferentes sistemas proteolíticos característicos de cada una de ellas.

Por otro lado, Poveda y col. (2003) también observaron un impacto diferente en los perfiles peptídicos de distintos starters utilizados para la elaboración de queso Manchego, a través de un ACP de las muestras a los 90 días de maduración. Cuando este análisis fue aplicado a las muestras a diversos tiempos de maduración (15, 45, 90 y 150 días), las mismas se distribuyeron según esta variable.

Asimismo, Hannon y col. (2004) evaluaron la influencia de diferentes fermentos de superficie en la maduración de queso Tilsit a través de un ACP de los perfiles peptídicos. Estos autores observaron la agrupación de las muestras por tiempo de maduración (principalmente a lo largo del eje del CP1), por muestra (superficial o central del queso) y por tipo de starters (principalmente a lo largo del eje del CP2). Estos resultados fueron similares a los obtenidos en este trabajo, en los que se observa que, al analizar en forma conjunta quesos de diferente tiempo de maduración y alguna

otra variable, la primera es la que demuestra un mayor impacto en los perfiles peptídicos.

#### 4.3- Aminoácidos libres

El contenido de aminoácidos libres en el queso es el resultado del balance entre su producción a partir de proteínas y péptidos, y su posterior degradación a una gran variedad de compuestos de sabor y aroma (Sousa y col., 2001). Por lo tanto, el nivel de AAL a cada momento durante la maduración del queso es determinado por una compleja serie de reacciones en la que participan diferentes enzimas que se encuentran en distintas concentraciones y cuya actividad es a su vez influida por las condiciones ambientales del producto. Esta gran variabilidad, asociada a la elevada precisión de la determinación analítica, explica las desviaciones estándar relativamente altas obtenidas para algunos AAL en las diferentes réplicas de cada ensayo. En otros trabajos que incluyen la determinación de AAL en quesos, también se observa una gran variabilidad y desviaciones estándar (Tavaria y col., 2003, Pripp y col., 2006a, Poveda y col., 2004b, Picon y col., 2007).

Las enzimas bacterianas son las principales responsables de la liberación de AAL en el queso, y también de su subsiguiente degradación (Visser, 1977, Rank y col., 1985, McSweeney, 2004a). Como ya ha sido citado, tanto bacterias pertenecientes al fermento primario como a fermentos adjuntos, en general lactobacilos, han manifestado una contribución significativa a la producción de AAL en el queso (Lane y Fox, 1995, Lynch y col., 1996, 1997 y 1999, Hynes y col., 2001 y 2003a y c, entre otros).

En forma similar a los resultados obtenidos en el fraccionamiento nitrogenado y los perfiles peptídicos, se evidenció un impacto significativo del fermento probiótico en el perfil de AAL y en la cantidad de AAL totales en los ensayos en los que se utilizó una cepa de *L. acidophilus*, así como en el último ensayo, en el cual había una de estas cepas, y también en el ensayo con *L. casei*. En los ensayos con *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, el efecto observado fue pequeño, y por último *B. lactis* no demostró ninguna contribución en este índice de proteólisis secundaria.

En los ensayos 1 y 3, en los que se utilizaron las cepas *L. acidophilus* A y B, respectivamente, se observó una influencia similar del fermento probiótico, ya sea agregado directamente o luego de una preincubación, en la concentración de la mayoría de los AAL y para el contenido total de AAL, que demostraron un incremento significativo en ambos quesos probióticos. Por el contrario, en los ensayos 5 y 8, en los

que se utilizó *L. acidophilus* C, en forma individual o en el fermento mixto, respectivamente, la mayor contribución al incremento de los niveles de AAL fue evidenciada por el fermento probiótico cuando se agregó luego de una preincubación. Estos resultados son similares a los obtenidos para el NS-PTA y perfiles peptídicos.

La cepa de *L. acidophilus* B fue la que produjo el mayor incremento en la cantidad de AAL totales en ambos quesos experimentales con respecto a los quesos testigo. Esta mayor diferencia puede deberse a un equipo enzimático más potente de esta cepa con respecto a las otras, sumado a que en este caso se utilizó una menor dosis de fermento primario. En efecto, el contenido total de AAL de los quesos testigo de este ensayo fue inferior al de los demás quesos testigos.

Entre los estudios disponibles sobre quesos probióticos, no existen datos sobre perfiles de AAL en quesos con cepas de *L. acidophilus*. En algunos casos, se estudió el NS-PTA como un índice de los AAL totales, resultados que ya fueron discutidos previamente.

Por otro lado, el perfil enzimático de diferentes cepas de *L. acidophilus* ha sido caracterizado en varios trabajos, que verificaron la presencia de un rango variado de peptidasas, como amino, di y tripeptidasas, así como peptidasas específicas de prolina (Khalid y Marth, 1990a, Shihata y Shah, 2000, Upadhyay y col., 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la acción, durante la maduración de los quesos, de varias enzimas peptidolíticas liberadas por las diferentes cepas de *L. acidophilus* ensayadas. Los aminoácidos que mostraron mayor variación en cada ensayo cambiaron según la cepa ensayada, probablemente reflejando distintos equipos enzimáticos, pero, en general, Ile, Glu, His, Pro y Lys fueron los AAL que manifestaron el mayor cambio en los ensayos con *L. acidophilus*. Estos aminoácidos tienen diferentes propiedades y son hidrolizados desde sus péptidos de origen por distintas peptidasas. Así, la prolina, por su estructura cíclica característica, modifica la cadena polipeptídica y requiere enzimas específicas para la degradación de los enlaces que involucran sus residuos. Por otro lado, existen di y tripeptidasas de amplia especificidad, y aminopeptidasas que hidrolizan preferencialmente algunos residuos de aminoácidos según sus características (ácidos, básicos, hidrofóbicos, aromáticos, etc.) (Christensen y col., 1999, Upadhyay y col., 2004, Savijoki y col., 2006).

Al contrario de lo observado en el nivel de NS-PTA, pero en forma similar a los resultados de los perfiles peptídicos, una de las cepas del grupo de *L. casei* mostró una influencia significativa sobre las cantidades de algunos AAL y el contenido total de los

mismos. En este caso, a los 3 días se observó una influencia diferente del fermento probiótico según la metodología de agregado, pero a los 60 días, en general, el efecto fue similar para ambos tipos de quesos probióticos. La discrepancia entre los resultados de NS-PTA y AAL puede deberse a que la fracción soluble también contiene péptidos pequeños, y además no incluye aminoácidos dibásicos como arginina, lisina y ornitina (Ardö, 1999). De todos modos, cabe aclarar que el contenido de NS-PTA, a pesar de no presentar diferencias significativas en el ensayo con *L. casei*, exhibió valores numéricamente mayores en ambos quesos experimentales durante la maduración. Los AAL que mostraron más variación en los quesos con *L. casei* fueron Glu e Ile, al igual que con las cepas de *L. acidophilus*, y Asp, Gly y Tir.

Por otro lado, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, en los ensayos 2 y 7, respectivamente, evidenciaron una muy leve influencia, solamente en el nivel de unos pocos AAL, siendo similar el contenido total de AAL entre los diferentes quesos.

Varios autores han observado la presencia de una amplia variedad de peptidasas en cepas del grupo de *L. casei*, y algunos han demostrado que existen diferencias entre cepas (Arora y Lee, 1990, Peterson y col., 1990, Habibi-Najabi y Lee, 1994, Macedo y col., 2000, DiCagno y col., 2006).

En dos trabajos sobre quesos Cheddar con la adición de cepas probióticas de *L. paracasei*, se ha analizado el perfil de AAL y el contenido total de los mismos (Gardiner y col., 1998, Stanton y col., 1998). En dichos trabajos, se observó un incremento de la concentración total de AAL, y un aumento de ciertos AAL, principalmente Glu, Met, Leu, Lys y Val. Con excepción de Glu, que fue uno de los AAL que mostraron mayor variación en el ensayo con *L. casei* de la presente tesis, los otros fueron diferentes de los reportados por Gardiner y col. (1998) y Stanton y col. (1998). Nuevamente, se observa que los resultados son cepa-dependientes, además de influir las condiciones ambientales determinadas por la matriz alimentaria. También es importante destacar que el fermento primario fue diferente en este trabajo que en los dos casos analizados, lo cual también genera niveles diferentes de comparación con los niveles de AAL de los quesos testigo.

Además de los datos informados sobre quesos probióticos, varias cepas del grupo de *L. casei* se han ensayado frecuentemente como fermentos adjuntos en diferentes modelos de queso, con el principal objetivo de mejorar las características organolépticas de los productos. En varios de estos trabajos, también se ha verificado una influencia significativa en el perfil y contenido de los AAL, produciendo un incremento en sus

niveles (Lynch y col., 1996, y 1997, Madkor y col., 2000b, Hynes y col., 2003a y c, Michaelidou y col., 2003, DiCagno y col., 2006, entre otros).

Finalmente, la cepa de *B. lactis* ensayada en este trabajo no produjo ningún efecto sobre los AAL. En forma similar, Corbo y col. (2001) verificaron que la adición de dos cepas probióticas de bifidobacterias, ya sea en forma individual o conjunta, no modificó ni el perfil de AAL ni el nivel total de los mismos en queso Canestrato Pugliese. Si bien su bajo crecimiento en leche ha sido atribuido a una escasa actividad proteolítica (Boylston y col., 2004), lo que ha sido verificado para varias cepas (Shihata y Shah, 2000), se han detectado niveles elevados de varias peptidasas en algunas especies de bifidobacterias (Desjardins y col., 1990a, Shihata y Shah, 2000). En este sentido, Gobbetti y col. (1998) verificaron una mayor cantidad de peptidasas en los extractos de quesos Cheddar con bifidobacterias incorporadas, y McBrearty y col. (2001) observaron una mayor cantidad de AAL y totales en el mismo tipo de queso con agregado de otras cepas de bifidobacterias.

Los resultados completos de los AAL, fueron volcados en un análisis por componentes principales que permitió la comparación simultánea de todos los quesos obtenidos en los ocho ensayos. A través de dicho análisis, se confirmó que las cepas de *L. acidophilus* y la cepa de *L. casei* ejercieron una mayor influencia en el perfil de AAL de los quesos probióticos. Entre los trabajos existentes sobre el tema, no se ha informado la utilización de este tipo de método multivariante para evaluar la influencia de las bacterias probióticas en los AAL. Sin embargo, en algunos estudios se ha aplicado ACP para evaluar el contenido de AAL, con otras finalidades. Por ejemplo, Hannon y col. (2003) aplicaron ACP al contenido de AAL de tres quesos Cheddar elaborados con diferentes starters primarios, y observaron que las muestras se agruparon principalmente según el fermento utilizado, y en menor medida según el tiempo de maduración. En forma similar, Pripp y col. (1999) detectaron el agrupamiento de muestras de quesos según el starter utilizado en un ACP de los AAL de queso Cheddar. Por el contrario, Poveda y col. (2004a) estudiaron mediante esta metodología el contenido de AAL de tres quesos Manchego, elaborados con diferentes fermentos, y detectaron que las muestras se agruparon según el tiempo de maduración, mientras que ningún efecto se observó según el starter empleado. De la misma manera, Verdini y col. (2004) observaron la agrupación de muestras de queso Port Salut Argentino principalmente según el tiempo de maduración, y Noël y col. (1998) verificaron la

separación de queso Parmigiano Reggiano y Appenzeller según su perfil de AAL empleando la misma herramienta.

Los aminoácidos mayoritarios en los quesos elaborados en esta tesis fueron Leu, Phe, Glu, Arg y Lys. En otras variedades de quesos, como Cheddar, Edam, Emmental, Parmigiano-Reggiano y Gorgonzola, los aminoácidos Glu, Leu, Phe y Lys también se encuentran entre los 6 mayoritarios (Upadhyay y col., 2004). Asimismo, en queso Idiazábal, Vicente y col. (2001) observaron que Leu, Glu y Phe, además de Val fueron los aminoácidos que se encontraban en mayor concentración, mientras que Barcina y col. (1995) determinaron que además de los nombrados, Lys también era uno de los mayoritarios. Estos 5 aminoácidos también fueron los más importantes en queso Manchego (Poveda y col., 2004a). En queso Tilsit, un queso madurado en superficie, también se evidenció una concentración más elevada de Lys, Glu, Leu y Phe (Hannon y col., 2004). Si bien los aminoácidos mayoritarios en distintas variedades de queso son similares, sus concentraciones absolutas y relativas son diferentes.

Se ha postulado que la composición de aminoácidos del queso refleja sólo parcialmente la composición de las caseínas, debido a que no todas las regiones de sus cadenas polipeptídicas son degradadas de la misma manera, y a que la hidrólisis depende además de los agentes proteolíticos y peptidolíticos activos en cada variedad de queso. Además, los aminoácidos presentes en el queso son el resultado del balance entre su producción y su consumo durante la maduración, por la acción de diferentes enzimas microbianas (Ardö y col., 2002). En el presente trabajo, así como en los estudios citados, algunos de los aminoácidos mayoritarios en los quesos corresponden efectivamente a los que se encuentran en mayor concentración en las caseínas, como Glu, Leu y Lys. Sin embargo, otros, como Phe y Arg, no se correspondieron con los aminoácidos más representativos de estas proteínas (Walstra y col., 1999a).

La importancia de la proteólisis en el desarrollo del *flavour* del producto radica principalmente en la generación de aminoácidos, que son los principales precursores de compuestos de sabor y aroma. En efecto, durante el catabolismo de los AAL se generan compuestos como ácidos carboxílicos, ésteres, alcoholes, cetonas y tioésteres, partícipes significativos del *flavour* del queso (Yvon y Rijnen, 2001, Marilley y Casey, 2004, McSweeney, 2004b). Por su parte, la importancia directa de péptidos y aminoácidos libres en el *flavour* del producto es menor, y son solamente responsables del sabor de fondo del queso. Efectivamente, muchos de estos compuestos tienen cierto sabor: péptidos cortos e hidrofóbicos son amargos, aminoácidos como Gly, Ser, Thr, Ala y Pro

son dulces, His, Glu y Asp son ácidos y otros como Arg, Met, Val, Leu, Phe, Tyr, Ile y Trp son amargos (McSweeney, 2004b). En este sentido, Pripp y col. (2006a) han encontrado que tanto los AAL como los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC se correlacionaron con la intensidad del *flavour* de queso Cheddar.

En el presente trabajo, el proceso de proteólisis fue estudiado hasta la producción de aminoácidos libres. Una interesante continuación de este estudio radicaría en la investigación del catabolismo de estos compuestos, para profundizar la evaluación de la influencia de cada cepa probiótica en el *flavour* del queso Pategrás.