

RESULTADOS



1- Recuentos microbiológicos de los fermentos utilizados

En la tabla 7 se indican las características morfológicas de las colonias de las bacterias de los fermentos probiótico y primario, los medios de cultivo utilizados para su recuento, y la concentración de dichas bacterias en los fermentos liofilizados comerciales usados en el estudio, y en el medio de cultivo concentrado conteniendo la cepa de *L. rhamnosus*.

Tabla 7. Concentración de las bacterias de los fermentos, medios de cultivo utilizados y características morfológicas de las colonias. La incubación se realizó siempre a 37°C, en condiciones aeróbicas, excepto que se indique lo contrario.

Fermento	Concentración (UFC g ⁻¹)	Medio de cultivo	Características de las colonias
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1,4 x 10 ¹¹	APC-Leche	Colonias blancas homogéneas o con un punto más blanco en el centro, y el borde más claro.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> A	4,1 x 10 ¹⁰	MRS-agar	Colonias transparentes, muy chatas, de bordes irregulares.
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	1,7 x 10 ¹¹	MRS-agar	Colonias beige, cremosas con bordes irregulares.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> B	5,8 x 10 ¹¹	MRS-agar	Colonias beige, cremosas con borde más transparente
<i>Bifidobacterium lactis</i>	9,0 x 10 ¹⁰	MRS-agar con cloruro de litio y propionato de sodio (72 h, anaerobiosis).	Colonias puntiformes beige.

<i>Lactobacillus acidophilus</i> C	$2,1 \times 10^{11}$	MRS-agar	Colonias transparentes, chatas, de bordes irregulares.
<i>Lactobacillus casei</i>	$1,2 \times 10^{11}$	MRS-agar	Colonias beige cremosas.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (cepa INLAIN)	$3,0 \times 10^8$ en el cultivo en MRS de DO = 0,8.	MRS-agar. Microaerofilia	Colonias beige cremosas.

En el ensayo 8, en el que se utilizó un fermento probiótico mixto, el recuento de ambas cepas de lactobacilos fue llevado a cabo en MRS-agar con agregado de bilis. En este medio, las colonias de las dos cepas de lactobacilos ensayadas mostraron similar morfología macroscópica que en MRS-agar común, y fueron perfectamente diferenciables entre sí. Asimismo, en MRS-LP, además de las bifidobacterias, también desarrolló *L. paracasei*. Sus colonias mostraron características diferentes ya que resultaron redondas, cremosas y de color beige.

Las colonias de *S. thermophilus* observadas en MRS-agar fueron pequeñas, puntiformes y blancas. Por otro lado, la recuperación celular resultó de aproximadamente un orden menos en este medio. De este modo, la presencia de *S. thermophilus* no afectó el recuento de las bacterias probióticas.

Las cepas probióticas utilizadas no interfirieron en el recuento en APC-Leche de *S. thermophilus*, debido a que pudieron distinguirse fácilmente por su diferente morfología macroscópica. Las colonias de *L. acidophilus* A y C fueron chatas, de un color gris claro y difusas. *L. acidophilus* B y *L. casei* mostraron colonias cremosas, blancas y pequeñas, pero diferentes de las de *S. thermophilus*, mientras que las colonias de *L. paracasei* y *L. rhamnosus* resultaron color beige y cremosas. Por último, *B. lactis* no creció en APC-Leche en aerobiosis en las diluciones ensayadas (-7, -8 y -9).

Con respecto al recuento de *L. rhamnosus* en el caldo MRS con una densidad óptica (DO) de 0,8, el mismo alcanzó 3×10^8 UFC mL⁻¹. De esta manera, se utilizaron 150 mL de dicho cultivo para la obtención del pellet celular para inocular cada queso experimental.

2- Preparación del sustrato lácteo graso

2.1- SLG con *L. acidophilus* A, *L. paracasei*, *B. lactis*, *L. casei* y *L. rhamnosus*

Los ensayos previos a las elaboraciones de quesos destinados a optimizar la preparación del SLG, arrojaron resultados acordes con lo previsto para cinco de los ocho fermentos probióticos estudiados. En efecto, la cantidad del fermento probiótico inoculado permitió alcanzar el nivel celular deseado (5×10^7 UFC mL⁻¹) y verificar una evolución del pH y de la población probiótica adecuados y compatibles con una posterior fabricación de queso (Tabla 8).

Tabla 8. Evolución de la población probiótica y valor de pH en el sustrato lácteo graso durante la incubación y almacenamiento del mismo, en los ensayos 1, 2, 4, 6 y 7.

Ensayo <i>Cepa</i>	Determinación	Tiempo de incubación y almacenamiento (horas)				Diferencia entre 0 y 20 h
		0	2	5	20	
Ensayo 1 <i>L. acidophilus</i> A (1,2g)*	pH	6,50±0,07 ^a	6,42±0,05 ^{a,b}	6,35±0,05 ^a	6,00±0,10 ^c	- 0,50
	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	6,97±0,23 ^a	6,82±0,20 ^a	7,18±0,25 ^a	7,88±0,33 ^b	+ 0,91
Ensayo 2 <i>L. paracasei</i> (0,35g)*	pH	6,45±0,03 ^a	6,30±0,03 ^b	6,25±0,03 ^c	6,25±0,02 ^c	- 0,20
	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	7,89±0,30 ^a	8,32±0,18 ^{a,b}	8,21±0,22 ^a	8,70±0,28 ^b	+ 0,81
Ensayo 4 <i>B. lactis</i> (0,68g)*	pH	6,53±0,03 ^a	6,20±0,03 ^b	5,88±0,16 ^c	5,88±0,20 ^c	- 0,65
	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	8,01±0,21 ^a	8,06±0,14 ^a	8,21±0,18 ^a	8,15±0,13 ^a	+ 0,14
Ensayo 6 <i>L. casei</i> (0,51g)*	pH	6,58±0,06 ^a	6,47±0,08 ^a	6,22±0,07 ^b	6,10±0,06 ^b	- 0,48
	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	7,63±0,19 ^a	7,96±0,25 ^{a,b}	8,30±0,17 ^{b,c}	8,48±0,21 ^c	+ 0,85
Ensayo 7 <i>L. rhamnosus</i> (pellet de 150 mL de cultivo con DO 0,8)*	pH	6,65±0,04 ^a	6,15±0,06 ^b	6,15±0,05 ^b	6,00±0,09 ^c	- 0,65
	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	7,70±0,18 ^a	8,20±0,18 ^b	8,30±0,13 ^b	8,80±0,21 ^c	+ 1,10

* Masa de fermento utilizado para la preparación del SLG.

Se presentan los valores medios ± desviación estándar de tres determinaciones.

Diferentes superíndices en una misma hilera indican la presencia de diferencias significativas ($\alpha < 0,05$).

Todas las cepas de lactobacilos en los ensayos citados mostraron un incremento significativo en su población en el SLG de alrededor de un orden logarítmico (entre

0,81 y 1,10). Las bifidobacterias se mantuvieron viables y experimentaron un leve aumento de su concentración, pero el mismo no fue significativo.

La concentración inicial de *L. acidophilus* A fue algo menor que para el resto de los ensayos, debido a la forma de presentación de este cultivo: fraccionado en sobres individuales. De este modo, se utilizó un sobre para cada ensayo, a pesar de obtener una concentración levemente inferior, con el objetivo de priorizar un manejo aséptico del cultivo.

En cuanto a la actividad acidificante, se observó una disminución de pH entre 0,20 y 0,65. La cepa de *L. paracasei*, a pesar de haber manifestado un aumento importante de su concentración, demostró en el medio de incubación la menor capacidad acidificante. En contraste, *B. lactis*, que fue la cepa que tuvo el menor desarrollo en este medio, fue una de las que produjo mayor acidificación, junto con *L. rhamnosus*.

Por otra parte, los fermentos probióticos *L. acidophilus* B, *L. acidophilus* C, y el fermento mixto compuesto por *L. acidophilus* C, *L. paracasei* y *B. lactis*, produjeron una excesiva acidificación del SLG, lo que determinó que se redujera el inóculo inicial en el mismo. En efecto, la obtención de un modelo de queso repetitivo y reproducible es necesaria para la evaluación de los fermentos y sus actividades, y un pH muy bajo del SLG podría impactar negativamente en dicha reproducibilidad. A continuación se detallan los resultados de la optimización de la preparación del SLG para cada una de estas cepas probióticas.

2.2- SLG con *L. acidophilus* B

Se realizó una primera prueba, en la que se utilizó una cantidad de fermento que permitiera alcanzar similar concentración que en los casos anteriores. Como el recuento de este fermento fue más bajo, la masa utilizada resultó bastante mayor (9,7 g), y su total resuspensión consumió más tiempo que en los ensayos anteriores, por lo cual la medición a tiempo cero fue también retrasada. *L. acidophilus* B demostró una gran capacidad acidificante, produciendo la coagulación del sustrato en el período de incubación y almacenamiento debido a la disminución del pH hasta un valor de 4,00. Asimismo, el valor inicial de pH del SLG fue el más bajo registrado, lo que podría deberse a la demora en realizar dicha medición, tiempo en el cual los lactobacilos ya habrían empezado a fermentar la lactosa.

Teniendo en cuenta los primeros resultados, se realizó una segunda prueba utilizando una cantidad menor del fermento (un décimo de la masa original). Con esta dosis, se produjo un descenso marcado de pH hasta 5,70, mientras que la población probiótica experimentó un incremento de 0,75 órdenes logarítmicos (Tabla 9). De este modo, se decidió utilizar esta última dosis de fermento para las elaboraciones de los quesos, pero debido a la gran actividad acidificante demostrada por esta cepa, se utilizó menos concentración de fermento primario (*S. thermophilus*) que en las otras elaboraciones.

Tabla 9. Evolución de la población probiótica y valor de pH en el SLG con *L. acidophilus* B, durante la incubación y almacenamiento del mismo.

Prueba (masa fermento)	Determinación	Tiempo de incubación y almacenamiento (horas)				Diferencia entre 0 y 20 h
		0	2	5	20	
Prueba 1 * (9,7 g)	pH	6,05	5,00	4,30	4,00	- 1,95
	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	7,68	7,69	7,60	7,99	+ 0,31
Prueba 2 (1 g)	pH	6,55±0,08 ^a	6,15±0,07 ^b	5,75±0,10 ^c	5,70±0,09 ^c	- 0,85
	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	6,92±0,26 ^a	6,95±0,15 ^a	7,43±0,20 ^b	7,67±0,26 ^b	+ 0,75

* Esta prueba fue realizada una sola vez.

Se presentan los valores medios ± desviación estándar de tres determinaciones.

Diferentes superíndices en una misma hilera indican la presencia de diferencias significativas ($\alpha < 0,05$).

2.3- SLG con *L. acidophilus* C

También en este caso, se realizó una primera prueba con un inóculo de fermento en el SLG tal que se logaran 5×10^7 UFC mL⁻¹. Con esta dosis se observó un incremento moderado de la población probiótica y una disminución del pH bastante marcada. Teniendo en cuenta los primeros resultados de fabricación de quesos, se realizó una segunda prueba para ajustar la dosis. En efecto, los quesos elaborados con *L. acidophilus* A, habían resultado muy ácidos y con una textura ligeramente granulosa producto de dicha acidez, sobre todo en el caso de los quesos E2. En la segunda prueba del SLG con *L. acidophilus* C se utilizó una cantidad de fermento cinco veces menor. Con este ajuste de dosis se logró una población final en el sustrato similar a la primera prueba, y una acidificación mucho menor, y éste fue el inóculo utilizado en las elaboraciones de quesos de este ensayo (Tabla 10).

Tabla 10. Evolución de la población probiótica y valor de pH en el SLG con *L. acidophilus* C, durante la incubación y almacenamiento del mismo.

Prueba (masa fermento)	Determinación	Tiempo de incubación y almacenamiento (horas)				Diferencia entre 0 y 20 h
		0	2	5	20	
Prueba 1* (0,25g)	pH	6,52	6,25	5,95	5,85	- 0,67
	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	7,98	8,11	8,49	8,43	+ 0,45
Prueba 2 (0,05g)	pH	6,55±0,07 ^a	6,45±0,07 ^a	6,23±0,07 ^b	6,17±0,07 ^b	- 0,38
	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	7,61±0,25 ^a	7,48±0,12 ^a	7,78±0,21 ^a	8,18±0,16 ^b	+ 0,57

* Esta prueba fue realizada una sola vez.

Se presentan los valores medios ± desviación estándar de tres determinaciones.

Diferentes superíndices en una misma hilera indican la presencia de diferencias significativas ($\alpha < 0,05$).

2.4- SLG con un fermento probiótico mixto

En este último ensayo se seleccionaron tres de las cepas probióticas estudiadas en forma individual, para su uso conjunto en un fermento mixto. La selección se basó en dos criterios: en primer lugar se buscó garantizar la presencia de una cepa de cada grupo microbiano: una de *L. acidophilus*, una del grupo de *L. casei* (*L. paracasei*, *L. casei* y *L. rhamnosus*) y una bifidobacteria; y además, en segundo lugar se tuvieron en cuenta los resultados en las pruebas individuales de cada cepa, desde el punto de vista tecnológico (incubación en el SLG y de la fabricación de quesos). De esta manera, se utilizaron las cepas de *L. acidophilus* C, *L. paracasei* y *B. lactis*.

Se realizaron varias pruebas preliminares para fijar la dosis de los tres fermentos en el SLG y consecuentemente en los quesos, con el objetivo de lograr un equilibrio entre buena viabilidad y baja acidificación. Los resultados obtenidos en dichas pruebas son presentados en la tabla 11.

En un primer ensayo, se utilizaron las mismas cantidades de fermentos que se habían estudiado en forma individual. Durante la incubación y almacenamiento del SLG se observó un incremento entre 0,53 y 0,87 órdenes logarítmicos de la población de cada una de las tres cepas presentes. Asimismo, se produjo un descenso muy marcado del pH.

De esta manera, se realizó otra prueba utilizando un inóculo algo menor para cada una de las cepas. Debido a esta reducción, la disminución observada en el valor de pH fue sensiblemente menor que en la primera prueba, y similar a la obtenida para cada cepa en forma individual, lo que se consideró adecuado para el ensayo de fabricación de

quesos. Asimismo, la población de las dos cepas de lactobacilos manifestó un incremento significativo en su concentración de entre 1,16 y 1,46 órdenes logarítmicos, casi el doble del obtenido en la primera prueba. Las bifidobacterias, por el contrario, prácticamente se mantuvieron en la misma concentración.

Este último resultado condujo a una tercera prueba, utilizando los últimos niveles de inóculo para los lactobacilos y aumentando nuevamente la concentración de bifidobacterias.

En esta última prueba se obtuvo una disminución del pH, aunque no tan marcada como en el primer ensayo. Asimismo, se observó un incremento en la población de cada cepa probiótica, que fue mayor que en las pruebas anteriores, incluyendo las de cada cepa en forma individual. De este modo, se retuvo la última combinación para las elaboraciones de quesos con un fermento mixto.

Tabla 11. Evolución del valor de pH y de la población de *L. acidophilus* C, *L. paracasei* y *B. lactis* en el SLG con un fermento mixto, durante la incubación y almacenamiento del mismo.

Prueba	Determinación		Tiempo de incubación y almacenamiento (horas)				Diferencia entre 0 y 20 h
			0	2	5	20	
1**	pH		6,55	5,90	5,15	5,10	- 1,45
	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	<i>L. acidophilus</i> (0,05 g)*	7,94	8,10	8,77	8,81	+ 0,87
		<i>L. paracasei</i> (0,36 g)*	8,26	8,58	8,76	8,90	+ 0,64
		<i>B. lactis</i> (0,68 g)*	8,11	8,45	8,76	8,64	+ 0,53
2**	pH		6,52	6,38	6,02	6,25	- 0,27
	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	<i>L. acidophilus</i> (9,6 mg)*	6,23	6,75	7,26	7,69	+ 1,46
		<i>L. paracasei</i> (9 mg)*	6,40	6,81	7,46	7,56	+ 1,16
		<i>B. lactis</i> (68 mg)*	6,87	7,26	6,99	6,90	+ 0,03
3	pH		6,72±0,04 ^a	6,15±0,07 ^b	5,80±0,10 ^c	5,65±0,07 ^d	-1,07

3	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹	<i>L. acidophilus</i> (9,6 mg)*	6,08±0,25 ^a 6,75±0,12 ^b 7,48±0,15 ^c 7,98±0,13 ^d	+ 1,90
		<i>L. paracasei</i> (9 mg)*	6,68±0,14 ^a 6,88±0,13 ^a 7,51±0,17 ^b 8,15±0,09 ^c	+ 1,47
		<i>B. lactis</i> (0,68 g)*	7,71±0,14 ^a 8,26±0,23 ^b 8,18±0,16 ^b 8,26±0,16 ^b	+ 0,55

* Masa de cada fermento utilizado para la preparación del SLG.

** Estas pruebas fueron realizadas una sola vez.

Se presentan los valores medios ± desviación estándar de tres determinaciones.

Diferentes superíndices en una misma hilera indican la presencia de diferencias significativas ($\alpha < 0,05$).

3- Composición de los quesos

Las elaboraciones fueron realizadas según el plan experimental. Las medias de los valores de cada parámetro de la composición global y pH fueron comparadas mediante ANOVA de una vía para los quesos dentro de un mismo ensayo, con el objetivo de verificar que el agregado del fermento probiótico no impactaba significativamente en la composición del alimento, que por lo tanto ofrecía un medio ambiente similar para la expresión bioquímica de los probióticos. La presencia de diferencias significativas se estableció a un nivel de $\alpha < 0,05$.

La composición global, pH y el contenido de NaCl se presentan en la tabla 12.

No se encontraron diferencias significativas en el nivel de materia grasa, extracto seco, proteínas totales y NaCl entre los distintos tipos de quesos. Los valores medios para cada parámetro fueron: 28,9% de materia grasa, 55,4% de extracto seco, 21,7% de proteínas totales y 3,26% de NaCl en la humedad.

Los mayores rangos detectados entre los tres tipos de quesos en ensayos individuales fueron: 1,8% en la materia grasa (ensayo 1), 1,16% en el extracto seco (ensayo 5), 0,91% en el contenido de proteínas totales (ensayo 4), y 0,63% en el contenido de cloruro de sodio en la humedad (ensayo 3).

Tabla 12. Composición de los quesos testigo (T), experimental 1 (E1) y experimental 2 (E2) en los 8 ensayos.

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

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

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

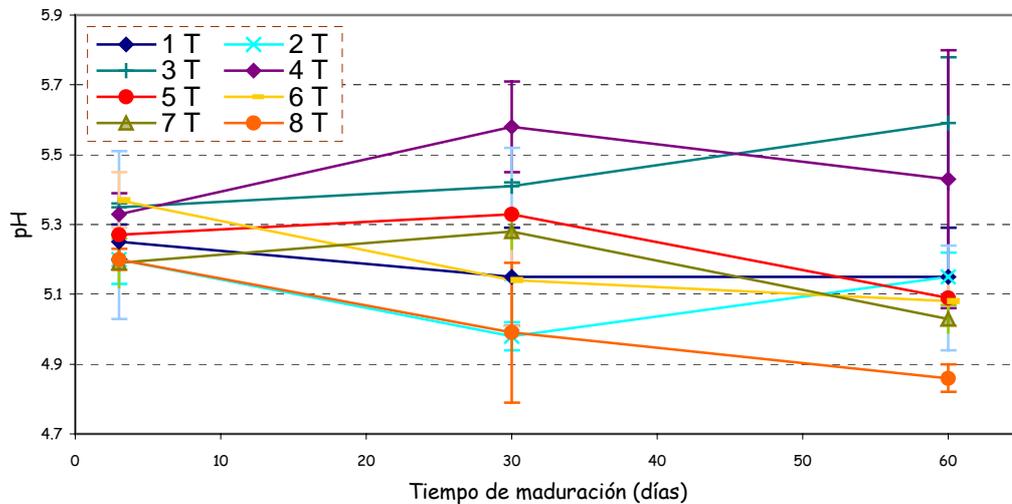
Diferentes superíndices para un parámetro para los quesos en cada ensayo, indica la presencia de diferencias significativas ($\alpha < 0,05$).

A diferencia de los parámetros anteriores, el valor de pH sí presentó diferencias significativas en algunos de los ensayos. En el ensayo 1 (*L. acidophilus* A), se detectaron diferencias significativas en el pH a los 3 días de maduración. Un test de comparación de medias (LSD) determinó la presencia de dos grupos de medias homogéneas: T/E1 y E2/E1. Asimismo, en el ensayo 3 (*L. acidophilus* B), los valores de pH fueron significativamente diferentes en las muestras a los 60 días de maduración, estableciéndose la presencia de dos grupos de medias homogéneas: T y E1/E2. Por último, en el ensayo 8 (fermento probiótico mixto), el valor de pH presentó diferencias significativas a los 3 días, y el test LSD arrojó como resultado dos grupos: T/E1 y E2. En los tres ensayos, el pH del grupo que contiene al queso E2 mostró los valores menores.

La evolución de pH durante la maduración de los quesos mostró un comportamiento variable. En general, en la mayoría de los quesos, testigo y experimentales, el pH final del queso fue menor que a los 3 días, con algunas excepciones. Entre ellas, la más importante fue en el ensayo 3 (*L. acidophilus* B), donde se observó un incremento constante de pH en los quesos T. Cabe recordar que en este ensayo se utilizó la mitad de la dosis de fermento primario, debido a la gran actividad acidificante demostrada por el cultivo probiótico durante la preparación del SLG.

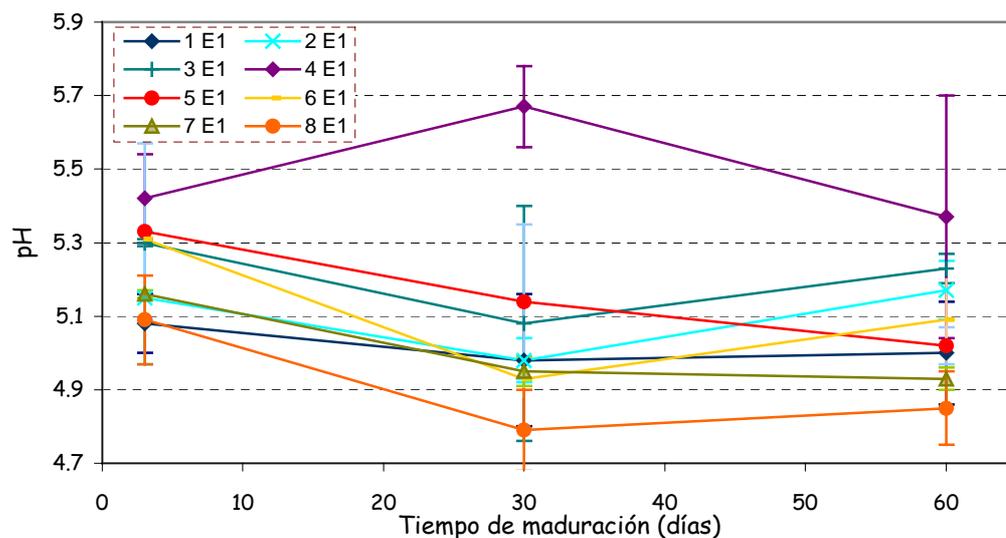
Comparando los quesos testigo elaborados en los distintos ensayos, se observó que, los valores de pH no seguían una tendencia uniforme (Figura 3). En algunos casos, hubo una disminución del pH entre 3 y 60 días de maduración, en otros un descenso inicial seguido de un aumento. En otros quesos se dio la tendencia opuesta: hubo un aumento constante o un incremento seguido de una disminución.

Figura 3. Evolución del pH en los quesos T de todos los ensayos: valores medios y desviación estándar de tres quesos (réplicas). El número indica el ensayo.



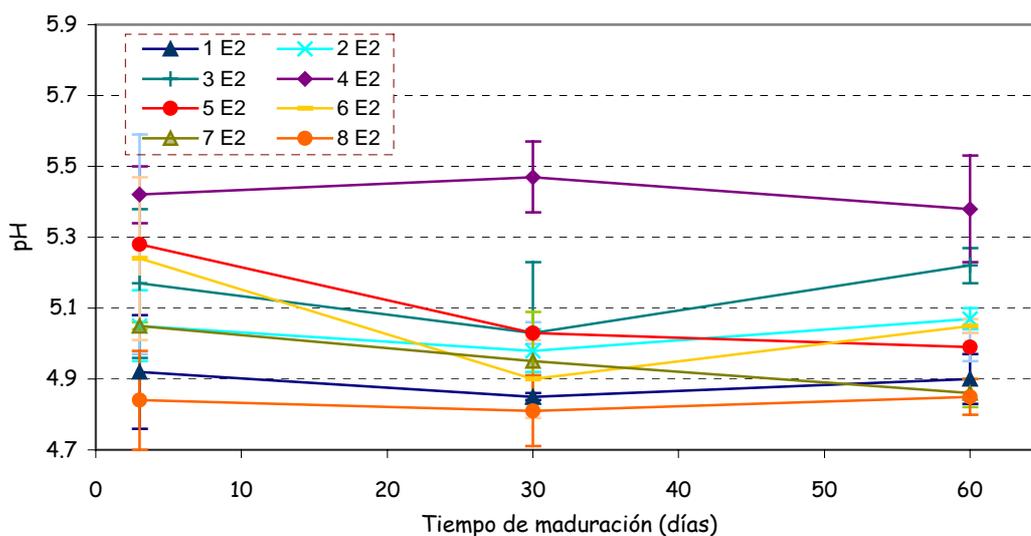
En todos los quesos experimentales, excepto los del ensayo con *B. lactis*, hubo una disminución de pH entre 3 y 30 días, y luego, hasta los 60 días, se presentaron ligeras variaciones hacia valores mayores o menores, según el ensayo. Por el contrario, los quesos con bifidobacterias presentaron un incremento del pH al inicio de la maduración y luego un descenso, llegando a valores finales inferiores al pH inicial (Figuras 4 y 5).

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



En general, el pH en los quesos E2 mostró la menor variación durante la maduración, manteniéndose en la mayor parte de los ensayos en un rango más estrecho que en los quesos T y E1 (Figura 5).

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



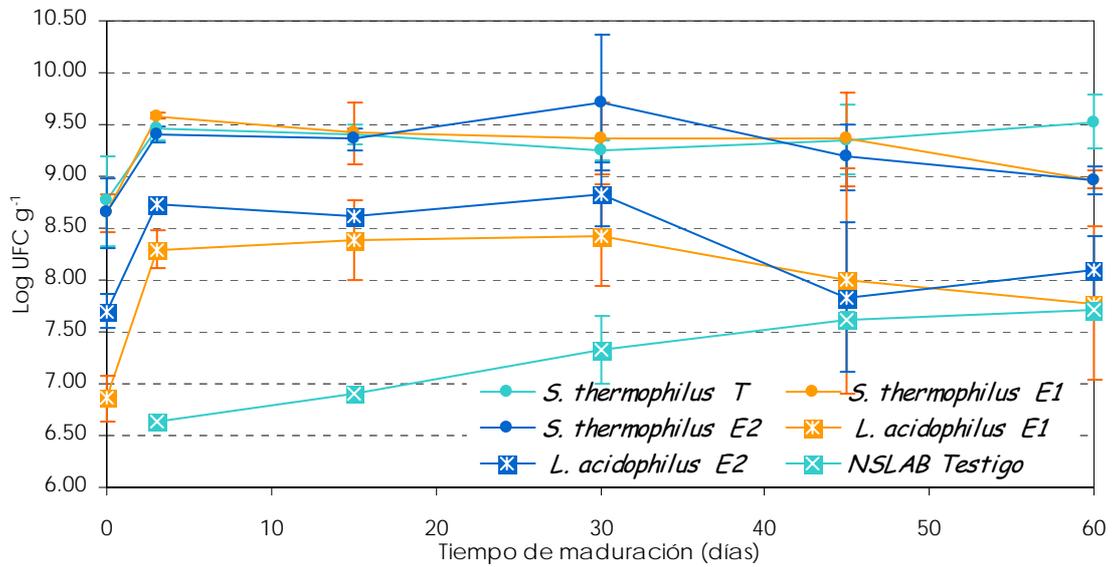
4- Análisis microbiológicos

Se comprobó que la pérdida de bacterias probióticas en el suero de quesería era despreciable, ya que la concentración de estas bacterias en el mismo fue de alrededor de 10^5 UFC mL^{-1} , lo que representa un 10% de la cantidad agregada.

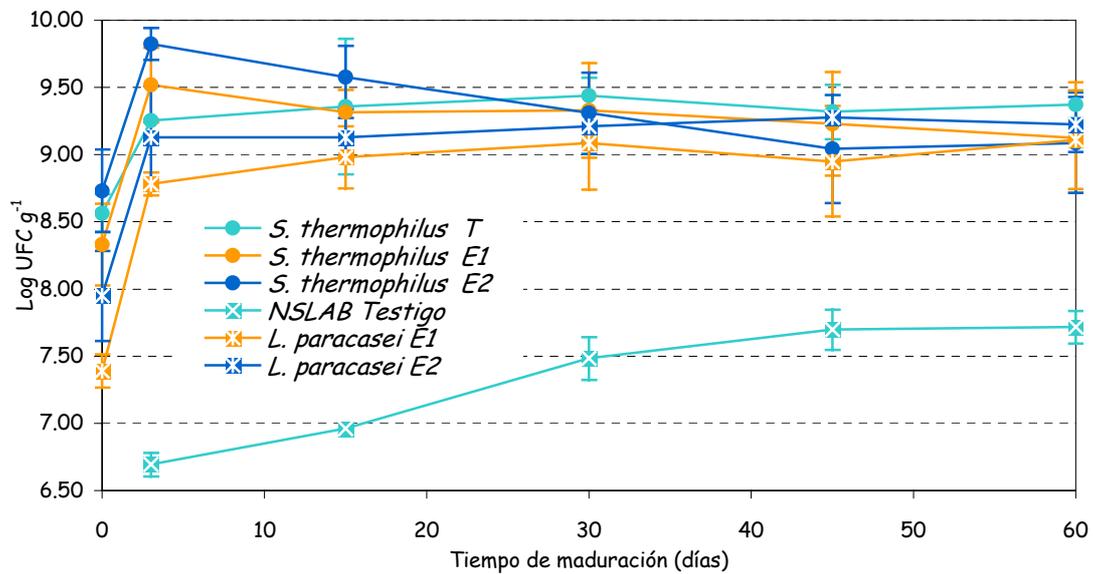
A continuación se presentan los gráficos que muestran la evolución de los fermentos primario, probiótico y NSLAB durante la maduración en los quesos elaborados.

Figura 6: Evolución del fermento primario, probiótico y NSLAB en los quesos testigo (T), experimental 1 (E1) y experimental 2 (E2), en los 8 ensayos. Se presentan los valores medios \pm desviación estándar de tres quesos (réplicas).

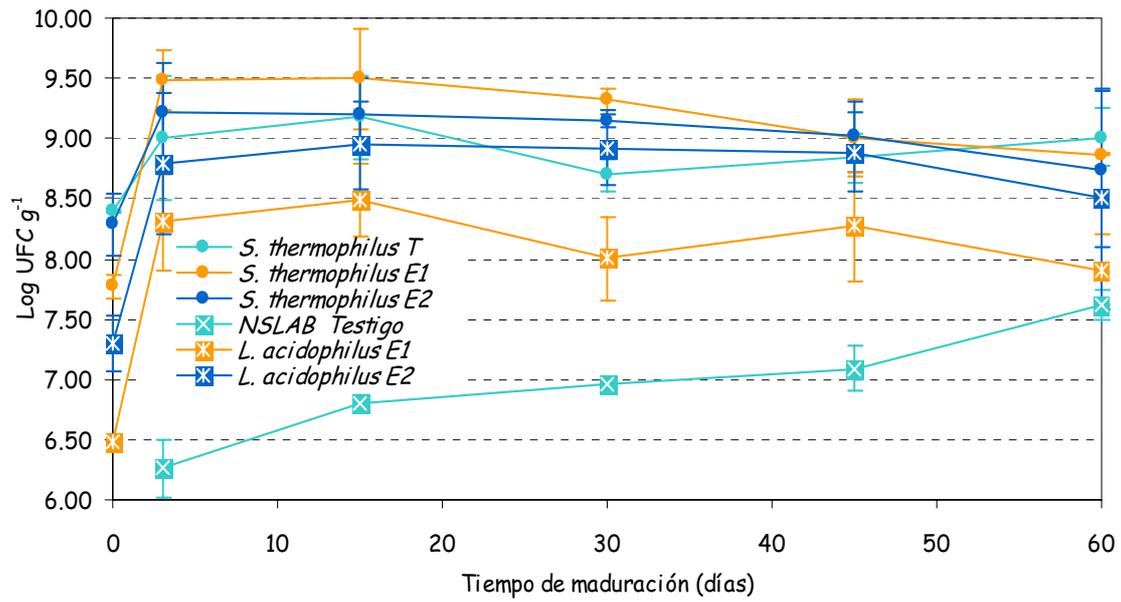
a) Ensayo 1: *L. acidophilus* A.



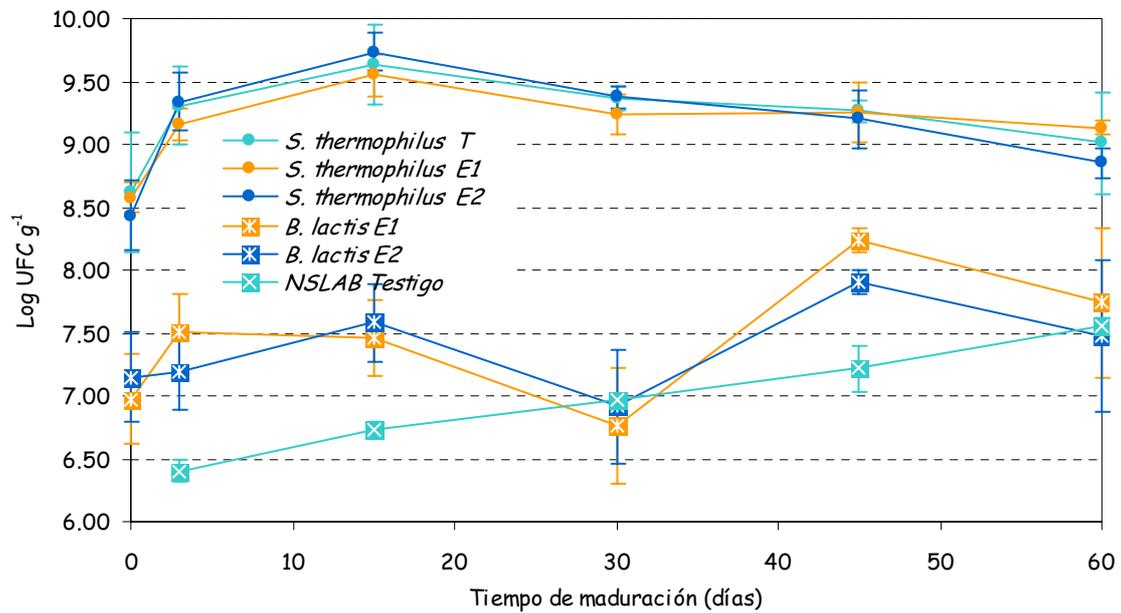
b) Ensayo 2: *L. paracasei* subsp. *paracasei*.

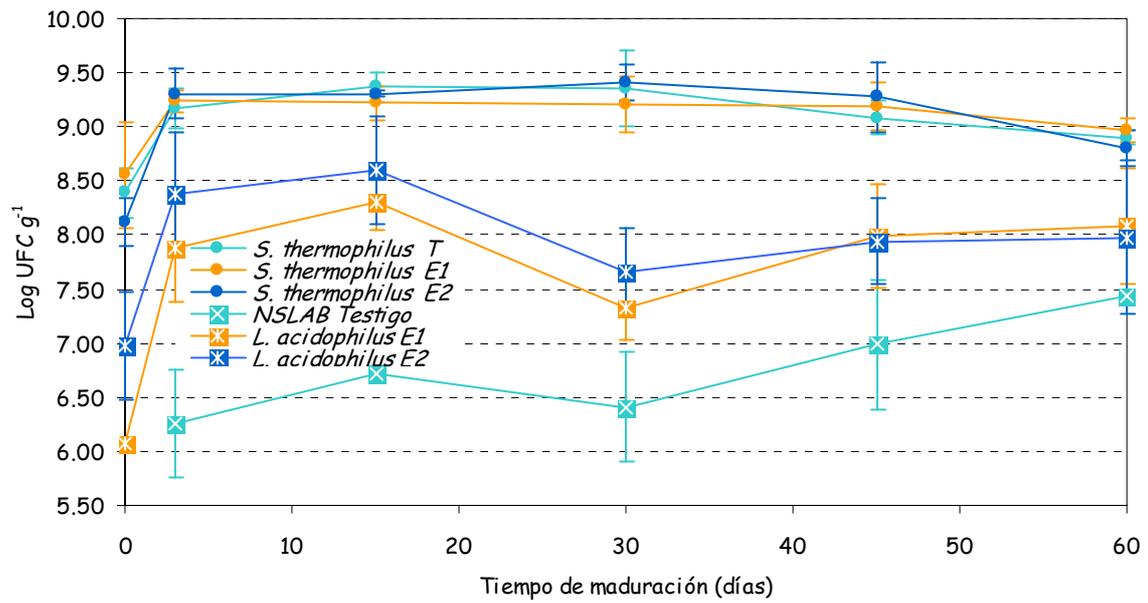
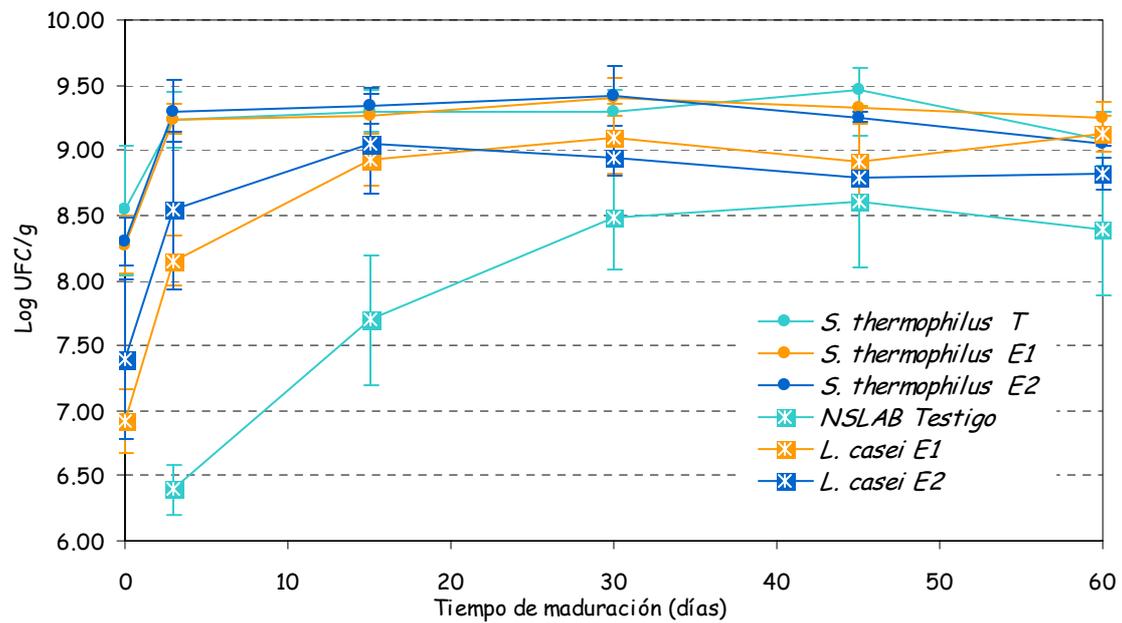


c) **Ensayo 3: *L. acidophilus* B.**

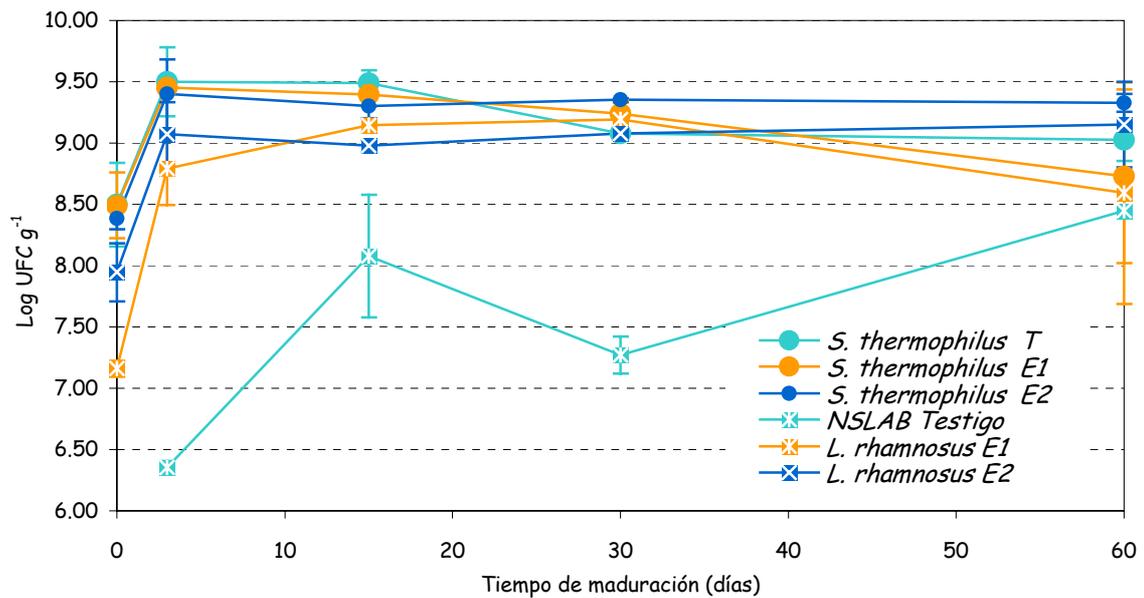


d) **Ensayo 4: *Bifidobacterium lactis***

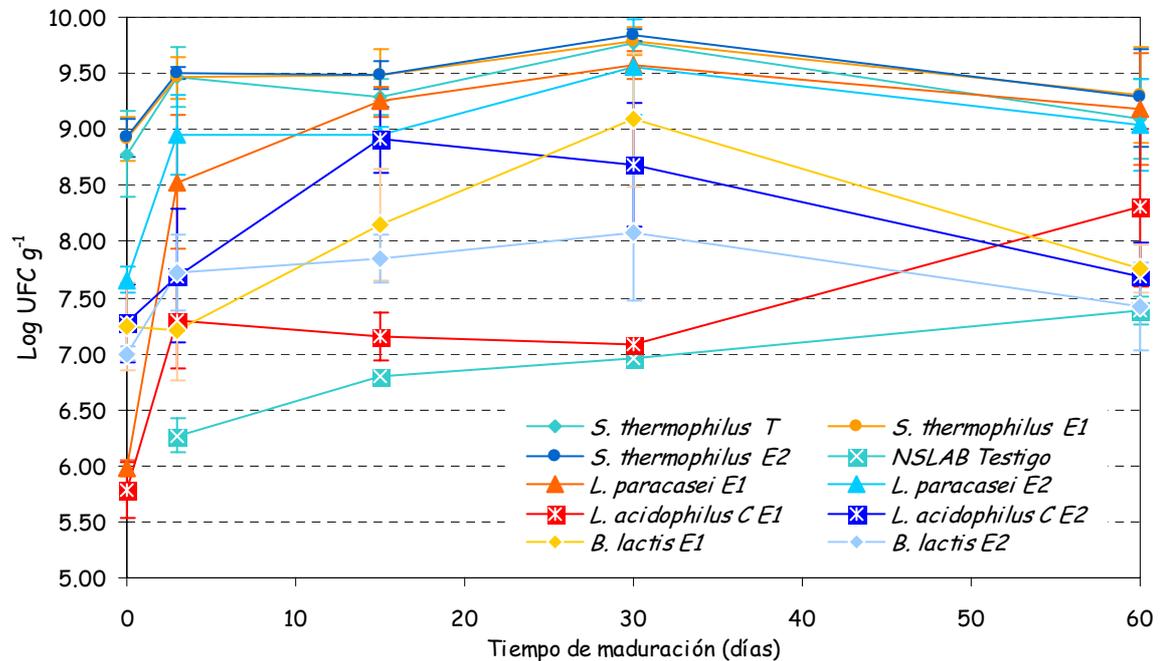


e) Ensayo 5: *L. acidophilus* C.f) Ensayo 6: *Lactobacillus casei*.

g) Ensayo 7: *Lactobacillus rhamnosus*.



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



En todos los quesos, testigos o experimentales de cada ensayo, la población del fermento primario mostró una evolución similar (Figura 6). En general, entre 0 y 3 días de maduración se verificó un incremento, que varió entre 0,5 y 1,2 órdenes logarítmicos. Un aumento algo mayor (1,7) se obtuvo únicamente en los quesos tipo E1 del ensayo 3, donde se utilizó la mitad de la dosis del fermento primario.

El menor aumento inicial en la población del fermento primario fue observado para los quesos experimentales del ensayo 8 (Figura 6h), donde estaban presentes altas concentraciones de tres cepas probióticas, así como en los quesos T del ensayo 3 y los quesos tipo E1 del ensayo 4 (Figuras 6c y 6d).

En general, en los quesos experimentales de todos los ensayos el incremento inicial de *S. thermophilus* resultó mayor que en los quesos testigo correspondientes, excepto en los quesos E1 del ensayo 4 y en el ensayo 8 (Figuras 6d y 6h).

Luego de los 3 días y hasta el final de la maduración, la población del fermento primario mostró un valor bastante constante o con pequeños descensos.

Para el conjunto de los ensayos, no se detectaron diferencias significativas en el recuento de *S. thermophilus* entre los quesos T, E1 y E2 (Figura 6). Solamente se encontraron algunas variaciones puntuales en algún momento de la maduración de los quesos correspondientes a los ensayos 1, 3 y 7, en los que se detectaron diferencias entre los quesos testigo y experimentales (Figuras 6a, 6c y 6g).

Con respecto a los fermentos probióticos, todas las cepas utilizadas se mantuvieron hasta el final del período de estudio en niveles superiores a 10^7 UFC g⁻¹.

Al igual que el fermento primario, hubo un incremento importante, de más de un orden logarítmico, en la concentración de cada fermento probiótico en el queso, entre 0 y 3 días, con algunas excepciones. Por ejemplo, en el ensayo 4, la población de *B. lactis* aumentó 0,5 órdenes logarítmicos en el queso E1 y prácticamente no varió en el queso E2 (Figura 6d).

En todos los ensayos, excepto en el 8 para *B. lactis*, el incremento de bacterias probióticas entre 0 y 3 días en los quesos E1 fue mayor al observado en los quesos E2.

El comportamiento entre 0 y 3 días de las cepas que se utilizaron en el fermento mixto en el ensayo 8 fue distinto del observado en los ensayos individuales. En primer lugar, *L. acidophilus* C mostró un incremento menor, sobre todo en los quesos tipo E2 en este ensayo, que cuando fue utilizado en forma individual (Figuras 6e y 6h). Por el contrario, *L. paracasei* en el fermento mixto, mostró un aumento en su población en los quesos tipo E1 entre 0 y 3 días bastante mayor al observado en el ensayo individual,

mientras que el comportamiento en los quesos tipo E2 fue similar (Figuras 6b y 6h). Por último, *B. lactis* aumentó 0,7 órdenes logarítmicos en los quesos tipo E2, y no demostró crecimiento en los quesos tipo E1, inversamente a lo verificado al usarse individualmente (Figuras 6d y 6h).

La concentración de las bacterias probióticas entre ambos quesos experimentales fue en general bastante similar. Un análisis de ANOVA de una vía sobre las poblaciones de los probióticos en estos quesos demostró diferencias significativas en un escaso número de ocasiones. Dichas diferencias se verificaron al inicio de la maduración: la población de *L. acidophilus* A fue mayor en los quesos E2 a los 0 y 3 días de maduración (Figura 6a); en el ensayo 7, la población de *L. rhamnosus* fue significativamente mayor en los quesos E2 a los 0 días (Figura 6g); por último, en el ensayo 8, *L. acidophilus* C mostró una población significativamente más elevada en los quesos E2 a los 0 y 15 días de maduración, mientras que el análisis de la población de *L. paracasei* demostró diferencias solamente a los 0 días (Figura 6h).

Teniendo en cuenta la tendencia general para todos los ensayos, se comprobó que la concentración probiótica fue mayor en los quesos E2 que en los E1 al inicio de la maduración, pero luego esta diferencia desapareció en casi todos los casos. En el único caso en el cual la mayor concentración probiótica en el queso E2 se mantuvo durante todo el período de estudio fue en el ensayo 3, en el cual se utilizó *L. acidophilus* B.

Comparando la viabilidad de todas las cepas probióticas en los ensayos individuales, se observó un comportamiento diferente entre los distintos grupos microbianos.

Luego del incremento inicial, las cepas de *L. acidophilus* mostraron desde los 3 días y hasta el final de la maduración un mantenimiento de la concentración con algunas pequeñas disminuciones en su población, luego de los 15, 30 o 45 días, dependiendo de la cepa, y también del queso. La concentración final en todos los casos estuvo alrededor de 10^8 UFC g⁻¹ (Figuras 6a, 6c y 6e). *L. acidophilus* C en el ensayo 8 mostró una evolución diferente según el tipo de queso: en el E1 mostró un aumento de más de un orden logarítmico entre 30 y 60 días, mientras que el E2 aumentó hasta los 15 días y luego se observó una disminución en su concentración (Figura 6h).

Por otro lado, las cepas del grupo de *L. casei*: *L. paracasei*, *L. casei* y *L. rhamnosus*, a partir de los 3 días, mostraron un mantenimiento a un nivel prácticamente constante de la población viable presente en el queso, hasta el final de la maduración. Una excepción a estos resultados fue la concentración de *L. rhamnosus* en el queso E1,

que disminuyó aproximadamente 0,5 órdenes logarítmicos luego de los 30 días. La concentración final para estas tres cepas fue cercana a 10^9 UFC g^{-1} (Figuras 6b, 6f y 6g). El comportamiento de *L. paracasei* en los quesos con un cultivo probiótico mixto (ensayo 8) fue similar al observado en el ensayo individual (Figura 6h).

Por último, la cepa de *B. lactis* presentó un valor casi constante entre 3 y 30 días y luego un incremento en su concentración. La concentración final fue mayor a $3 \cdot 10^7$ UFC g^{-1} (Figura 6d). Una evolución diferente fue observada para *B. lactis* en los quesos del ensayo 8 (fermento mixto): aumentó entre 3 y 30 días, sobre todo en el queso E1, y luego se observó una disminución hasta los 60 días (Figura 6h).

Los recuentos correspondientes a las bacterias lácticas no fermento o NSLAB en los quesos testigos demostraron que esta población adventicia alcanzaba un valor de aproximadamente 10^6 UFC g^{-1} a los 3 días, y posteriormente aumentaba hasta niveles de 10^7 y 10^8 UFC g^{-1} hacia el final de la maduración. En los quesos experimentales no se detectaron, en las placas de MRS-agar, colonias de lactobacilos diferentes de las cepas probióticas agregadas, por lo que se consideró que las NSLAB se mantuvieron en niveles muy bajos.

5- Estudio de la proteólisis

5.1- Fraccionamiento nitrogenado

En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos en el fraccionamiento nitrogenado, expresados como el porcentaje de nitrógeno soluble de cada fracción con respecto al nitrógeno total.

Como consecuencia del proceso de proteólisis durante la maduración del queso se produjo un incremento del nivel de nitrógeno en todas las fracciones solubles estudiadas. En general, el incremento de NS-pH 4,6 y NS-TCA entre 3 y 30 días fue mayor que al final de la maduración (entre 30 y 60 días). Una excepción a esto se presentó en los quesos experimentales con *L. acidophilus* B, donde el aumento de NS-pH 4,6 y NS-TCA fue constante durante todo el período de estudio.

El impacto del fermento probiótico en la producción de compuestos nitrogenados solubles en cada fracción se evaluó por ANOVA de una vía ($\alpha = 0,05$), aplicando el análisis sobre la matriz de datos formada por los valores de nitrógeno soluble (NS) correspondientes a cada fracción, a un tiempo dado de maduración, para cada ensayo.

Tabla 13. Contenido de nitrógeno en las fracciones solubles a pH 4,6 (NS-pH 4,6), en ácido tricloroacético 12% (NS-TCA) y en ácido fosfotúngstico 2,5% (NS-PTA), expresado como porcentaje del nitrógeno total, a 3, 30 y 60 días de maduración, en los quesos testigo (T), experimental 1 (E1) y experimental 2 (E2), en los 8 ensayos.

Ensayo	Cepa	Quesos	NS-pH 4,6			NS-TCA			NS-PTA		
			Días de maduración			Días de maduración			Días de maduración		
			3	30	60	3	30	60	3	30	60
1	T		5,2 ± 0,6	10,9 ± 1,4	14,2 ± 1,6	2,5 ± 0,3	6,0 ± 0,3	7,5 ± 1,1	0,7 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,2 ^a	1,4 ± 0,1 ^a
	<i>L. acidophilus A</i>	E1	5,7 ± 0,3	10,7 ± 1,1	13,9 ± 0,7	2,6 ± 0,2	6,1 ± 0,2	7,7 ± 0,7	1,1 ± 0,2 ^b	1,7 ± 0,2 ^b	2,0 ± 0,2 ^b
		E2	6,1 ± 0,9	11,4 ± 1,8	13,9 ± 1,2	3,0 ± 0,4	6,3 ± 0,5	7,9 ± 0,3	1,2 ± 0,1 ^b	1,9 ± 0,1 ^b	2,1 ± 0,1 ^b
2	T		5,8 ± 0,1	12,4 ± 1,3	15,5 ± 1,0	2,0 ± 0,1	5,8 ± 0,4	8,1 ± 0,7	0,6 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,5 ± 0,3
	<i>L. paracasei</i>	E1	5,5 ± 0,1	10,8 ± 0,4	13,9 ± 0,3	2,1 ± 0,1	5,5 ± 0,5	7,8 ± 0,3	0,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,1
		E2	5,4 ± 0,3	11,0 ± 0,4	13,4 ± 1,4	2,1 ± 0,3	5,8 ± 0,2	7,7 ± 0,6	0,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1
3	T		5,3 ± 0,2	11,1 ± 0,1 ^a	16,3 ± 0,2	2,2 ± 0,3	5,6 ± 0,6	8,2 ± 0,6	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,1 ^a
	<i>L. acidophilus B</i>	E1	5,6 ± 0,1	9,7 ± 0,3 ^b	14,3 ± 0,8	2,3 ± 0,2	5,5 ± 0,5	8,7 ± 0,8	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,2 ^b	2,7 ± 0,1 ^b
		E2	5,4 ± 0,1	9,7 ± 0,5 ^b	14,4 ± 1,1	2,1 ± 0,3	5,3 ± 0,2	8,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,6 ± 0,1 ^b	2,7 ± 0,2 ^b
4	T		4,9 ± 0,3	10,5 ± 0,9	14,1 ± 1,2	2,1 ± 0,3	5,1 ± 0,6	7,2 ± 0,8	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,4
	<i>B. lactis</i>	E1	5,2 ± 0,1	10,8 ± 0,4	14,1 ± 0,2	1,9 ± 0,1	5,3 ± 0,3	7,0 ± 0,8	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,2
		E2	5,0 ± 0,3	11,6 ± 0,1	14,7 ± 0,7	1,9 ± 0,1	5,5 ± 0,5	7,5 ± 0,7	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,2

	Quesos	NS-pH 4,6			NS-TCA			NS-PTA		
		Días de maduración			Días de maduración			Días de maduración		
		3	30	60	3	30	60	3	30	60
5	T	5,4 ± 0,2	11,1 ± 0,9	14,0 ± 1,3	2,3 ± 0,2	5,6 ± 0,4	7,6 ± 0,4	0,7 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,1 ^a	1,7 ± 0,2 ^a
<i>L. acidophilus</i> C	E1	5,7 ± 0,5	11,1 ± 0,7	14,5 ± 1,3	2,4 ± 0,5	5,8 ± 0,6	7,9 ± 0,4	0,9 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,3 ^{ab}	2,0 ± 0,2 ^{ab}
	E2	5,8 ± 0,4	10,4 ± 0,7	14,5 ± 1,2	2,4 ± 0,3	5,8 ± 0,7	8,0 ± 0,9	1,3 ± 0,3 ^b	1,8 ± 0,2 ^b	2,4 ± 0,3 ^b
6	T	5,3 ± 0,4	11,2 ± 1,0	14,5 ± 1,7	2,3 ± 0,3	4,9 ± 0,7	7,6 ± 1,0	0,8 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,9 ± 0,3
<i>L. casei</i>	E1	5,7 ± 0,3	10,9 ± 0,5	14,8 ± 2,7	2,1 ± 0,1	5,6 ± 0,2	7,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,6 ± 0,3	2,2 ± 0,5
	E2	6,0 ± 0,4	11,1 ± 1,7	14,2 ± 0,3	2,3 ± 0,3	5,9 ± 0,8	7,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,6 ± 0,3	2,3 ± 0,1
7	T	5,2 ± 0,2	10,3 ± 1,7	13,0 ± 0,9	2,3 ± 0,1	6,0 ± 1,1	7,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,0 ± 0,1
<i>L. rhamnosus</i>	E1	4,8 ± 0,1	9,4 ± 1,1	12,0 ± 0,1	2,3 ± 0,2	5,6 ± 0,6	6,6 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,8 ± 0,2
	E2	4,9 ± 0,1	10,0 ± 0,5	12,3 ± 0,8	2,3 ± 0,2	5,8 ± 0,5	7,3 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,1
8	T	5,7 ± 0,5	10,3 ± 1,1	14,0 ± 1,2	2,2 ± 0,1	5,0 ± 0,2	6,6 ± 0,7	0,7 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1 ^a
<i>Tres cepas</i>	E1	5,5 ± 0,3	10,6 ± 0,5	13,9 ± 1,4	2,4 ± 0,2	5,4 ± 0,5	7,3 ± 0,3	0,8 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,1 ^a	1,7 ± 0,1 ^b
	E2	5,8 ± 0,6	9,8 ± 1,1	13,4 ± 1,5	2,5 ± 0,1	5,7 ± 0,7	7,3 ± 0,9	1,3 ± 0,2 ^b	1,6 ± 0,1 ^b	2,1 ± 0,1 ^c

Se presentan los valores y desviaciones estándar de las tres réplicas de quesos. Los valores en una columna, y dentro de cada ensayo, con diferente superíndice, presentan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$).

La fracción de NS-pH 4,6 no fue afectada por la incorporación de los distintos fermentos adjuntos, salvo en un único caso: los quesos T y experimentales del ensayo 3 mostraron diferencias significativas en su contenido de NS-pH 4,6 a los 30 días. Se determinó la presencia de dos grupos de medias homogéneas: T y E1/E2, siendo menor la concentración en los quesos experimentales, que contenían *L. acidophilus* B. El NS-pH 4,6 de todos los quesos a los 60 días estuvo comprendido entre 12,0 y 16,3%, lo que significó un aumento entre 2,3 y 3,1 veces con respecto a los valores iniciales.

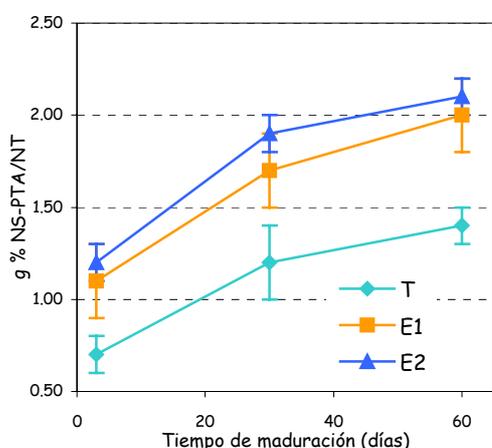
En forma similar, la fracción de NS-TCA en la mayoría de los casos no resultó influenciada por la acción del fermento probiótico presente en el queso. Solamente se detectaron diferencias en el ensayo 7 a los 60 días, donde se observaron dos grupos de medias: T/E2 y E1. El NS-TCA representó, en promedio, el 50% del NS-pH 4,6, lo que indica que aproximadamente la mitad de los compuestos nitrogenados solubles al pH isoelectrico de las caseínas también son solubles en ácido tricloroacético al 12%. Los niveles de NS-TCA a los 60 días estuvieron comprendidos entre 6,6 y 8,8%, aumentando entre 2,6 y 4,2 veces durante la maduración.

Por último, y a diferencia de las dos fracciones anteriores, en la fracción de NS-PTA se encontraron diferencias significativas en varios de los ensayos (Tabla 13). El hallazgo de valores disímiles se produjo en los ensayos donde se había utilizado alguna cepa de *L. acidophilus* (Figura 7). De este modo, en el ensayo 1 se encontraron diferencias significativas en los niveles de NS-PTA, ya desde los 3 días y hasta el final de la maduración, entre dos grupos de medias homogéneas: T y E1/E2. En el ensayo 3, las diferencias fueron detectadas solamente a los 30 y 60 días, observándose iguales grupos de medias homogéneas: T y E1/E2. En el ensayo 5, las disimilitudes fueron observadas nuevamente desde los 3 días, pero los grupos encontrados fueron distintos: T/E1 y E2 a los 3 días, y T/E1 y E1/E2 a los 30 y 60 días. Finalmente, en el ensayo 8, con el cultivo probiótico mixto, también se detectaron diferencias significativas en el NS-PTA a todos los tiempos de muestreo, agrupándose las medias homogéneas según: T/E1 y E2 a los 3 y 30 días, y T, E1 y E2 (tres grupos) a los 60 días.

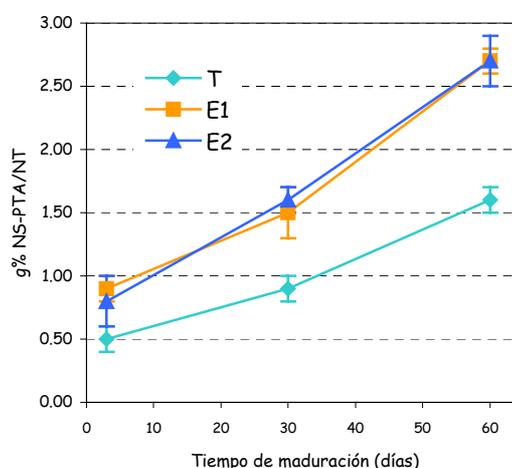
En todos los casos donde se detectaron diferencias significativas en el contenido de NS-PTA, el grupo conteniendo al queso testigo mostró los valores más bajos, mientras que el grupo con los quesos experimentales 2 presentó los niveles más elevados.

Figura 7. Evolución del contenido de NS-PTA, expresado como porcentaje del NT, en los ensayos donde hubo diferencias significativas.

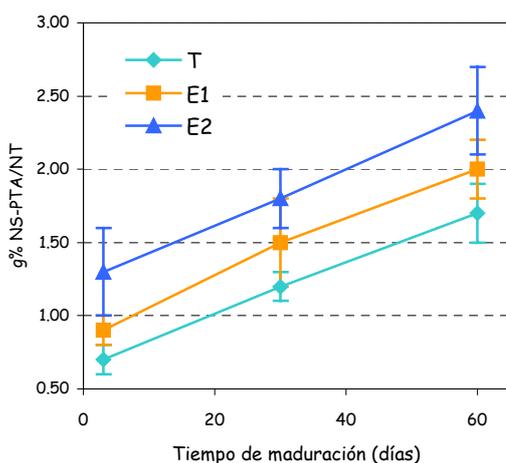
a) Ensayo 1: *L. acidophilus* A



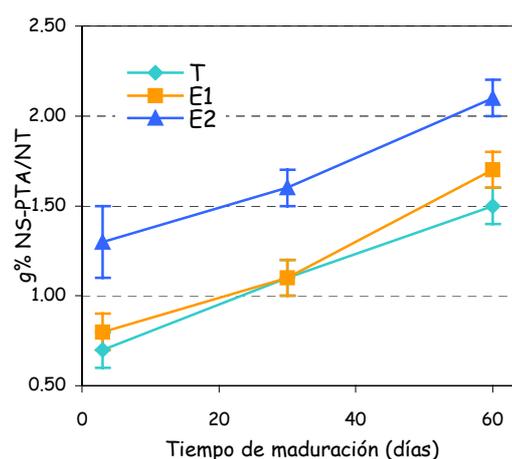
b) Ensayo 3: *L. acidophilus* B



c) Ensayo 5: *L. acidophilus* C



d) Ensayo 8: Fermento probiótico mixto



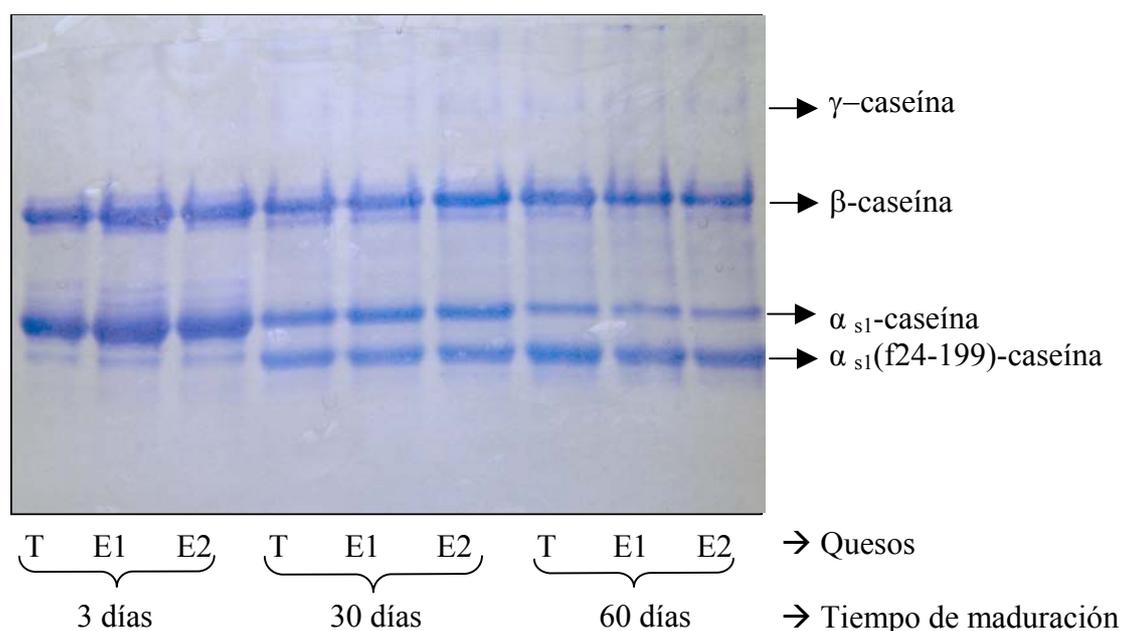
Al contrario de lo observado en los ensayos con *L. acidophilus*, en aquellos en los que se utilizaron cepas del grupo de *L. casei* o bifidobacterias, los niveles de NS-PTA no mostraron diferencias significativas entre los distintos quesos a ninguno de los tiempos de maduración muestreados. En todos los casos, sin embargo, el valor alcanzado por el NS-PTA en los quesos experimentales fue numéricamente mayor que en los quesos testigo al final de la maduración, excepto en el ensayo con *L. rhamnosus* (ensayo 7).

Los valores de NS-PTA de todos los quesos a los 60 días estuvieron comprendidos entre 1,4 y 2,7%, aumentando entre 1,8 y 2,4 veces desde su valor a los 3 días. El NS-PTA representó en promedio el 15% del NS-pH 4,6.

5.2- Electroforesis

La proteólisis primaria evidenciada por urea-PAGE demostró ser muy similar para todos los tipos de queso, para tiempos de maduración equivalentes. A manera de ejemplo, en la figura 8 se presentan los perfiles electroforéticos correspondientes al ensayo 4. Los electroforetogramas de los demás ensayos resultaron muy similares.

Figura 8. Urea-PAGE de los quesos testigo (T), experimental 1 (E1) y experimental 2 (E2), durante la maduración.



En los perfiles electroforéticos se observó una importante degradación de la α_{s1} -caseína, lo que resultaba de la observación de una banda electroforética de muy baja intensidad hacia el final de la maduración. La desaparición de la α_{s1} -caseína ocurrió en forma simultánea con un incremento de la fracción de $\alpha_{s1}(f24-199)$ -caseína, derivada de la acción del coagulante. Esta fracción se encontró desde los 3 días, y se incrementó a los 30 días para dar una banda de intensidad similar a la de α_{s1} -caseína. Finalmente, a los 60 días fue mayor que la fracción de la caseína de origen.

Por otro lado, la β -caseína permaneció prácticamente intacta durante la maduración. Solamente se pudo observar al final de la maduración una banda de γ -caseína de muy baja intensidad. Las γ -caseínas son producto de la acción de la plasmina sobre la β -caseína.

5.3- Perfiles peptídicos

Los perfiles peptídicos correspondientes a las muestras de quesos de 3, 30 y 60 días de cada ensayo fueron analizados por el método de componentes principales (ACP). Como variables de entrada se utilizaron las áreas de un conjunto de 10 a 16 picos, según el ensayo, que se seleccionaron visualmente luego de comparar los cromatogramas del mismo queso a distintos tiempos de maduración, y de distintos quesos al mismo tiempo de maduración. Se eligieron aquellos picos que presentaban las mayores variaciones entre perfiles, y se identificaron con letras, en orden alfabético según el tiempo de retención. Los picos comunes detectados en más de un ensayo y que tenían similar tiempo de retención se identificaron con la misma letra.

El número de variables seleccionadas para el análisis se mantuvo por debajo de 20, de manera de mantener una proporción adecuada entre número de muestras y variables, ya que una dimensionalidad excesiva para un reducido grupo de datos puede producir la sobreestimación del sistema.

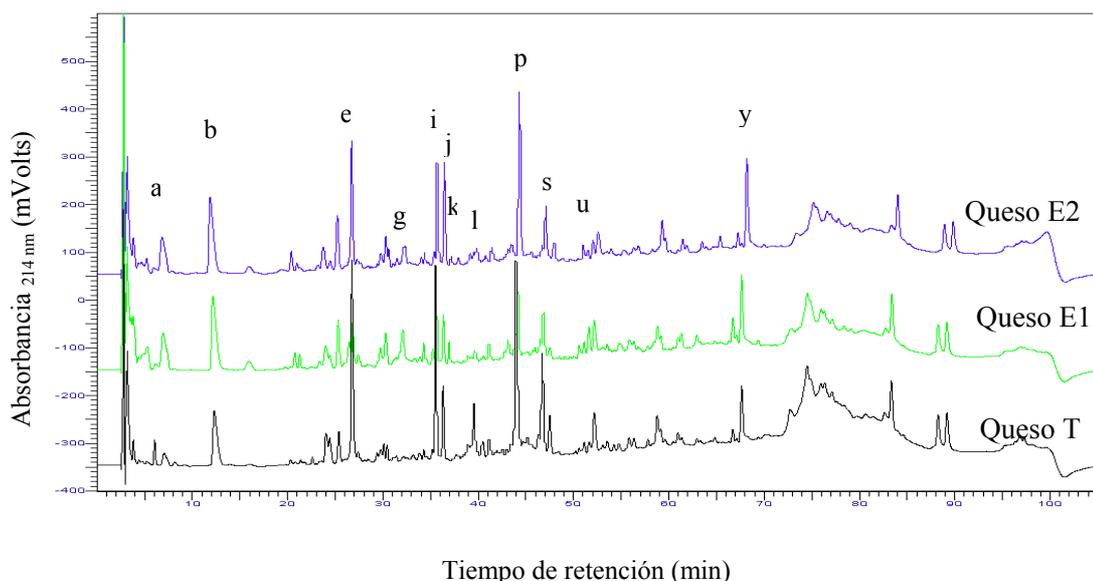
Previamente al ACP, se realizaron estudios preliminares en el conjunto de datos. Se verificó la existencia de altas correlaciones entre las variables, un requisito para el ACP. Para ello se aplicó la matriz de correlación, donde se evidenciaron las correlaciones entre todas las variables y los niveles de significancia de las mismas. Además, se realizó el test de esfericidad de Bartlett, que determinó la presencia de correlaciones significativas entre las variables. Asimismo, se constató que el valor de MSA (medida de suficiencia de muestreo) global e individual fuera mayor a 0,5, lo que asegura un alto nivel de correlación entre las variables. Por último, se halló el valor de la comunalidad de las variables, que debe ser preferentemente mayor a 0,6, confirmando esta situación, la que indica que el nivel de explicación de dicha variable en la solución final es aceptable. La comunalidad es la proporción de variancia de cada variable tomada en cuenta por todos los factores extraídos en el análisis (Hair y col., 1999).

Existen distintos criterios para la selección del número de componentes principales a ser extraídos. En nuestro trabajo, en general se utilizó el criterio de *eigenvalue* mayor al valor promedio utilizando la matriz de covariancia, lo que es equivalente al criterio de *eigenvalue* mayor a 1 al utilizar la matriz de correlación en el ACP. En los casos donde, según este criterio, solamente se extraía un componente principal, también se consideró el segundo con la finalidad de graficar *scores* y *loading* en dos dimensiones, para una mejor legibilidad de los resultados.

5.3.1- Ensayo 1: *Lactobacillus acidophilus* A

Se seleccionaron 12 picos de los cromatogramas, que se muestran en la figura 9.

Figura 9. Perfiles peptídicos del extracto soluble en agua de los quesos T, E1 y E2 de la primera réplica del ensayo 1, a los 60 días de maduración. Los caracteres de la “a” a la “y” indican los picos seleccionados para el análisis multivariante. Los perfiles correspondientes a las otras dos réplicas fueron similares.

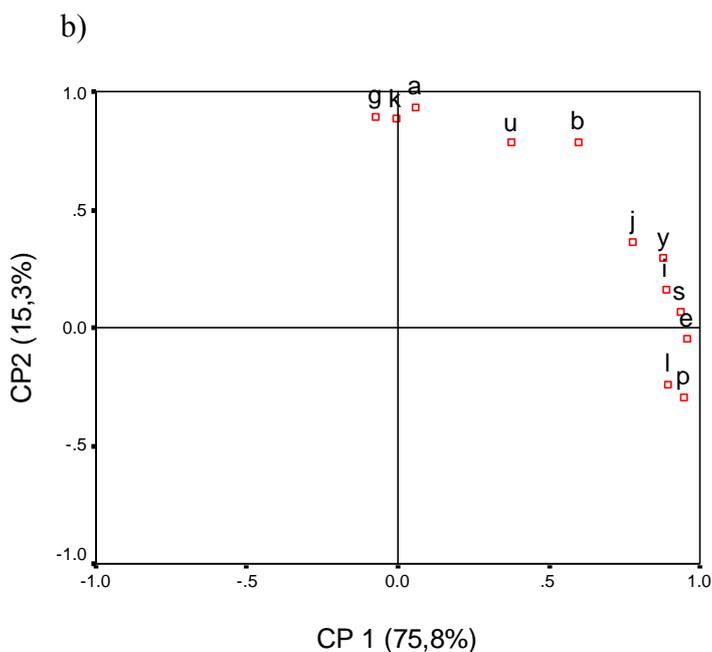
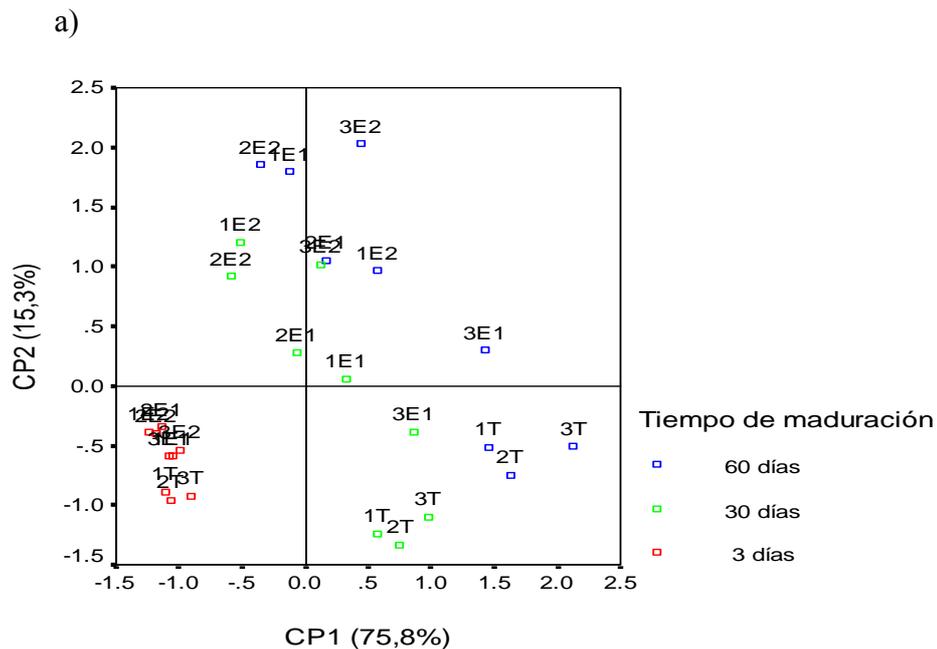


Del ACP, se extrajeron dos componentes principales que explicaron el 91,1% de la variancia del sistema: CP1: 75,8% y CP2: 15,3%. En el gráfico de los *scores* de las muestras (Figura 10a), se detectó una separación de las mismas según el tiempo de maduración a lo largo de los dos ejes, pero principalmente a lo largo de CP1. Las muestras de 3 días mostraron una escasa variabilidad, mientras que las de 30 y 60 días fueron más variables. A lo largo del eje del CP2 también se observó una separación según el tipo de queso, testigo y experimentales. Este comportamiento fue más notorio a los 30 y 60 días, pero también se manifestó en el grupo de muestras de 3 días.

Analizando el gráfico de *scores* y *loading* (Figuras 10a y b), se observó que las muestras de 3 días se caracterizaron por pequeños valores de todas las variables. Por otro lado, las variables con mayor influencia en CP1, **e, i, j, l, p, s** e **y**, sobre todo las que tienen valor negativo para CP2, fueron características de los quesos testigo de 30 y 60 días. Por último, las variables con mayor impacto en CP2, **a, b, g, k** y **u** describieron mejor a los quesos experimentales.

En cuanto a la metodología de agregado del fermento probiótico, el ACP no detectó más que una leve tendencia de separación entre los quesos E1 y E2 en las muestras de 30 días.

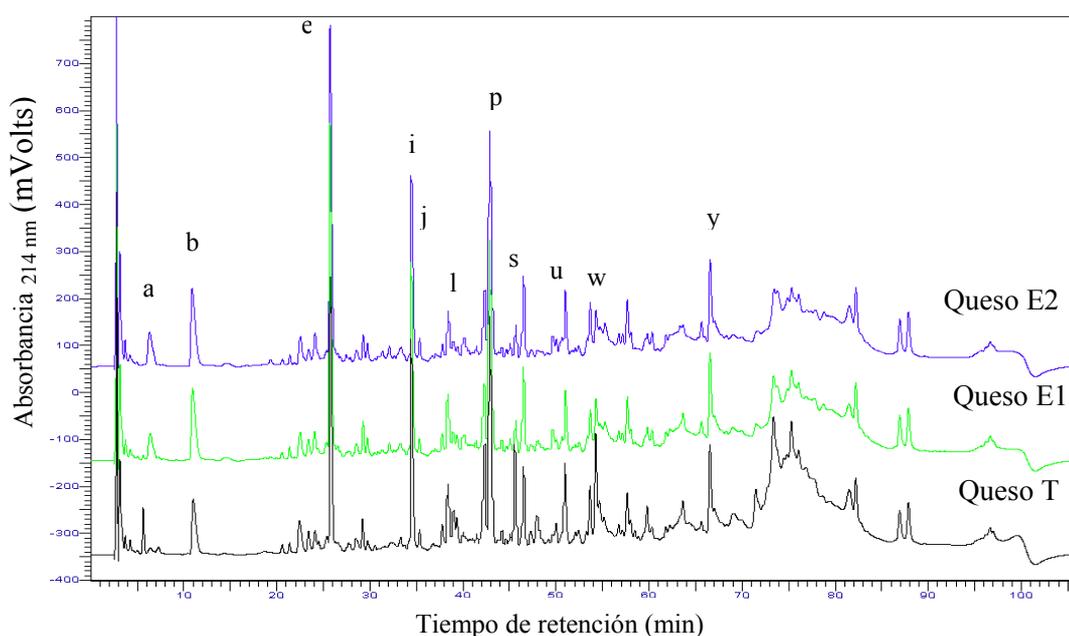
Figura 10. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC en el ensayo 1. a) Gráfico de los *scores* de las muestras (el número anterior a cada tipo de queso indica la réplica de elaboración). b) Gráfico de los *loading* de las variables.



5.3.2- Ensayo 2: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

En este ensayo se seleccionaron 11 picos que se muestran en los cromatogramas de la figura 11.

Figura 11. Perfiles peptídicos del extracto soluble en agua de los quesos T, E1 y E2 de la primera réplica del ensayo 2, a los 60 días de maduración. Los caracteres de la “a” a la “y” indican los picos seleccionados para el análisis multivariante. Los perfiles correspondientes a las otras dos réplicas fueron similares.



Se aplicó ACP, y se extrajeron dos componentes principales que explicaron el 92,6% de la variancia del sistema: CP1: 83,0% y CP2: 9,6%. En el gráfico de los *scores* de las muestras (Figura 12a), se detectó una separación de las mismas según el tiempo de maduración a lo largo del eje del CP1. Al igual que en el anterior ensayo, las muestras de 3 días mostraron una escasa variabilidad, mientras que las de 30 y 60 días fueron más variables. Estas últimas muestras mostraron una separación según el tipo de queso a lo largo del eje del CP2, siendo más evidente esta diferencia en las muestras de más tiempo de maduración.

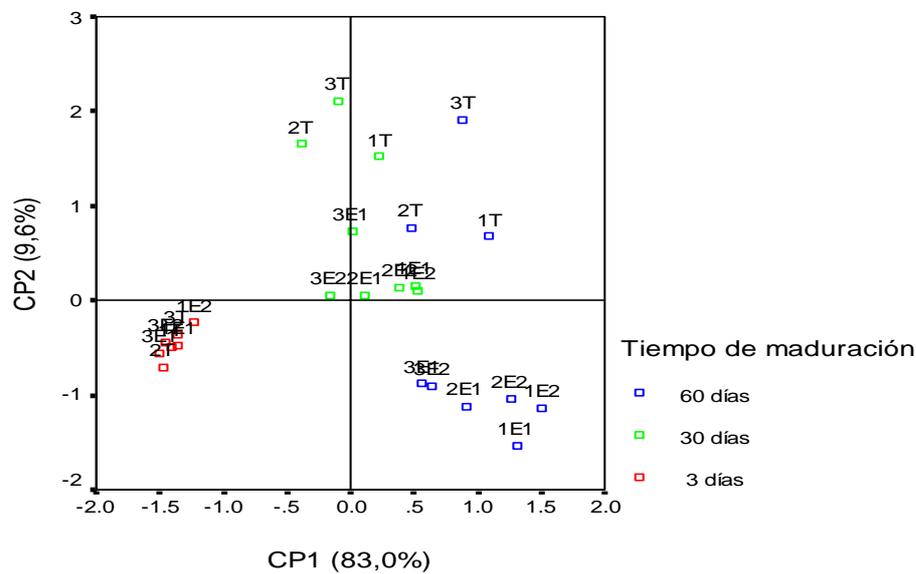
Teniendo en cuenta, además, los valores de los *loading* (Figura 12b), se detectó que las muestras de 3 días se caracterizaron por bajos valores de todas las variables, especialmente aquellas con alto impacto en CP1 y CP2: **b, e, i, l, p, s, u, w e y**. El pico **s**, con un elevado *loading* positivo en CP2, fue típico de los quesos testigos. Los picos

con *loading* negativos en CP2, principalmente a caracterizaron a las muestras de los quesos experimentales a los 30, y sobre todo a los 60 días de maduración.

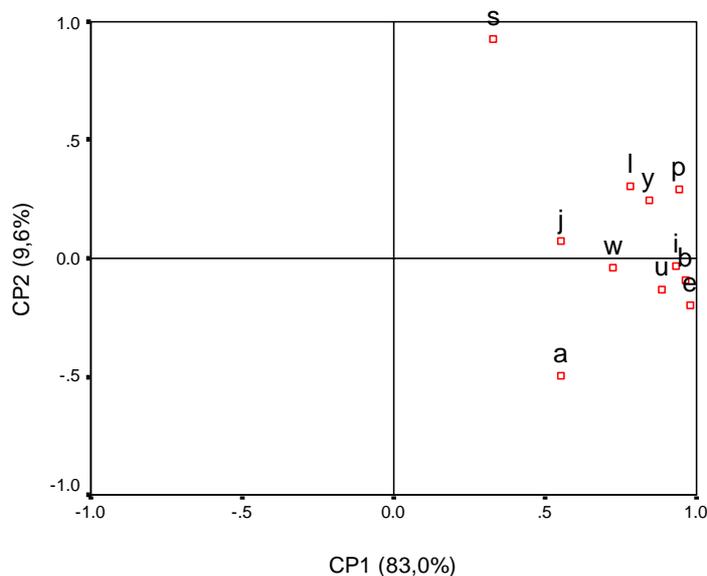
No se observaron agrupamientos entre las muestras de quesos experimentales según la metodología de elaboración de los mismos.

Figura 12. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC en el ensayo 2. a) Gráfico de los *scores* de las muestras (el número anterior a cada tipo de queso indica la réplica de elaboración). b) Gráfico de los *loading* de las variables.

a)



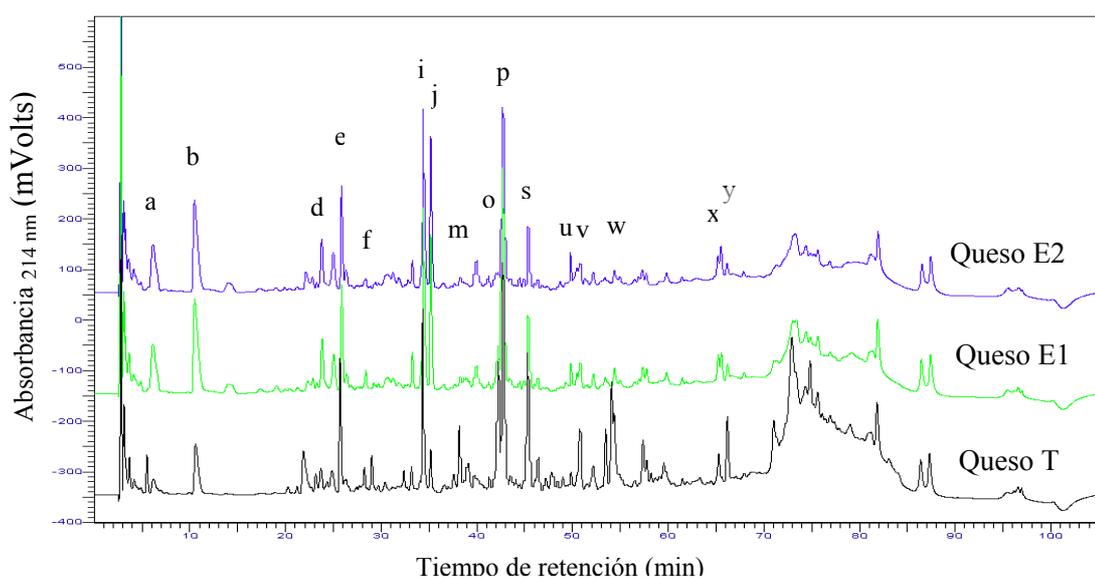
b)



5.3.3- Ensayo 3: *Lactobacillus acidophilus* B.

Se seleccionaron 16 picos de los cromatogramas, los cuales se muestran en la figura 13.

Figura 13. Perfiles peptídicos del extracto soluble en agua de los quesos T, E1 y E2 de la primera réplica del ensayo 3, a los 60 días de maduración. Los caracteres de la “a” a la “y” indican los picos seleccionados para el análisis multivariante. Los perfiles correspondientes a las otras dos réplicas fueron similares.



Todas las variables fueron adecuadas para el ACP, debido a la presencia de altas correlaciones entre ellas. Se extrajeron dos componentes principales que explicaron el 88,8% de la variancia: CP1 71,4% y CP2 17,4%.

En el gráfico de los *scores* de las muestras (Figura 14a) se observó una diferenciación por tiempo de maduración a lo largo del eje del CP1. Asimismo se observó que las muestras se agruparon por tipo de queso a lo largo del eje del CP2, lo que pudo detectarse ya a los 3 días, y fue más evidente para los quesos de 30 y 60 días de maduración. Los quesos T se agruparon juntos, mientras que los quesos experimentales formaron otro grupo bien diferenciado.

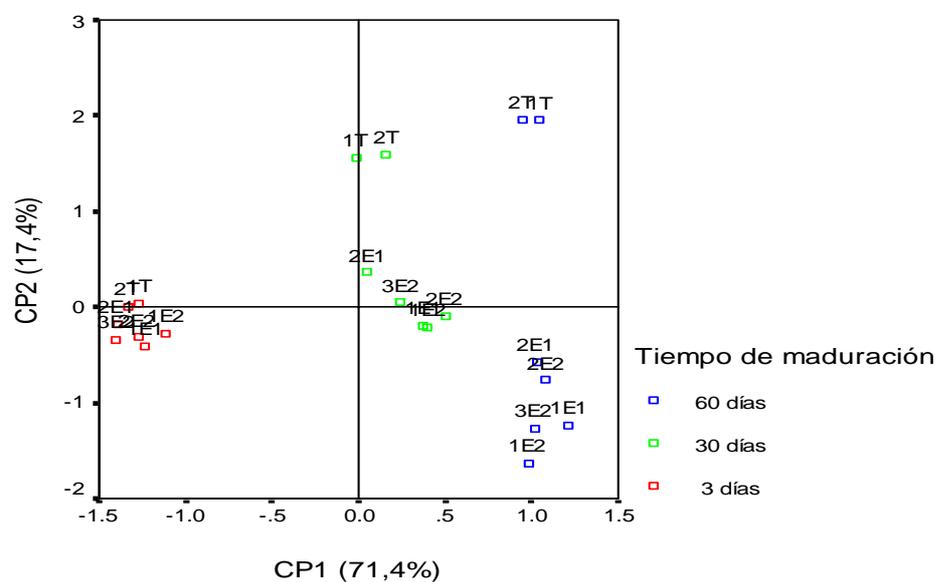
Del análisis de los *scores* y de los *loading* (Figura 14b) se observó que las muestras de 3 días se caracterizaron por valores pequeños de todas las variables. Las variables con alto *loading* positivo para CP2, sobre todo **f**, **o**, **m** e **y**, fueron importantes en los quesos T. Por otro lado, las variables con alto impacto negativo para CP2, sobre todo **a**, **d** y **j**, caracterizaron las muestras de los quesos experimentales de 60 días.

Finalmente, las variables con gran influencia en CP1, pero de bajo impacto en CP2 (**e**, **i** y **p**) fueron más características de los quesos experimentales a los 30 y 60 días.

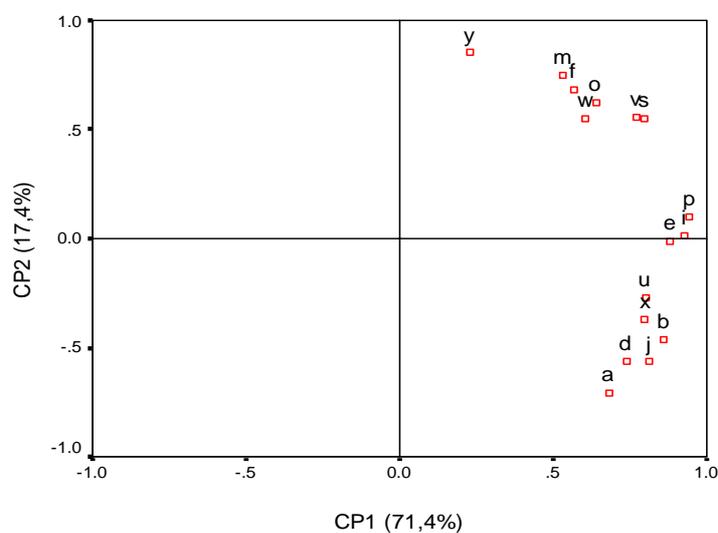
No se detectó diferencia entre los perfiles peptídicos de ambos quesos experimentales atribuibles a la metodología de adición utilizada, a pesar de que los quesos E2 albergaron una mayor población probiótica durante toda la maduración.

Figura 14. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC en el ensayo 3. a) Gráfico de los *scores* de las muestras (el número anterior a cada tipo de queso indica la réplica de elaboración). b) Gráfico de los *loading* de las variables.

a)



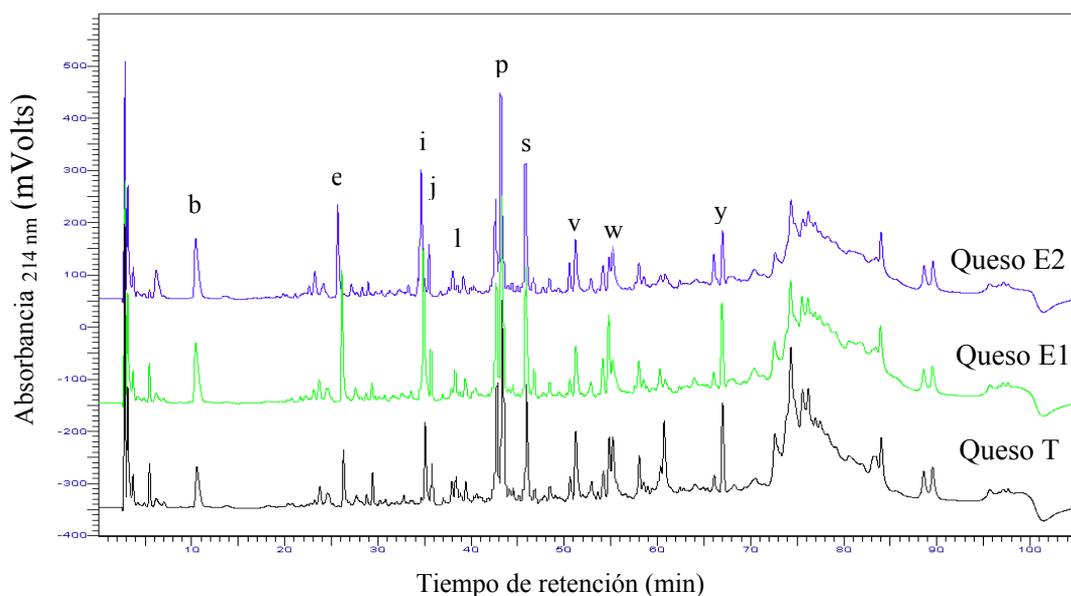
b)



5.3.4- Ensayo 4: *Bifidobacterium lactis*.

Se seleccionaron 14 picos de los cromatogramas para realizar el ACP. Luego del estudio preliminar, cuatro de ellos (a, t, u y x) se eliminaron debido a que no mostraron altas correlaciones con las otras variables. Se aplicó ACP a las 10 variables restantes, que se muestran en la figura 15, y se extrajo un componente principal que explicó el 82,4% de la variancia total del sistema, según el criterio de *eigenvalue* mayor al valor promedio. A los fines ilustrativos se graficó además el segundo CP, que explicó el 7,8% de la variancia.

Figura 15. Perfiles peptídicos del extracto soluble en agua de los quesos T, E1 y E2 de la primera réplica del ensayo 4, a los 60 días de maduración. Los caracteres de la “a” a la “y” indican los picos seleccionados para el análisis multivariante. Los perfiles correspondientes a las otras dos réplicas fueron similares.



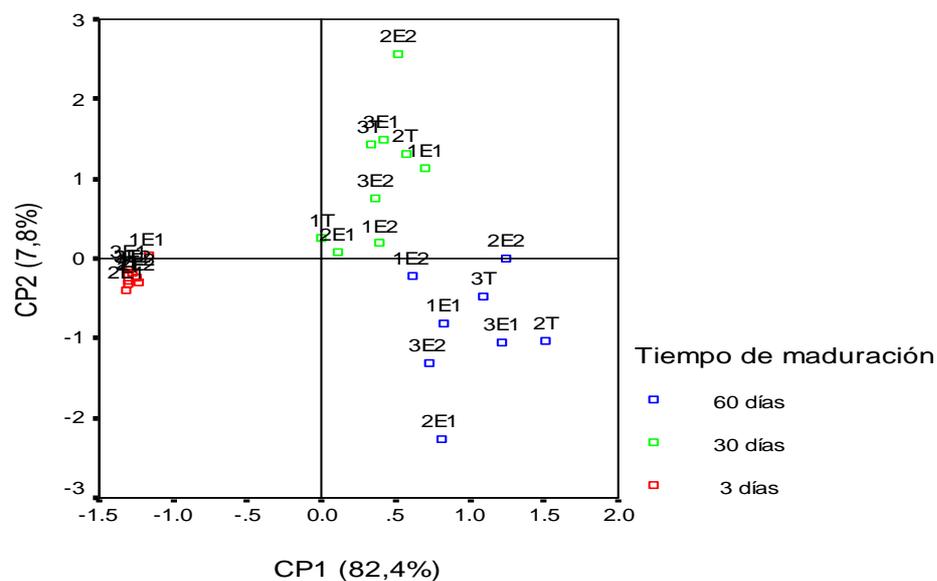
En el gráfico de los *scores* de las muestras (Figura 16a) se observó un agrupamiento de las mismas únicamente según el tiempo de maduración, detectando una muy escasa variabilidad a los 3 días, siendo más variables las muestras de 30 y 60 días.

En el gráfico de los *loadings* (Figura 16b), se observó que todas las variables tuvieron impacto positivo en CP1. En el caso de CP2, los picos de bajo tiempo de retención, correspondientes a péptidos de baja hidrofobicidad (**b, e, i, j y w**), mostraron *loadings* negativos, mientras que los picos con alto tiempo de retención, que se caracterizan por una mayor hidrofobicidad (**l, p, s, v e y**), impactaron positivamente. A

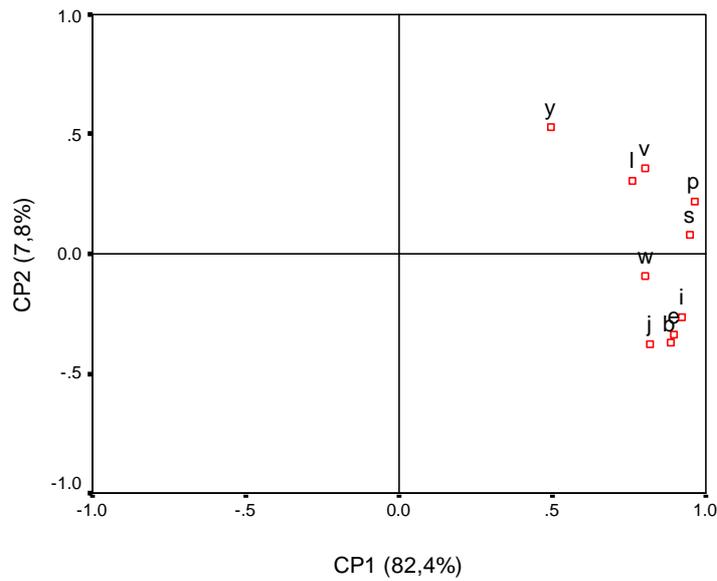
lo largo del eje del CP1 en el gráfico de los *scores* (Figura 16a), se formaron agrupaciones de las muestras de cuajada (3 días), y de los quesos parcial y completamente maduros (30 y 60 días), debido a que se verificó un aumento de todos los picos durante la maduración. Las muestras de 3 días se caracterizaron por valores bajos para todas las variables. Por otro lado, CP2 permitió la diferenciación de los quesos de la etapa intermedia y del final de maduración, debido a que las variables con valores positivos para CP2 caracterizaron a las muestras de 30 días, mientras que las variables con valores negativos fueron más típicas de las muestras de 60 días. Sin embargo, debe considerarse que la variancia explicada por este CP es baja.

Figura 16. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC en el ensayo 4. a) Gráfico de los *scores* de las muestras (el número anterior a cada tipo de queso indica la réplica de elaboración). b) Gráfico de los *loading* de las variables.

a)



b)

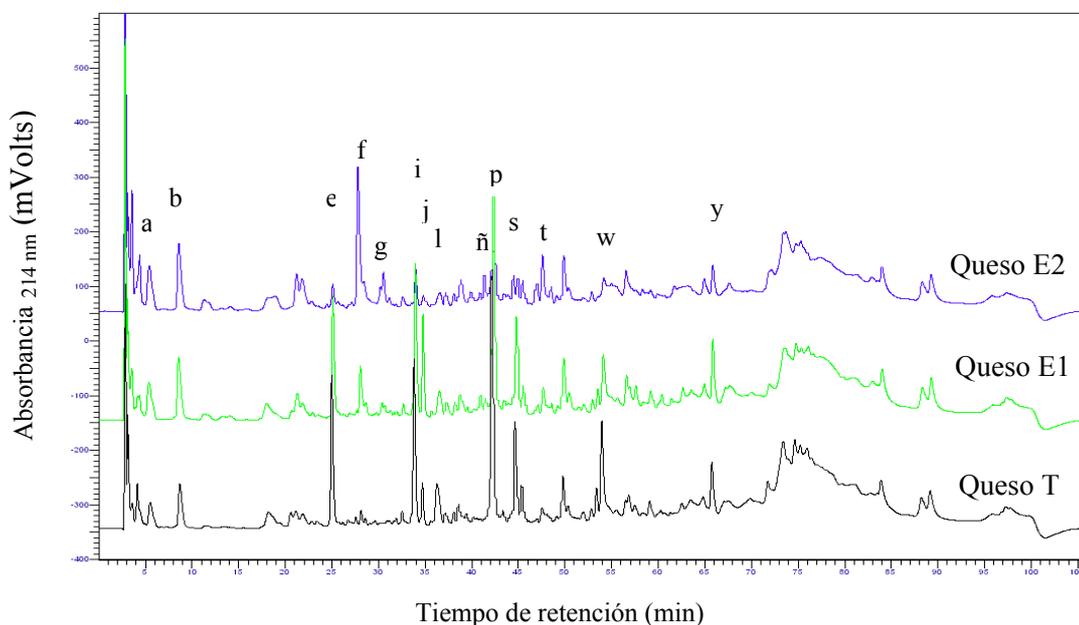


5.3.5- Ensayo 5: *Lactobacillus acidophilus* C.

Se seleccionaron 16 picos de los cromatogramas, pero luego de un análisis preliminar, se eliminaron dos variables (**n** y **x**), debido a su baja correlación con las otras variables y de su valor de comunalidad (proporción de variancia explicada en el análisis). Los 14 picos restantes, que se utilizaron como variables en el ACP, se muestran en los perfiles de los diferentes tipos de queso a los 60 días de maduración en la figura 17.

Se realizó el ACP y se extrajeron dos componentes principales que explicaron el 89,8%: CP1 73,7% y CP2 16,1%.

Figura 17. Perfiles peptídicos del extracto soluble en agua de los quesos T, E1 y E2 de la primera réplica del ensayo 5, a los 60 días de maduración. Los caracteres de la “a” a la “y” indican los picos seleccionados para el análisis multivariante. Los perfiles correspondientes a las otras dos réplicas fueron similares.



En el gráfico de los *scores* de las muestras (Figura 18a) se observó un agrupamiento según tipo de queso y tiempo de maduración. Los grupos según el tipo de queso se evidenciaron a lo largo de los dos ejes, diferenciándose principalmente los quesos T y E1 de los quesos E2, lo que resultó claro a los 30 y 60 días, y ya pudo observarse en las muestras de 3 días. Además de esta diferenciación, hubo un agrupamiento de menor magnitud pero igualmente detectable entre los quesos T y E1, sobre todo a 30 y 60 días. Esta separación se produjo a lo largo del eje del CP2.

La agrupación según el tiempo de maduración también se manifestó a lo largo de ambos ejes, y varió de acuerdo al tipo de queso. Los quesos E2 se distribuyeron según la maduración a lo largo del eje del CP2, mientras que los quesos T y E1 lo hicieron principalmente a lo largo del eje del CP1.

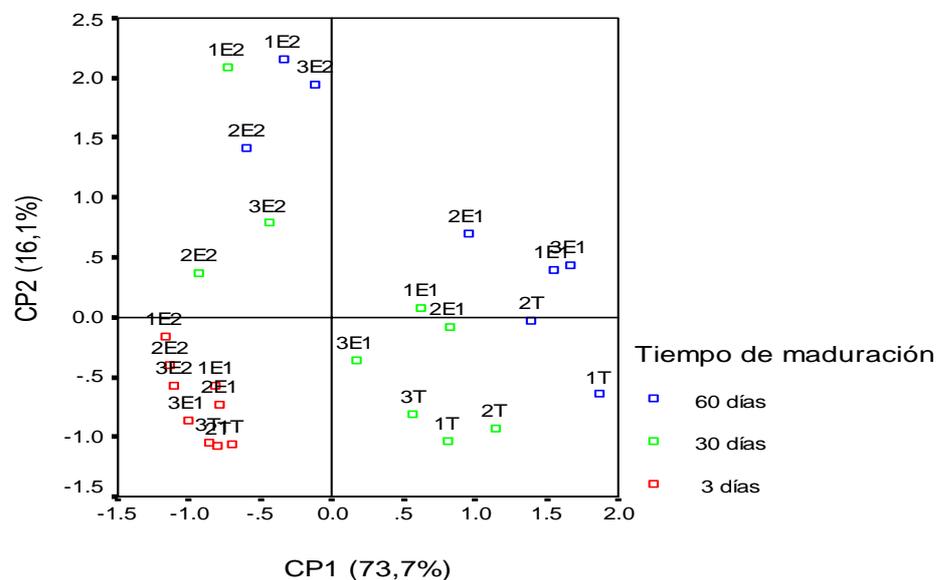
Analizando los gráficos de *scores* y de *loading* (Figuras 18a y b), se detectó que las muestras de 3 días se caracterizaron por pequeños valores de todas las variables. Los picos con alto impacto en CP1: **e, i, j, l, p, s, w** e **y**, aumentaron durante la maduración en los quesos T y E1, siendo característicos de los primeros los picos con *loading* negativos para CP2, mientras que aquellos con influencia positiva caracterizaron a los quesos E1. Por otro lado, las variables con altos *loading* para CP2: **f, g** y **ñ**, caracterizaron el proceso de maduración de los quesos E2. Finalmente, los picos con

impacto elevado tanto para CP1 como para CP2: a, b y t, aumentaron en forma similar durante la maduración de todos los quesos, principalmente en los experimentales.

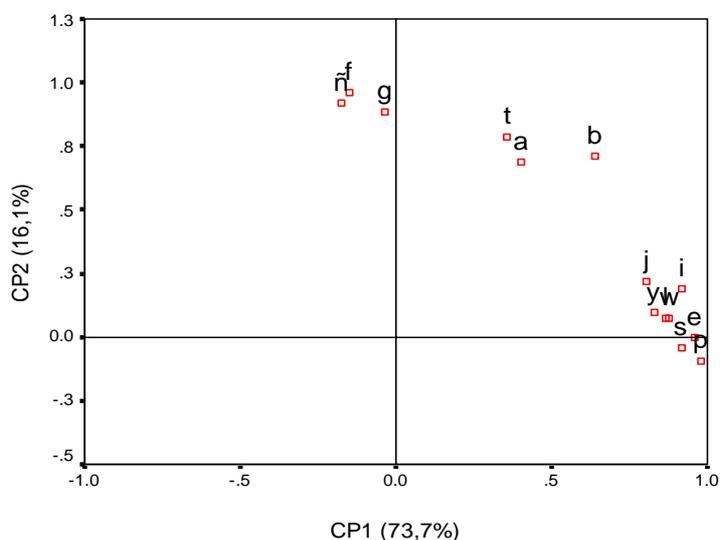
La influencia del fermento probiótico *L. acidophilus* C sobre los perfiles peptídicos fue importante en este ensayo, y dicho impacto fue más notorio cuando se agregó en el SLG (quesos E2).

Figura 18. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC en el ensayo 5. a) Gráfico de los *scores* de las muestras (el número anterior a cada tipo de queso indica la réplica de elaboración). b) Gráfico de los *loading* de las variables.

a)



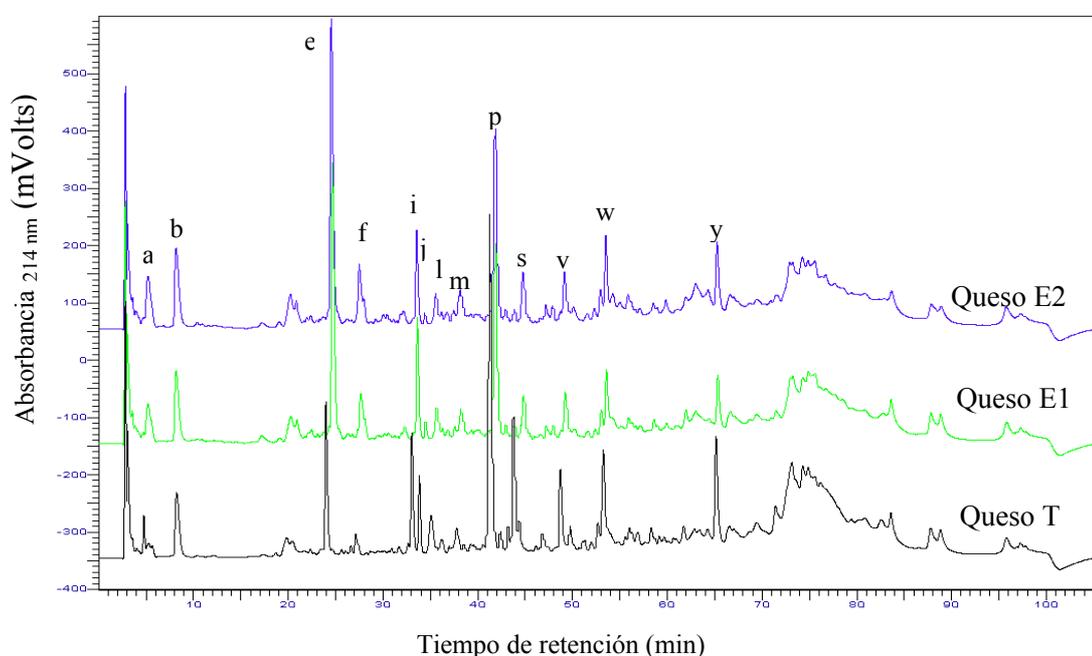
b)



5.3.6- Ensayo 6: *Lactobacillus casei*.

En este ensayo, trece fueron los picos seleccionados de los perfiles peptídicos para su estudio mediante un ACP (Figura 19), todos los cuales demostraron ser variables adecuadas para dicho análisis debido a sus altos valores de correlación entre sí. Se extrajeron dos componentes principales que explicaron el 95,8% de la variación total: CP1 80,4% y CP2 15,4%.

Figura 19. Perfiles peptídicos del extracto soluble en agua de los quesos T, E1 y E2 de la primera réplica del ensayo 6, a los 60 días de maduración. Los caracteres de la “a” a la “y” indican los picos seleccionados para el análisis multivariante. Los perfiles correspondientes a las otras dos réplicas fueron similares.



En el gráfico de los *scores* de las muestras (Figura 20a) se observó la formación de grupos de muestras principalmente por tiempo de maduración a lo largo del eje del CP1, presentando las muestras de 3 días una muy escasa variabilidad. Sobre el eje del CP2, en cambio, las muestras se agruparon según el tipo de queso, diferenciándose los quesos T de ambos quesos experimentales. Las muestras de quesos T de 30 y 60 días resultaron más diferentes entre sí que las muestras de quesos experimentales a los mismos tiempos de maduración.

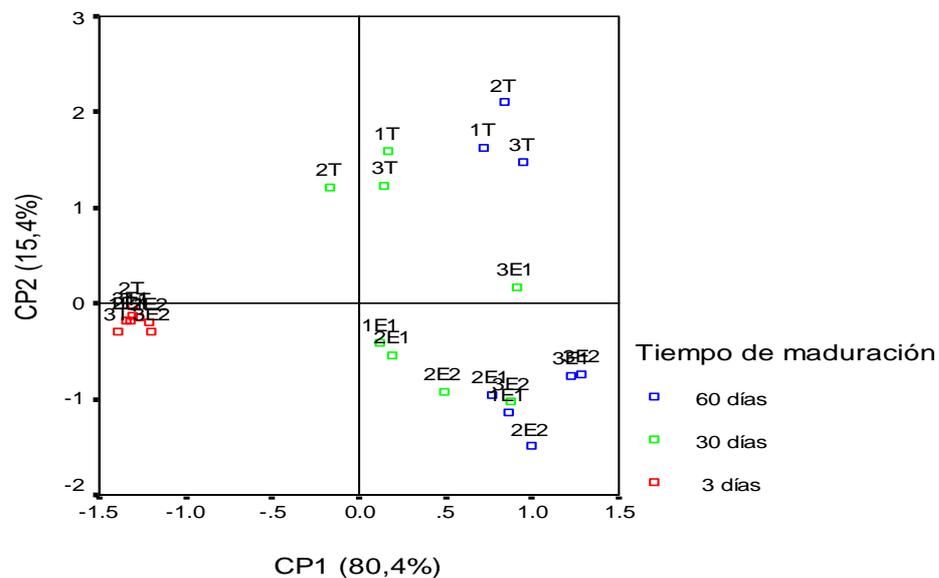
Analizando en forma conjunta el gráfico de *scores* y de *loading* (Figuras 20a y b) se detectó, al igual que en los anteriores ensayos, que las muestras de 3 días se

caracterizaron por pequeños valores de todas las variables. Los picos con elevados *loading* positivos en CP2 fueron característicos de los quesos T, sobre todo los picos **j** y **s**, quienes presentaron los valores mayores en este eje. Por otro lado, los picos con elevados *loading* negativos en CP2 fueron mayores en los quesos experimentales, sobre todo **a**, **e** y **f**, y en menor medida **m**. La variable **b**, con un coeficiente cercano a cero en CP2 aumentó de manera similar en todos los tipos de queso.

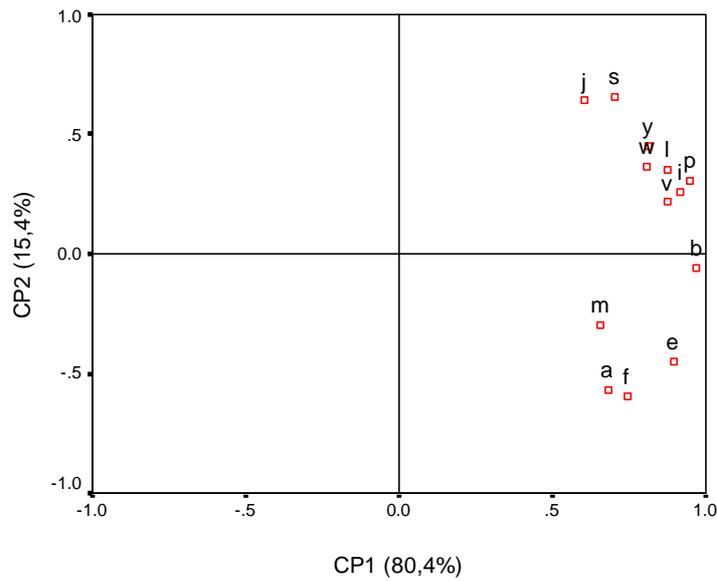
Ninguna diferenciación se observó entre ambos quesos experimentales, lo que indicó que la metodología de adición del fermento probiótico en este caso no influyó en el perfil peptídico de los quesos.

Figura 20. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC en el ensayo 6. a) Gráfico de los *scores* de las muestras (el número anterior a cada tipo de queso indica la réplica de elaboración). b) Gráfico de los *loading* de las variables.

a)



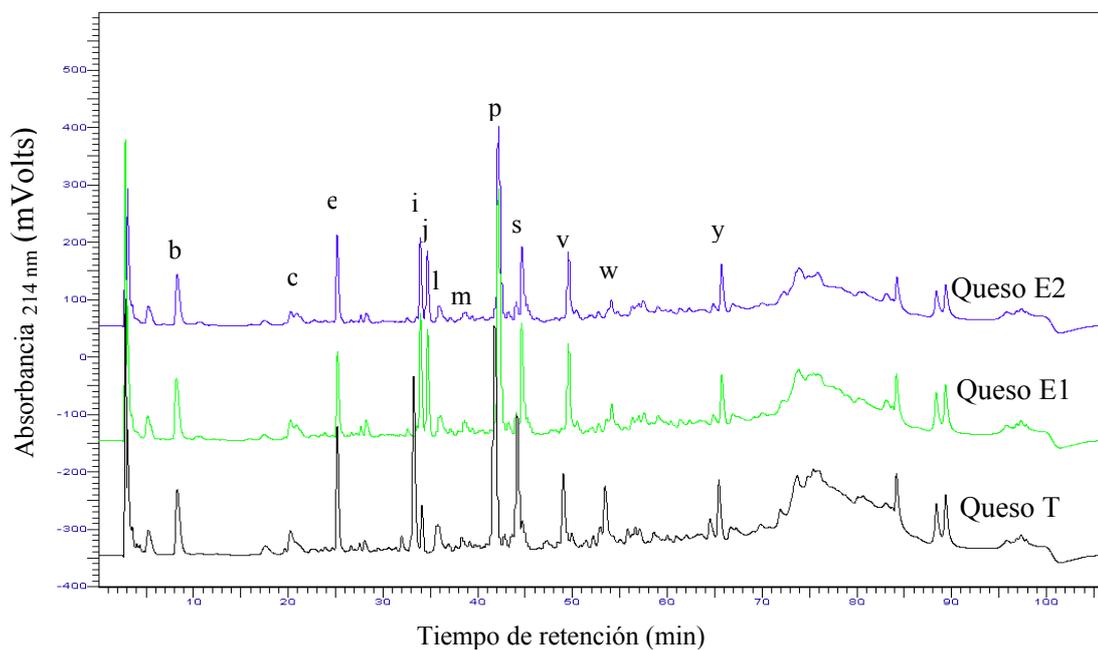
b)



5.3.7- Ensayo 7: *Lactobacillus rhamnosus*.

Se seleccionaron 12 picos de los perfiles peptídicos para la aplicación de ACP (Figura 21).

Figura 21. Perfiles peptídicos del extracto soluble en agua de los quesos T, E1 y E2 de la primera réplica del ensayo 7, a los 60 días de maduración. Los caracteres de la “b” a la “y” indican los picos seleccionados para el análisis multivariante. Los perfiles correspondientes a las otras dos réplicas fueron similares.



Todas las variables resultaron adecuadas para el análisis, de acuerdo a los resultados de ensayos preliminares sobre los datos. Con el criterio de *eigenvalue* mayor al valor promedio se extrae solamente el primer CP. Como en el caso del ensayo 4, a los fines de graficar los *scores* y *loading*, se tuvieron en cuenta los dos primeros componentes, con el objetivo de facilitar la interpretación de los datos. Los dos primeros CPs extrajeron el 94,8% de la variación: CP1 90,6% y CP2 4,2%

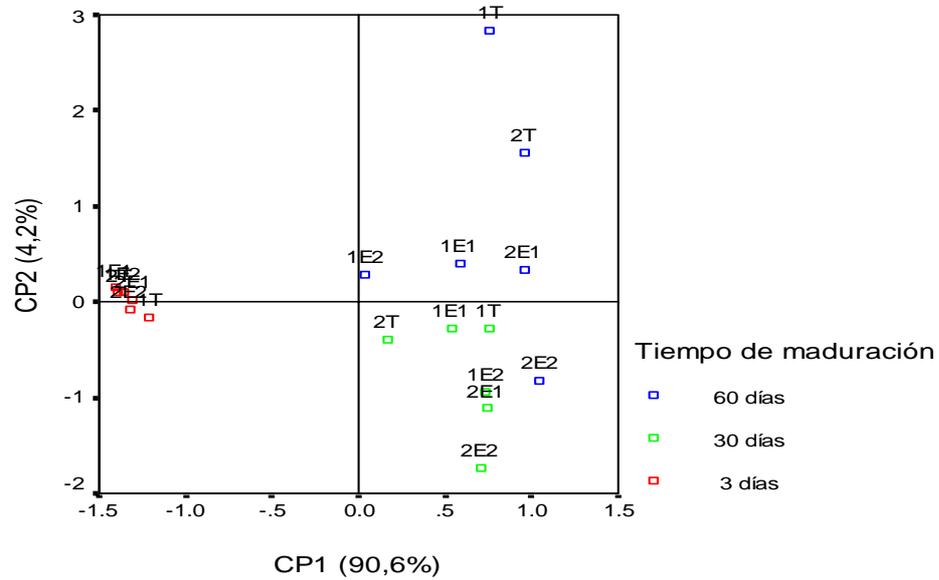
En el gráfico de los *scores* (Figura 22a) se pudo observar que las muestras se agruparon por tiempo de maduración a lo largo de CP1, específicamente las muestras de 3 días se separaron del resto. A lo largo del eje del CP2 se detectó principalmente el agrupamiento de las muestras de 30 y 60 días. Entre las muestras de 60 días, se encontraron grupos separados para quesos testigo y experimentales. Asimismo, al igual que en el ensayo 6, se pudo notar una menor variación en los quesos experimentales a los 30 y 60 días, y una mayor variación en los quesos testigos a los mismos tiempos de maduración.

Todas las variables presentaron altos valores de *loading* para CP1, siendo por lo tanto importante su variación con la maduración de 3 a 30/60 días (Figura 22b). En cuanto a los *loading* de las variables para CP2, se observaron cuatro variables con valores negativos y el resto con valores positivos. Las variables **j**, **p**, **v**, **s** e **y** (en general, las más hidrofóbicas por sus mayores tiempos de retención), con valores negativos, caracterizaron a las muestras de 30 días, mientras que aquellas con valores positivos: **b**, **c**, **e**, **i**, **l**, **m** y **w** (en general los menos hidrofóbicos) caracterizaron a las muestras de 60 días. Además, se observó que las variables con mayor impacto positivo para CP2, sobre todo **c** y **w**, y en menor medida **e**, **i** y **l**, identificaron a los quesos T de 60 días. Sin embargo, se debe recordar que CP2 explicó solamente 4,2% de la variancia del sistema.

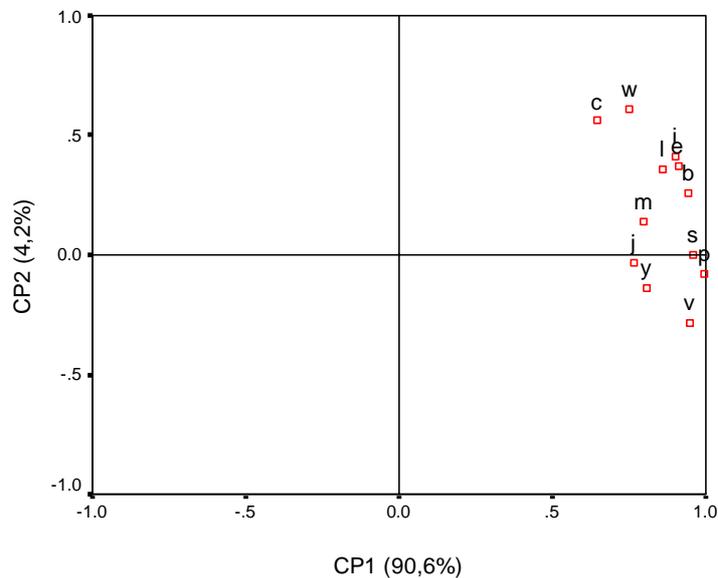
No se detectó influencia de la metodología de adición del fermento probiótico sobre los perfiles peptídicos en los quesos experimentales.

Figura 22. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC en el ensayo 7. a) Gráfico de los *scores* de las muestras (el número anterior a cada tipo de queso indica la réplica de elaboración). b) Gráfico de los *loading* de las variables.

a)



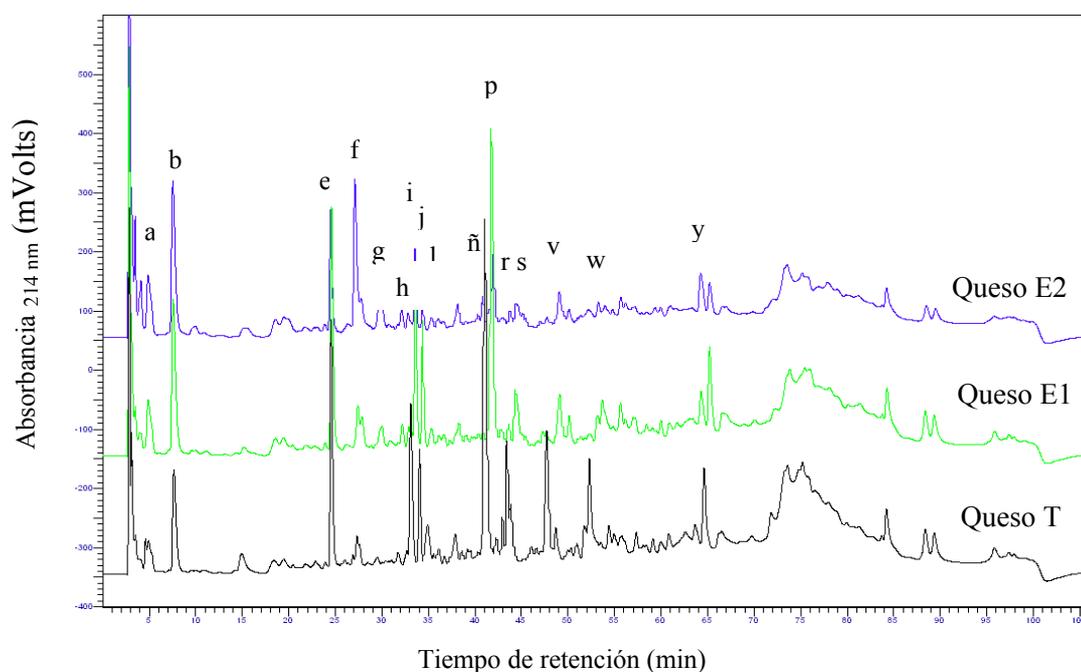
b)



5.3.8- Ensayo 8: fermento probiótico mixto: *L. acidophilus* C, *L. paracasei* y *B. lactis*.

Debido a una mayor complejidad de los perfiles peptídicos, se seleccionaron 19 picos para el ACP. Luego del análisis preliminar, tres de las variables elegidas (**n**, **q** y **x**) fueron eliminadas por presentar bajo nivel de correlación. Se aplicó el ACP a las 16 variables restantes (Figura 23), y se extrajeron los dos primeros componentes principales, que explicaron el 91,3% de la variación: CP1 68,9% y CP2 22,4%.

Figura 23. Perfiles peptídicos del extracto soluble en agua de los quesos T, E1 y E2 de la primera réplica del ensayo 8, a los 60 días de maduración. Los caracteres de la “a” a la “y” indican los picos seleccionados para el análisis multivariante. Los perfiles correspondientes a las otras dos réplicas fueron similares.



En el gráfico de los *scores* (Figura 24a) se observó claramente que las muestras formaban agrupamientos según el tiempo de maduración y el tipo de queso, a lo largo de los dos componentes principales. Los quesos E2 se agruparon solos a 30 y a 60 días de maduración. También a 3 días fue posible observar cierta tendencia a la separación de estos quesos con respecto a los quesos T y E1. Asimismo, dentro del grupo formado por los quesos T y E1, también se evidenció una separación entre ambos tipos de quesos, tanto a 30 como a 60 días, aunque la misma fue menor que la observada para los quesos E2.

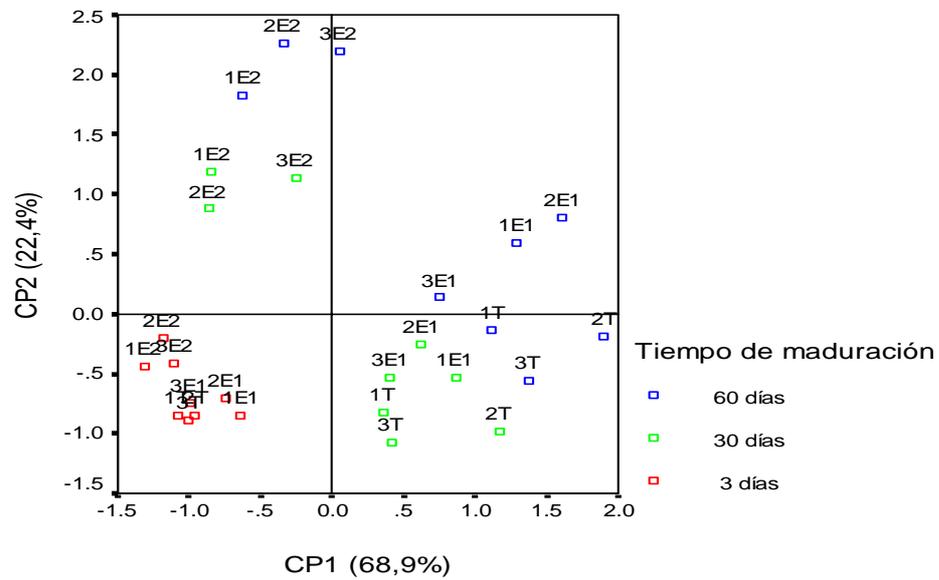
Las muestras se agruparon en el plano definido por ambos ejes, de acuerdo al tiempo de maduración y al tipo de queso. Los quesos E2 se agruparon según el tiempo de maduración a lo largo de CP2, mientras que los quesos T y E1 lo hicieron a lo largo del eje del CP1 principalmente.

De los valores de los *scores* y *loading* (Figuras 24a y b) se observó que las muestras de 3 días se caracterizaron por valores pequeños de todos los picos. Las variables con alto impacto en CP2, **f**, **g** y **ñ**, fueron típicas de la maduración de los quesos E2. Por otro lado, los picos con elevados *loading* en CP1 fueron más característicos de los quesos T y E1: **e**, **i**, **j**, **l**, **p**, **r**, **s**, **v**, **w** e **y**. Entre ellos, los picos con *loading* negativos para CP2 (**l**, **p**, **s**, **v** e **y**) resultaron distintivos de las muestras de 30 días de los quesos T y E1 y de las muestras de 60 días de los quesos T, mientras que aquellos con *loading* positivos (**e**, **i**, **j**, **r** y **w**) describieron mejor a las muestras de quesos E1 de 60 días. Finalmente, los picos **a**, **b** y **h** aumentaron de manera similar durante la maduración en todos los quesos, principalmente en los experimentales.

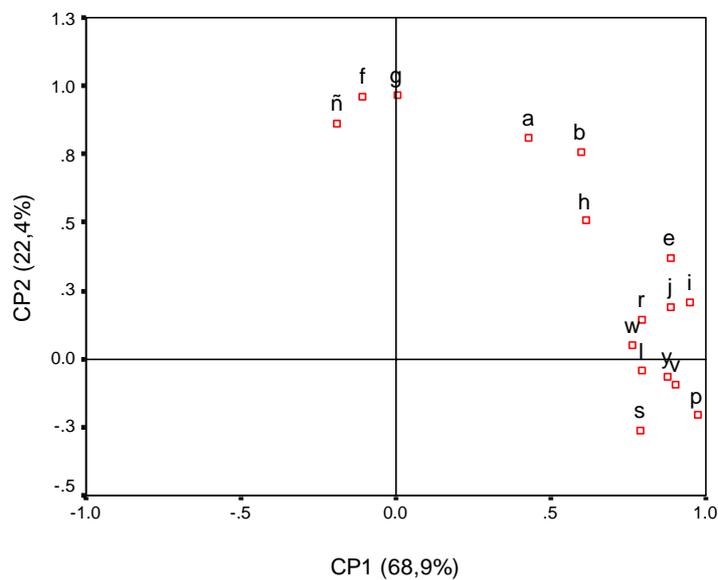
El fermento probiótico agregado a los quesos luego de la preincubación en el SLG demostró tener una mayor influencia en la proteólisis evidenciada por mapas peptídicos que cuando se adicionó directamente.

Figura 24. Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos obtenidos por HPLC en el ensayo 8. a) Gráfico de los *scores* de las muestras (el número anterior a cada tipo de queso indica la réplica de elaboración). b) Gráfico de los *loading* de las variables.

a)



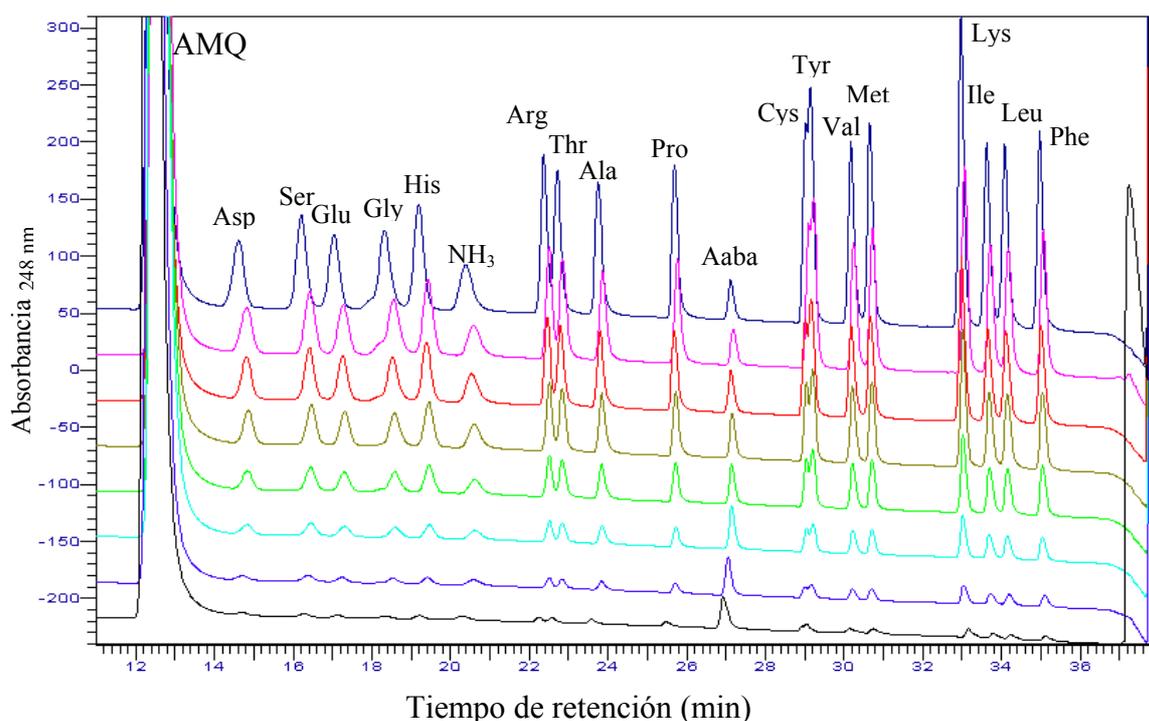
b)



5.4- Aminoácidos libres (AAL)

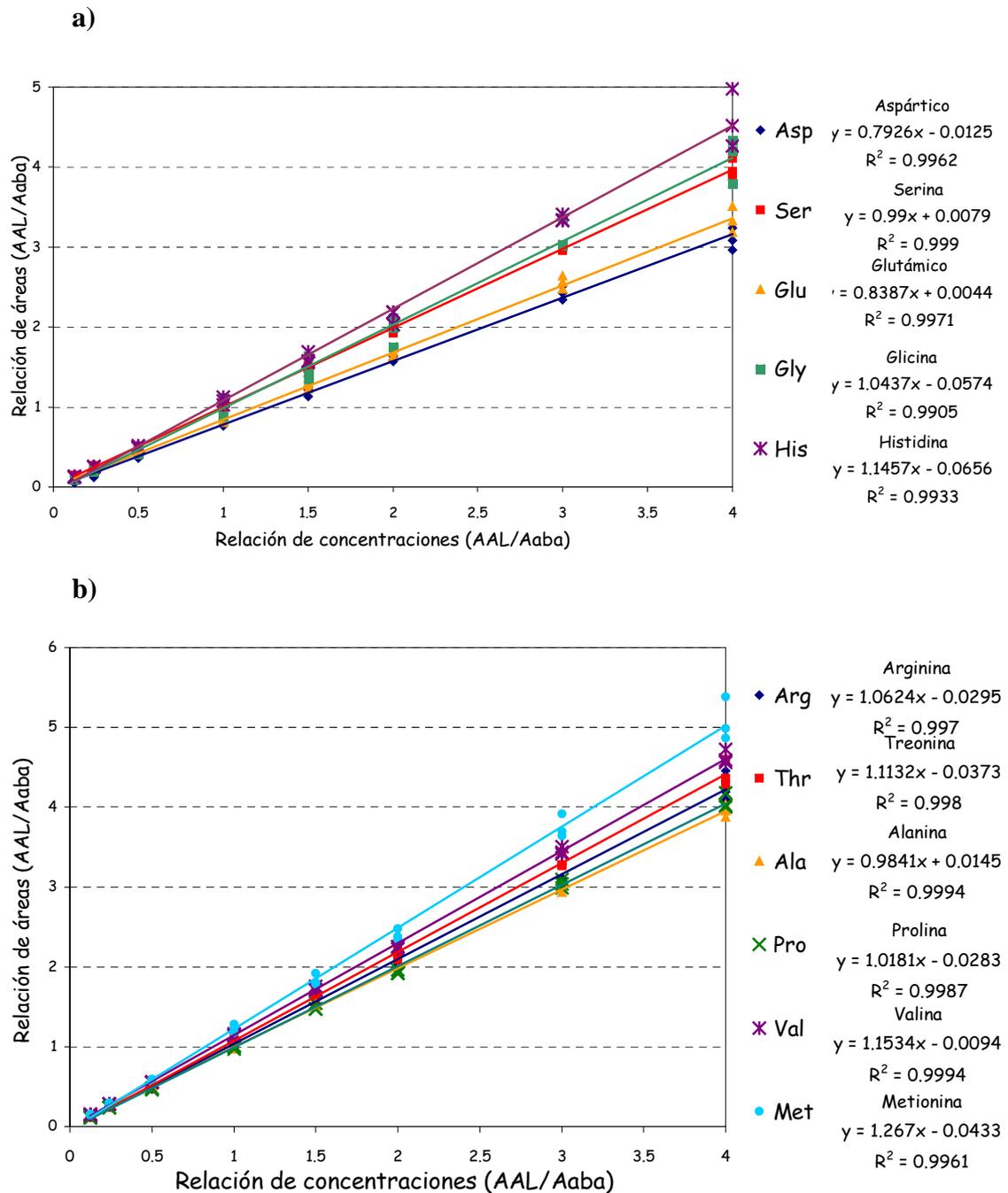
El método seleccionado para la cuantificación de AAL en el queso resultó adecuado y pudo ser adaptado con éxito a la detección UV en lugar de la detección por fluorescencia. En la figura 25 se presentan los cromatogramas correspondientes a las soluciones de los estándares. La resolución fue satisfactoria y permitió la cuantificación de los siguientes 16 AA: ácido aspártico (Asp), serina (Ser), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), histidina (His), arginina (Arg), treonina (Thr), alanina (Ala), prolina (Pro), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), lisina (Lys), isoleucina (Ile), leucina (Leu) y fenilalanina (Phe).

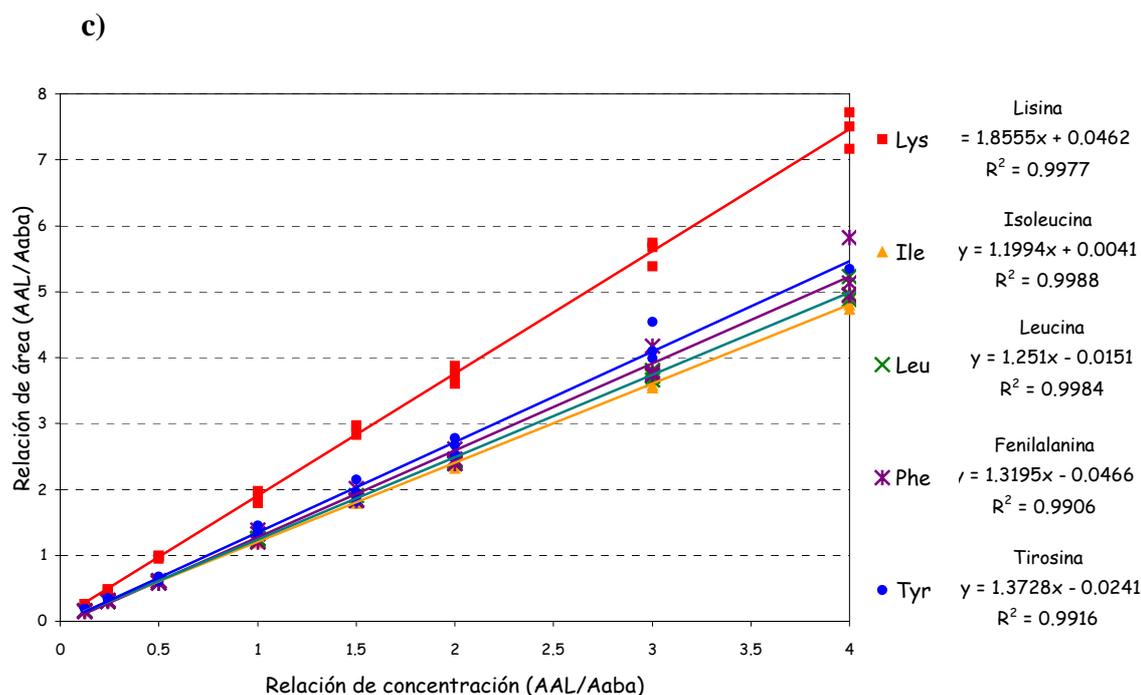
Figura 25. Cromatogramas de las soluciones de estándares, con la identificación de los picos de los AAL. Se presentan los cromatogramas en orden creciente de concentración de abajo hacia arriba, desde 6,25 a 200 μM de cada AA.



La cuantificación se llevó a cabo mediante la obtención de una curva de calibrado para cada AA, utilizando como estándar interno ácido α -aminobutírico (Aaba). En la figura 26 se consignan las curvas de calibrado, las ecuaciones de regresión, y los coeficientes de correlación.

Figura 26. Curvas de calibrado de los AAL. a) Ácido aspártico, serina, ácido glutámico, glicina e histidina; b) Arginina, treonina, alanina, prolina, valina y metionina; c) Lisina, isoleucina, leucina, fenilalanina y tirosina.





El extracto del queso soluble en agua resultó ser adecuado para realizar la reacción de derivatización de aminoácidos y su posterior cuantificación mediante HPLC. En los cromatogramas de las muestras se observaron los picos de los aminoácidos derivatizados, claramente visualizados e identificados mediante la comparación de los tiempos de retención con el del estándar. Solamente en un escaso número de ocasiones se presentaron algunos problemas de solapamiento.

Los picos correspondientes a tirosina y cisteína, que eluyen en un período de tiempo muy corto, se presentaron parcialmente solapados en los perfiles cromatográficos de los estándares. En las muestras de queso, en general se detectó un único pico, que se consideró como 100% tirosina, ya que el contenido de cisteína en el queso es bajo (Walstra y col., 1999a).

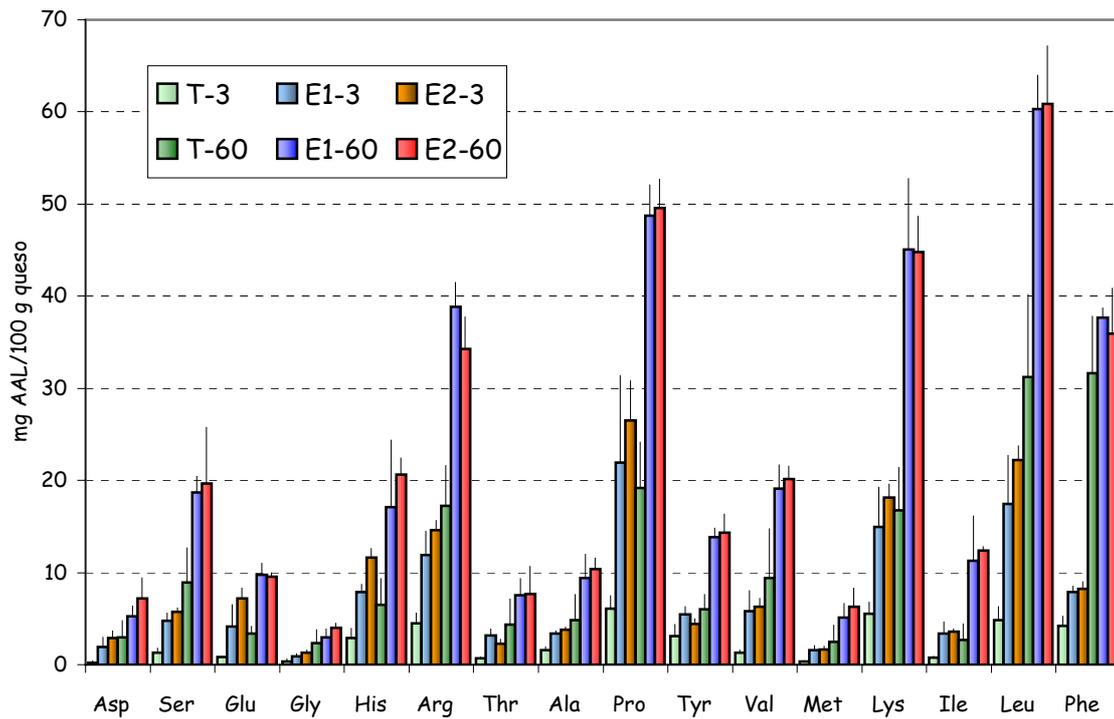
El ácido aspártico se logró cuantificar, a pesar de que su tiempo de retención es muy próximo al del reactivo de derivatización, que se agrega en exceso, y en las muestras se encuentra como el producto de hidrólisis en gran cantidad. Por este motivo, la determinación del Asp fue más precisa a los 30 y 60 días, cuando el pico correspondiente era mayor, que a los 3 días, cuando su concentración en el queso aún era baja.

En la figura 27 se presentan los perfiles de aminoácidos libres obtenidos para los quesos de cada ensayo. La tabla 14 contiene los resultados del análisis de ANOVA

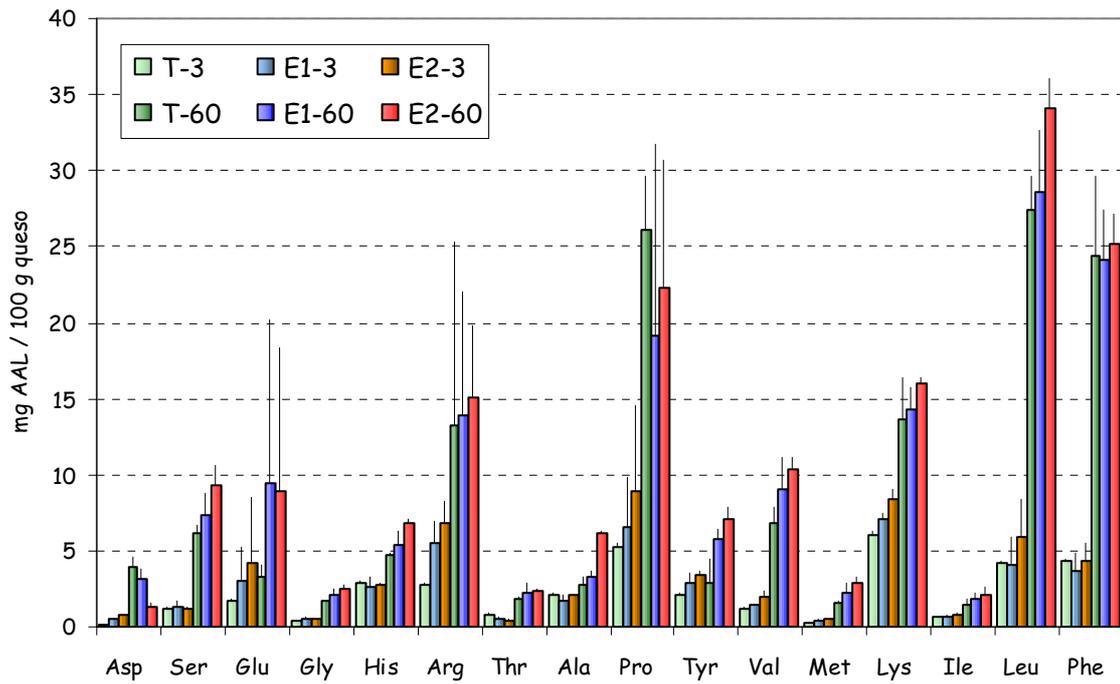
sobre el contenido de cada aminoácido libre en los quesos a los 3 y 60 días de maduración.

Figura 27. Perfiles de aminoácidos libres de los quesos elaborados, a los 3 y 60 días de maduración. Se presentan los valores medios \pm desviación estándar de tres quesos (réplicas).

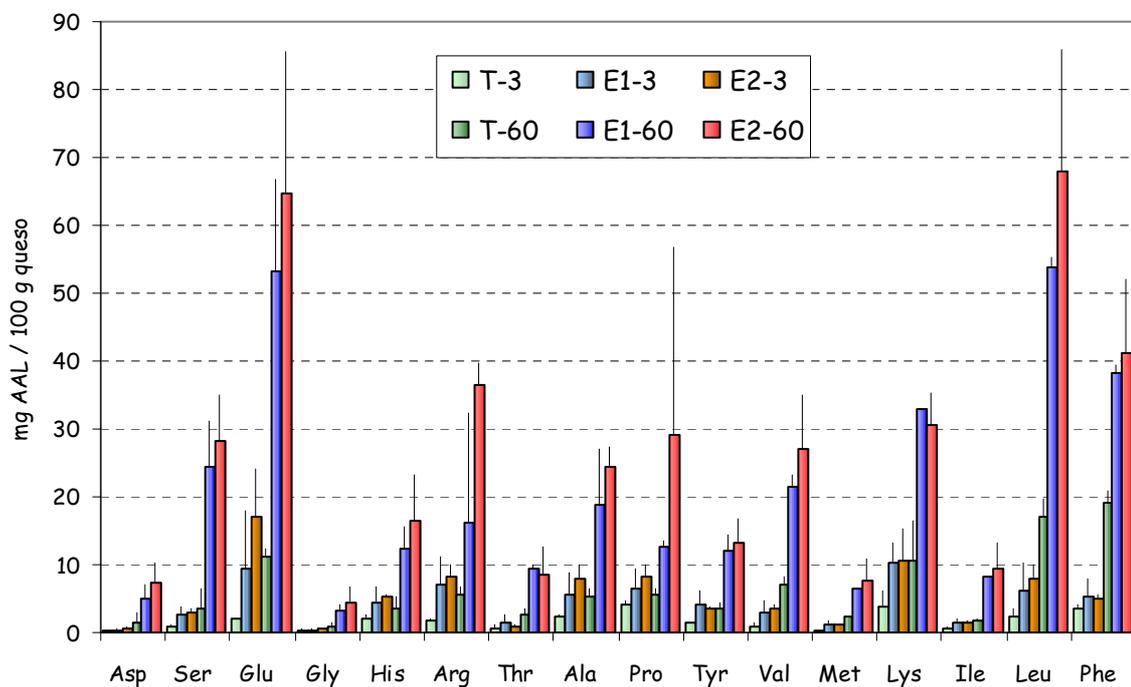
a) Ensayo 1: *L. acidophilus* A.



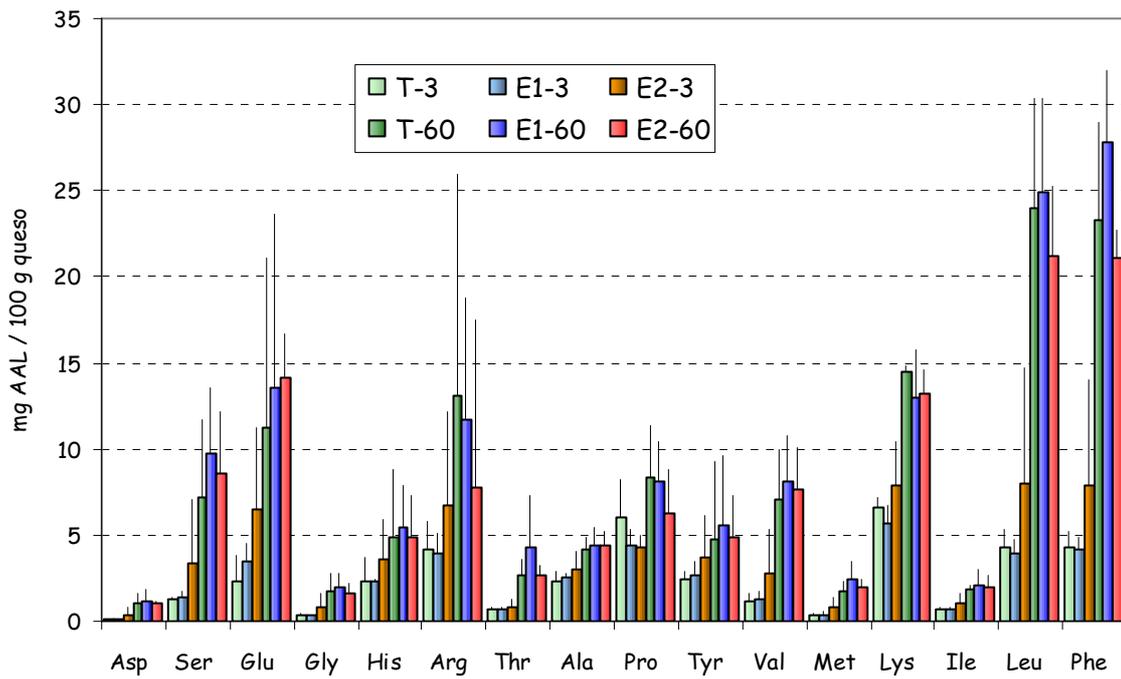
b) Ensayo 2: *L. paracasei* subsp. *paracasei*.



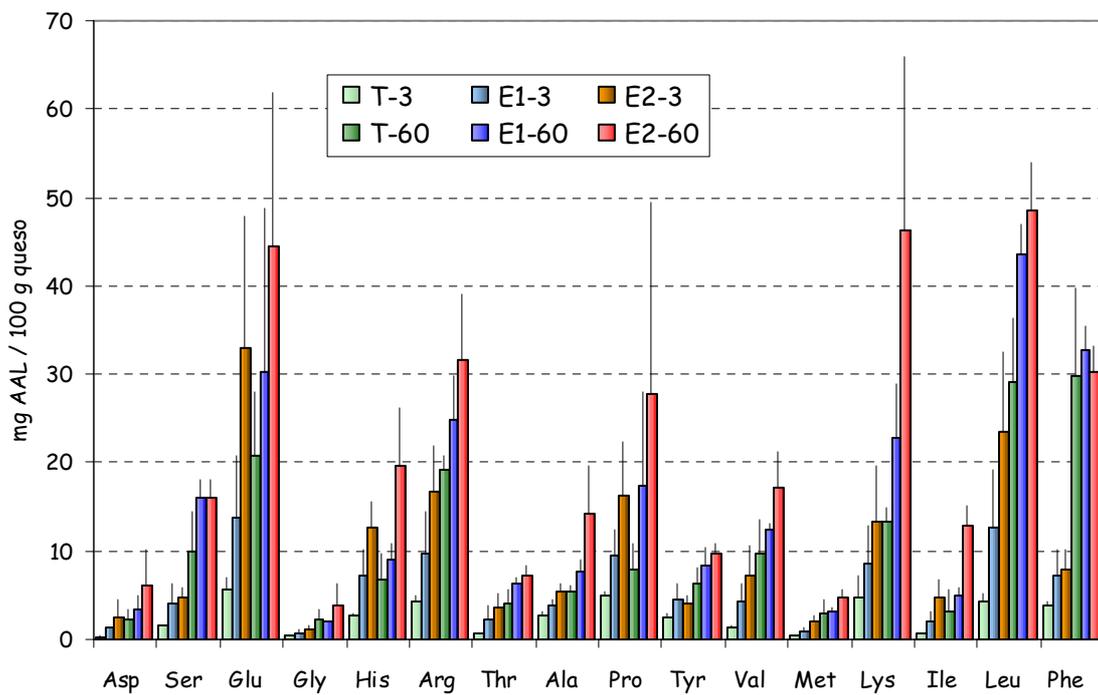
c) Ensayo 3: *Lactobacillus acidophilus* B.



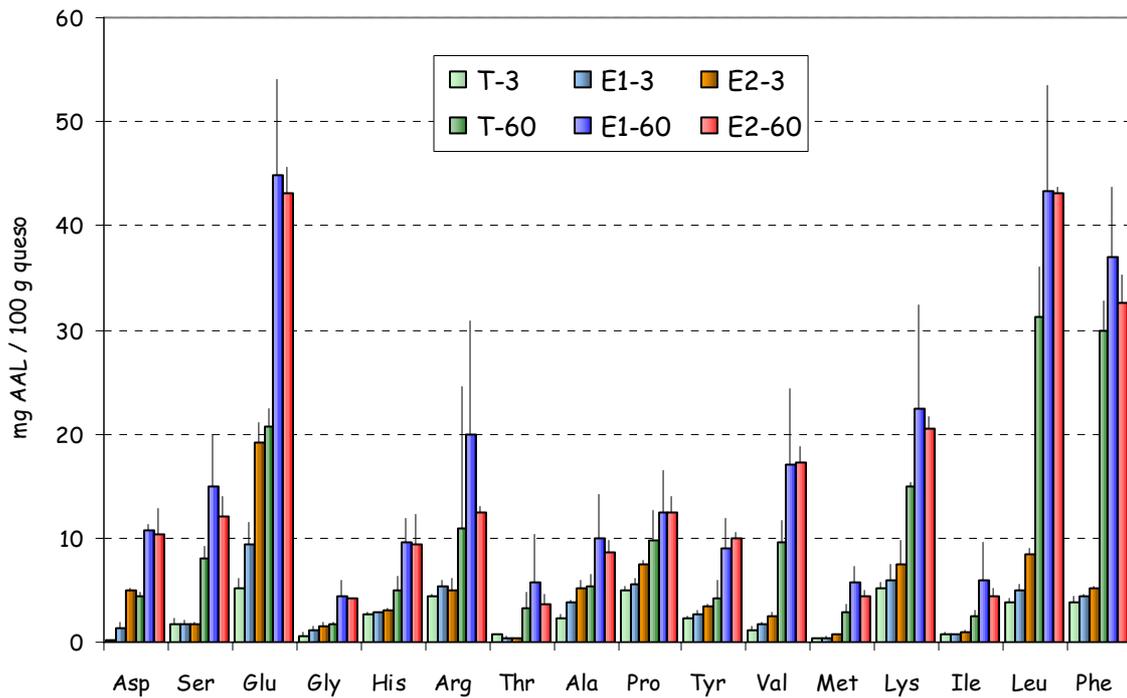
d) Ensayo 4: *Bifidobacterium lactis*.



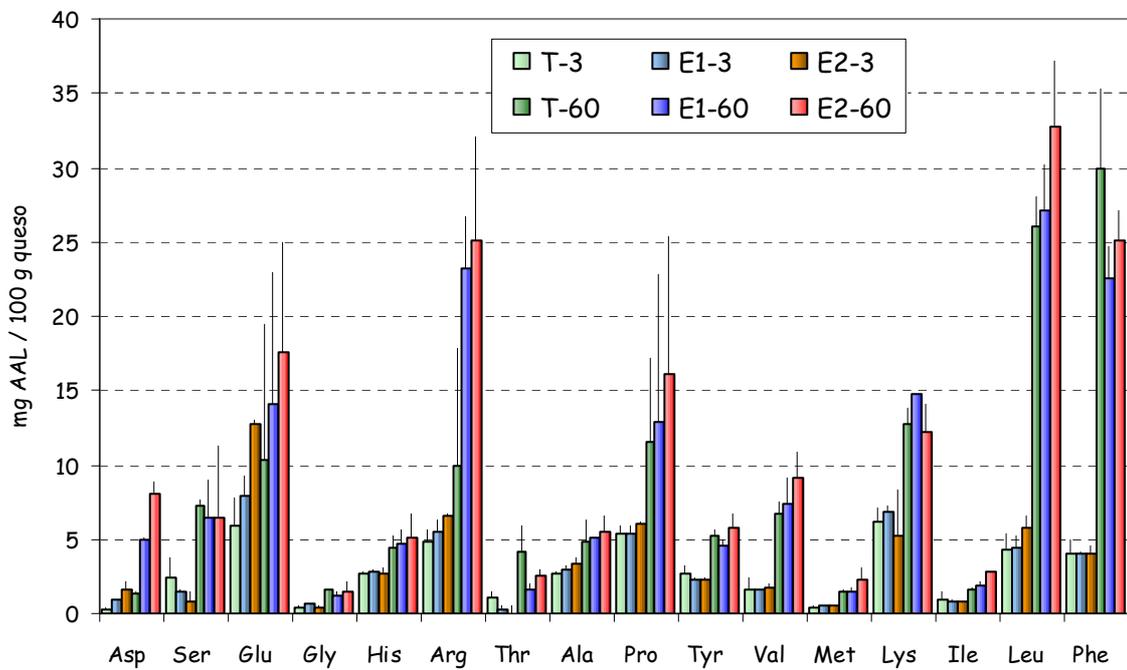
e) Ensayo 5: *Lactobacillus acidophilus* C.



f) **Ensayo 6:** *Lactobacillus casei*.



g) **Ensayo 7:** *Lactobacillus rhamnosus*.



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

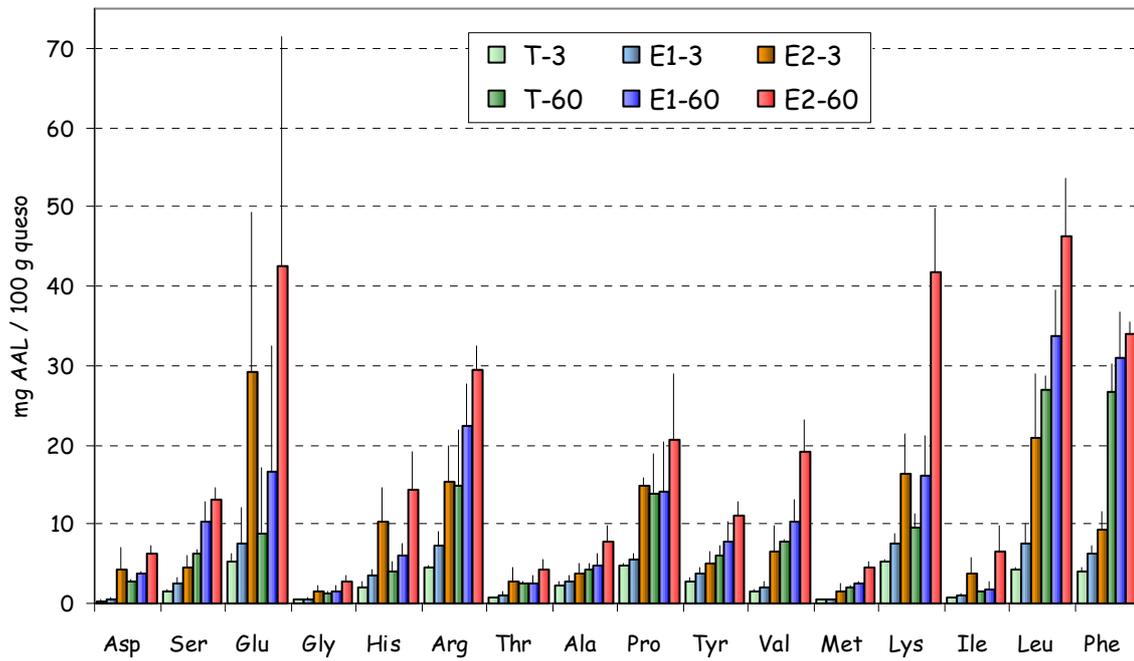


Tabla 14. Análisis de ANOVA del contenido de aminoácidos libres en los quesos en cada ensayo a los 3 y 60 días de maduración.

Aminoácido libre	Ensayo 1 <i>L. acidophilus</i> A		Ensayo 2 <i>L. paracasei</i>		Ensayo 3 <i>L. acidophilus</i> B		Ensayo 4 <i>B. lactis</i>		Ensayo 5 <i>L. acidophilus</i> C		Ensayo 6 <i>L. casei</i>		Ensayo 7 <i>L. rhamnosus</i>		Ensayo 8 Tres cepas	
	3	60	3	60	3	60	3	60	3	60	3	60	3	60	3	60
Aspártico	*	-	-	*	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*
Serina	*	*	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*
Glutámico	*	*	-	-	-	-	-	-	*	-	*	*	-	*	-	-
Glicina	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-
Histidina	*	*	-	*	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	*	*
Arginina	*	*	-	-	-	*	-	-	*	-	-	-	-	-	*	*
Threonina	*	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	-	-	*	-
Alanina	*	-	-	*	-	*	-	-	*	*	*	-	-	-	-	-
Prolina	*	*	-	-	-	-	-	-	*	-	*	-	-	-	*	-
Tirosina	-	*	-	*	-	*	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-
Valina	*	*	-	-	-	*	-	-	-	-	*	-	-	-	*	*
Metionina	*	-	-	-	-	-	-	-	*	-	*	-	-	-	*	*
Lisina	*	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	-	*	*
Isoleucina	*	*	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	*	-	*	*
Leucina	*	*	-	-	-	*	-	-	*	*	*	-	-	-	*	*
Phenilalanina	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	*	-
Aminoácidos libres totales	*	*	-	-	-	*	-	-	*	*	*	*	-	-	*	*

- No se encontraron diferencias significativas.

* Diferencias significativas ($\alpha = 0,05$). Diferentes colores indican diferentes grupos de medias homogéneas:

T ≠ E1 ≠ E2

T ≠ E1/E2

T/E1 ≠ E2

T/E1 ≠ E1/E2

T/E2 ≠ E1/E2

En la mayoría de los casos, el contenido individual de aminoácidos libres en los quesos resultó afectado por la incorporación de bacterias probióticas como fermento adjunto. La magnitud de dicho impacto varió según la cepa utilizada y en algunos casos también con la metodología de adición del fermento.

Las mayores diferencias fueron detectadas en los ensayos siguientes: **1** (*L. acidophilus* A), **3** (*L. acidophilus* B), **5** (*L. acidophilus* C), **6** (*L. casei*) y **8** (tres cepas).

En el ensayo 1 (*L. acidophilus* A) se observó un incremento del contenido individual de la mayoría de los AAL en ambos quesos experimentales, y también en la concentración total de los mismos (Figura 27a, Tabla 14). Esta diferencia estuvo presente tanto a los 3 como a los 60 días de maduración. En casi todos los aminoácidos que mostraron diferencias, el contenido en los quesos T fue distinto que en ambos quesos experimentales. Las mayores diferencias a los 60 días se encontraron en el valor promedio del contenido de Glu, His, Pro, Leu e Ile. El nivel de AAL totales en los quesos experimentales al final de la maduración fue aproximadamente 2 veces mayor que en los quesos testigo.

En el ensayo 3 (*L. acidophilus* B), se observó una mayor concentración de la mayoría de los AAL en ambos quesos experimentales que en los quesos T (Figura 27c). Este hecho se evidenció sobre todo en los quesos E2. Sin embargo, el análisis de ANOVA arrojó diferencias significativas sólo a los 60 días de maduración, y para algunos aminoácidos y el contenido total de los mismos. La concentración de cinco AA (Ser, Ala, Tyr, Lys y Leu) en los quesos T fue diferente que en los quesos experimentales. Otros dos AA (Arg y Val) fueron diferentes entre los quesos T/E1 y E2/E1 (Tabla 14). Como el contenido de cada aminoácido individual es un promedio entre tres réplicas (tres quesos diferentes), en algunos casos se obtuvieron desviaciones estándar considerables, lo que resulta una consecuencia inevitable del impacto del día de fabricación. Por esta razón, el análisis de ANOVA no siempre reflejó las diferencias numéricas que se evidencian en las gráficas. Las mayores diferencias a los 60 días se presentaron en el valor promedio del contenido de Ser, Glu, Arg, Pro e Ile. El nivel de AAL totales al final de la maduración fue aproximadamente 3 y 4 veces mayor en los quesos E1 y E2, respectivamente, que en los quesos T.

En la figura 27e, que muestra los perfiles de aminoácidos de los quesos del ensayo 5 (*L. acidophilus* C), también puede observarse un incremento en el contenido de gran parte de los AAL en los quesos experimentales con respecto a los quesos T. Este aumento fue mayor en los quesos E2 que en los E1 para la mayoría de los AAL. Se

encontraron diferencias significativas en el nivel de varios AAL y en el contenido total de los mismos, tanto a 3 como a 60 días de maduración. En general, el contenido medio de los aminoácidos libres fue diferente en los quesos E2 que en los quesos T o que en los quesos T y E1, observándose de este modo la influencia de la metodología de adición del fermento (Tabla 14). Las mayores diferencias a los 60 días, que fueron entre los quesos E2 y T, se presentaron en los siguientes AAL: Asp, His, Pro, Lys e Ile. El nivel de AAL totales al final de la maduración fue aproximadamente 1,4 y 2 veces mayor en los quesos E1 y E2, respectivamente, que en los quesos T.

En el ensayo 6 (*L. casei*) también se presentaron niveles incrementados de varios AAL (Asp, Glu, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Leu y Phe) en los quesos experimentales (Figura 27f). Las diferencias fueron mayores a los 3 que a los 60 días (Tabla 14). En general, a los 3 días de maduración, el contenido medio de estos aminoácidos fue diferente en los tres tipos de quesos, o bien los quesos E2 fueron distintos de los otros dos. Por el contrario, a los 60 días las diferencias se presentaron entre los quesos T y ambos quesos experimentales, y solamente para cuatro AA (Asp, Glu, Gly y Tyr) (Tabla 14). Las mayores diferencias a los 60 días se presentaron en el valor promedio del contenido de Asp, Glu, Gly, Tyr e Ile. El nivel total de AAL en los quesos experimentales fue alrededor de 1,6 veces mayor que en los quesos T.

En el ensayo 8 (fermento probiótico mixto) el contenido promedio de cada AAL en los quesos E2 fue mayor que en los quesos T. En algunos casos, también se observó un valor mayor en los quesos E1 (Figura 27h). Se encontraron diferencias significativas en la concentración de la mayoría de los AAL en las muestras de 3 y 60 días. En general, los quesos tipo E2 se diferenciaron de los quesos T y E1, observándose, al igual que en el ensayo 5, una influencia de la metodología de adición del fermento probiótico (Tabla 14). Los mayores incrementos en los quesos tipo E2 a los 60 días se encontraron para los AA: Glu, His, Val, Lys e Ile. El nivel de AAL totales al final de la maduración fue 1,3 y 2,2 veces mayor en los quesos E1 y E2, respectivamente, que en los quesos testigo.

Por otro lado, en los ensayos 2 y 7, en los que se evaluó *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, respectivamente, se observaron pocas diferencias en el contenido de AA individuales (Figuras 27b y 27g). En el ensayo 2, se detectaron diferencias significativas para el contenido de los AA: Asp, His, Ala y Tyr a los 60 días; los quesos E2 fueron diferentes de los quesos T y E1 para los tres primeros aminoácidos citados, mientras que los quesos T difirieron de los experimentales en el contenido de Tyr (Tabla 14). En el

ensayo 7, se detectaron diferencias significativas solamente en tres aminoácidos (Asp, Glu e Ile) (Tabla 14), aún cuando el contenido absoluto de otros AA como Arg, Leu y Phe también difirió (Figura 27g). El nivel de AAL totales en los quesos E1 y E2 fue levemente superior que en los quesos T en estos ensayos.

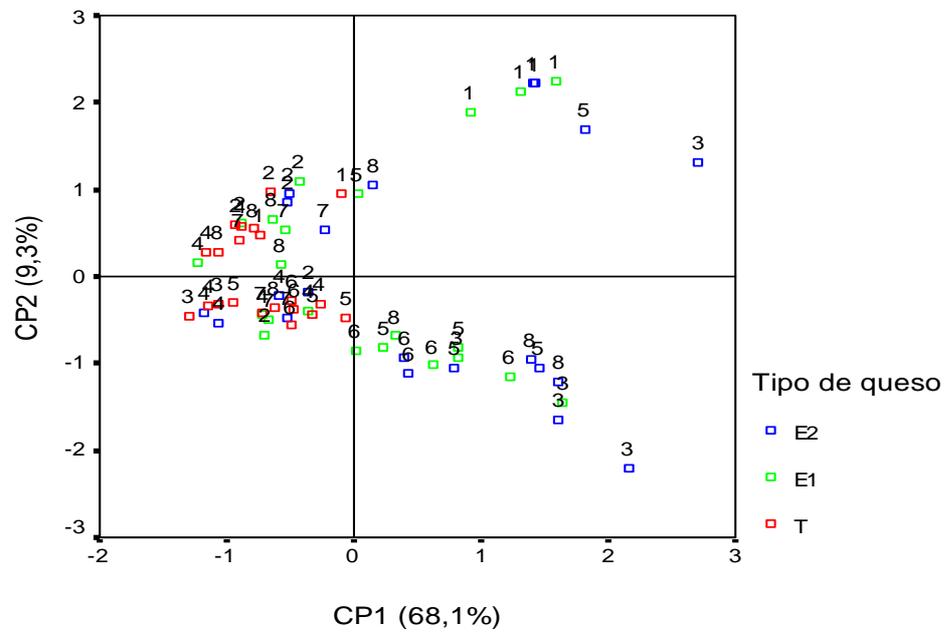
Finalmente, en el único ensayo en el cual no se detectó una influencia del fermento adjunto sobre los aminoácidos libres fue en el número 4 (*B. lactis*). En la figura 27d puede observarse claramente un perfil similar entre los diferentes tipos de queso. Asimismo, no se evidenciaron diferencias significativas en el contenido individual de ningún AAL (Tabla 14).

En general, los cinco aminoácidos mayoritarios al final de la maduración en todos los quesos, tanto testigo como experimentales, fueron: Leu, Phe, Glu, Arg y Lys. El orden de concentración de los mismos en los quesos varió según el tipo de queso y la cepa probiótica utilizada. Estos AAL representaron entre el 63 y 76% de los aminoácidos totales.

Finalmente, se aplicó un análisis por componentes principales al perfil de AAL de los quesos elaborados en todos los ensayos, a los 60 días de maduración. Se extrajeron los dos primeros componentes principales que explicaron el 88,2% de la variancia del sistema. Este análisis permitió detectar agrupaciones según el tipo de queso y el ensayo. Mientras los quesos T se agruparon juntos, cercanos a los quesos experimentales tipo E1 y E2 de los ensayos 2 (*L. paracasei*), 7 (*L. rhamnosus*) y 4 (*B. lactis*), los quesos experimentales de los ensayos 1 (*L. acidophilus* A), 3 (*L. acidophilus* B), 5 (*L. acidophilus* C), 6 (*L. casei*) y 8 (fermento probiótico mixto), se separaron en el gráfico de los *scores* (Figura 28a). Esta separación se produjo sobre todo a lo largo del eje del primer componente principal, que explicó el 68,1% de la variancia. Analizando estos resultados junto al gráfico de los *loading*, se pudo observar que el primer grupo se caracterizó por valores bajos de todos los AA, mientras que el segundo grupo mostró niveles elevados (Figuras 28a y b). De este modo, se confirmaron las tendencias verificadas en el análisis individual de cada ensayo con respecto a la diferente influencia de cada cepa en el perfil de AAL. Asimismo, se detectó cierta tendencia de agrupación entre los quesos de los ensayos en donde se demostró una mayor influencia, separándose los quesos del ensayo 1 del resto de los ensayos (Figura 28a). Sin embargo, esta agrupación se produjo a lo largo del eje del segundo componente principal, que explicó solamente un 9,3% de la variancia.

Figura 28. Análisis por componentes principales de los perfiles de AAL de los quesos elaborados en todos los ensayos, a los 60 días de maduración. a) Gráfico de los *scores* de las muestras. El rótulo de los datos indica el número del ensayo. b) Gráfico de los *loading* de las variables.

a)



b)

