

EVALUACIÓN *IN VIVO* DEL POTENCIAL FUNCIONAL DE UN QUESO DE PASTA HILADA ADICIONADO DE LACTOBACILOS PROBIÓTICOS

Godoy, Lucas¹

¹ Cientibecario en Instituto de Lactología Industrial INLAIN – UNL – CONICET

Director: Burns Patricia

Codirector: Cuffia Facundo

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

La demanda en el mercado ha impulsado en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales probióticos, productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional en el huésped. Uno de los factores más importantes para el éxito de cualquier programa de incorporación de probióticos a los alimentos lo constituye la elección del alimento portador. En un trabajo reciente del INLAIN (Cuffia y col., 2017) se logró una innovación en la tecnología de elaboración de quesos de pasta hilada tipo Fior di Latte que permitió la incorporación exitosa de microorganismos probióticos. Los microorganismos empleados en el presente estudio (*Lactobacillus acidophilus* LA5 y *Lactobacillus rhamnosus* GG) son cepas comerciales para los cuales se les han demostrado propiedades benéficas (www.chr-hansen.com). No obstante, más allá de conocer efectos benéficos de la cepa pura, cuando se la incorpora en un producto, es necesario demostrar la funcionalidad del alimento. Algunos de los efectos asociados al consumo de probióticos están relacionados a la capacidad de estimulación del sistema inmunológico, por ejemplo, a través del incremento de las defensas a nivel intestinal (IgA secretoria) o de su capacidad de inducir citoquinas anti y/o proinflamatorias (IL-10, IL-12, IL-6; TNF- α , IFN- γ) (Burns y col., 2017; 2018). La originalidad del trabajo se debe a que, a nuestro entender, no existen estudios en los cuales se evalúe la funcionalidad *in vivo* de quesos de pasta hilada adicionados de uno o más lactobacilos probióticos.

OBJETIVOS

Evaluar el potencial funcional de quesos frescos de pasta hilada adicionados de lactobacilos probióticos utilizando un modelo *in vivo* de ratones BALB/c y estudiar fenómenos asociativos producidos por la adición de más de una cepa probiótica.

MÉTODOS Y MATERIALES.

Quesos adicionados de lactobacilos probióticos

Se elaboraron 4 tipos de quesos frescos de pasta hilada (uno control y 3 experimentales) según la metodología descrita por Cuffia y col., 2017. Los quesos experimentales elaborados fueron: QLA: adicionado de la cepa probiótica *L. acidophilus* LA5; QGG: adicionado de la cepa probiótica *L. rhamnosus* GG y, QLA-LGG: adicionado de ambos probióticos. La viabilidad de los microorganismos probióticos se monitoreó durante la elaboración y hasta los 15 días de almacenamiento de los quesos a 4°C, mediante recuentos en agar MRS-bilis (Cuffia y col., 2017).

Ensayos con animales

Título del proyecto: Desarrollo de una tecnología para la elaboración de un queso de pasta hilada con adición de bacterias probióticas como actividad rentable y generadora de alto valor agregado". 44-143208. SPU. Ministerio de Educación de la Nación Argentina.

Instrumento: Proyectos de vinculación e innovación tecnológica: Jorge A. Sabato

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: Secretaría de Políticas Universitarias (SPU)

Director: Dr. Facundo Cuffia

Se trabajó con 4 grupos de 9 ratones BALB/c: queso control (QC) que recibió el queso sin probióticos y tres grupos tratados que recibieron los quesos probióticos (QLA, QGG y QLA-LGG). El queso (15 d de maduración) se homogeneizó y se administró por intubación intragástrica (500 µl), durante 10 días. Además, los animales recibieron alimento y agua *ad libitum*. A los 10 días, los ratones fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical. Se extrajo hígado, fluido intestinal (por lavados de intestino delgado) e intestino delgado (ID) y grueso (IG).

Ensayo de seguridad- Translocación bacteriana

Como medida de seguridad, se determinó si el suministro de los quesos indujo (o no) translocación de microbiota intestinal normal a hígado. Para esto, el hígado se homogeneizó en PBS estéril y se determinó la presencia de crecimiento bacteriano en agar ABRV (37 °C, 24 hs, aerobiosis). Los resultados se expresaron como translocación positiva o negativa, ya que el hígado es un órgano estéril en condiciones normales.

Evaluación de la capacidad inmunomoduladora

Se determinó la concentración de IgA-S en fluido intestinal y de citoquinas anti (IL-10) y proinflamatorias (IL-6, IL-12, IFN-γ y TNF-α) en homogenado de ID e IG, mediante técnica de ELISA (kit BD OptEIA, BD, Biosciences PharMingen, San Diego, CA, EEUU). El fluido intestinal se obtuvo mediante 2 lavados sucesivos del ID con buffer PBS estéril frío adicionado de 1% de inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich). El fluido se recuperó, se centrifugó (10000 rpm, 10 min, 4 ° C) y el sobrenadante se almacenó a -80°C para la cuantificación de IgA-S. Para obtener el homogenado de ID e IG se pesó 100 mg de tejido, se adicionó 1 ml de buffer de extracción (PBS-EDTA-Tween 20 + inhibidor de proteasas) y se homogeneizó en ultratúrrax. Los homogenados se centrifugaron (10000 rpm, 10 min, 4 ° C) y el sobrenadante se almacenó a -80°C para la cuantificación de citoquinas mediante técnica de ELISA sándwich.

RESULTADOS

En los 3 tipos de quesos experimentales, el nivel de los microorganismos probióticos se mantuvo por encima de 10^8 UFC/g luego de 15 días de maduración a 4°C, por lo cual los animales recibieron una dosis de lactobacilos probióticos entre 7,7 y 8,0 log UFC/ratón.

Ensayo de translocación

No se observó desarrollo microbiano en las placas de ABRV, lo que indica translocación negativa y que, por lo tanto, resultaron seguros.

Evaluación de la capacidad inmunomoduladora

La determinación de las citoquinas proinflamatorias (IL-6, IFN-γ, TNF-α) en homogenado de intestino delgado y grueso demostró que las cepas probióticas adicionadas a los quesos ejercieron un efecto antiinflamatorio en los animales en las condiciones estudiadas (Figuras 1 y 2). Tanto en ID como IG, el patrón de citoquinas proinflamatorias fue similar y se observa una disminución significativa en su concentración en animales que recibieron los quesos con adición de microorganismos probióticos, respecto al grupo QC.

En particular para ID (Figura 1), no se observaron diferencias estadísticamente significativas para las citoquinas IL-10, IL-12 (no se muestran los datos) e IFN-γ en los grupos tratados respecto al control. Sin embargo, se observó una disminución significativa en los niveles de IL-6 y TNF-α en los animales alimentados con los quesos QGG y QLA-LGG, respecto al grupo control.

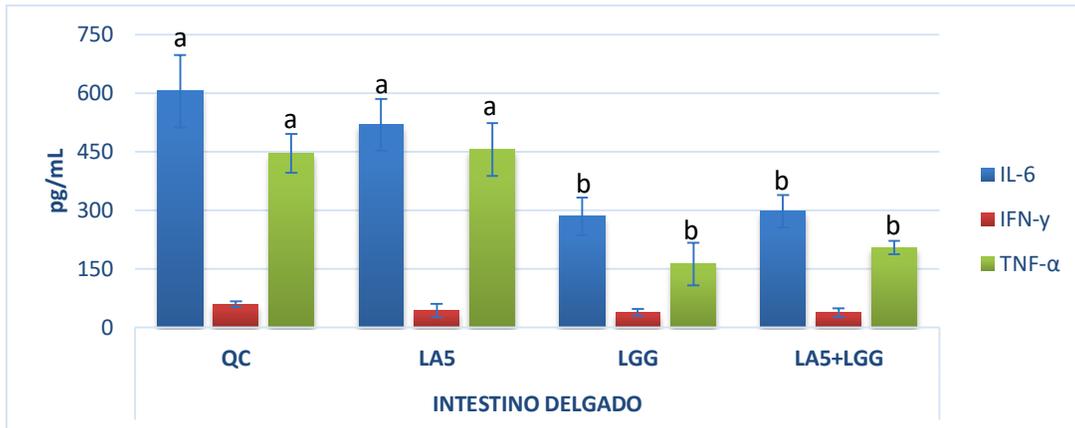


Figura 1. Concentración de IL-6, IFN- γ , TNF- α (pg/mL) en homogenado de intestino delgado de ratones BALB/c: grupo control (QC) y 3 grupos tratados que recibieron los quesos probióticos (QLA, QGG, QLA-GG). ^{ab} Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para cada citoquina.

En homogenado de IG, los animales que fueron alimentados con los quesos adicionados de microorganismos probióticos presentaron un nivel significativamente menor de las citoquinas proinflamatorias (IL-6, IFN- γ y TNF- α), indicando un efecto positivo sobre la regulación del sistema inmunológico. Los niveles de IL-6, si bien muestran valores inferiores en los grupos tratados que en el grupo control, la disminución no fue significativa. Al igual que en ID, no se observaron diferencias en los niveles de IL-12 entre los grupos y sí hubo una menor concentración de IL-10 para los grupos QLA y QLA-LGG, respecto a los grupos QC y QGG (no se muestran los datos).

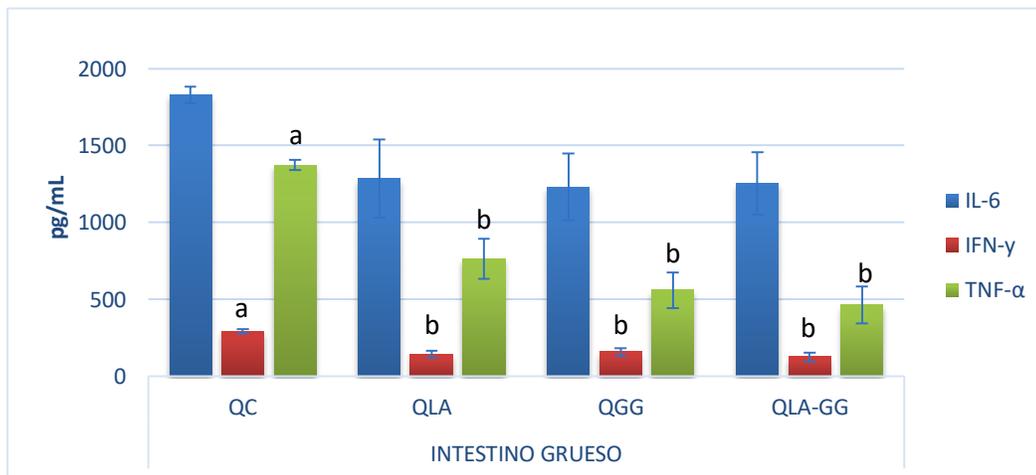


Figura 2. Concentración de IL-6, IFN- γ , TNF- α (pg/mL) en homogenado de intestino grueso de ratones BALB/c: queso control (QC) y 3 grupos tratados que recibieron los quesos probióticos (QLA, QGG, QLA-GG). ^{ab} Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para cada citoquina.

En la Figura 3 se observa la concentración de IgA-secretoria en fluido intestinal de los distintos grupos analizados. Los resultados evidencian que la adición de *L. acidophilus* LA5 en los quesos (QLA y QLA-LGG) estimuló el sistema inmune en ratones, lo cual se vio reflejado por el incremento significativo en la producción de IgA-S respecto al grupo QC. Este fenómeno no se observó para los animales alimentados con el queso QGG y no se evidenció un efecto asociativo para aquellos que recibieron el queso QLA-LGG. Estos resultados permiten confirmar que la

funcionalidad de los microorganismos probióticos es particular de cada cepa y no todos comparten el mismo efecto.

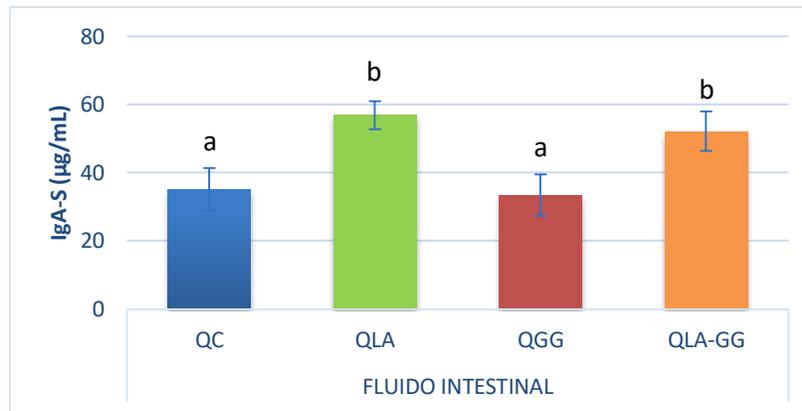


Figura 3. Concentración de IgA-S ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en fluido intestinal de ratones BALB/c: queso control (QC) y 3 grupos tratados que recibieron los quesos probióticos (QLA, QGG, QLA-LGG). ^{ab} Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo reflejan que fue posible elaborar exitosamente quesos frescos de pasta hilada adicionados de lactobacilos probióticos, los cuales mantuvieron su concentración en niveles superiores a 10^8 UFC/g luego de 15 días de almacenamiento a 4°C [(valor superior al requerido para un alimento adicionado de probióticos (10^6 - 10^7 UFC/g)]. Por otro lado, se comprobó que los quesos resultaron seguros ya que no indujeron translocación de microbiota entérica a hígado. En cuanto a la evaluación de la capacidad inmunomoduladora se obtuvieron resultados muy alentadores ya que se observó, por un lado, que los quesos adicionados de *L. acidophilus* LA5 demostraron capacidad de incrementar las defensas de las mucosas mediante el incremento en la concentración de IgA-S en fluido intestinal y, por otro, se logró una reducción en el perfil de citoquinas proinflamatorias tanto en intestino delgado como grueso. Como se mencionó anteriormente, la capacidad de regulación del sistema inmunológico depende de la cepa probiótica adicionada ya que sus mecanismos de acción son diferentes. En general, no se observó un efecto asociativo en la adición de ambos probióticos lo cual podría resultar ventajoso desde el punto de vista económico si se piensa en la elaboración de un queso probiótico.

Finalmente, se destaca que se logró elaborar con éxito un alimento innovador como es un queso fresco de pasta hilada adicionado de uno o más microorganismos probióticos, que podría ampliar la oferta de alimentos funcionales en el mercado (actualmente inexistente) y para el cual se demostró su seguridad y capacidad funcional mediante estudios *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Burns, P., Alard, J., Hrdý J., Boutillier, D., Páez, R. Reinheimer, J., Pot, B., Vinderola, G., Grangette, C. (2017). Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk derived *Bifidobacterium lactis* strain on acute and chronic colitis in mice. *Scientific Reports*. 7:43211 | DOI: 10.1038/srep43211.
- Burns, P., Oddi, S., Forzani, L., Tabacman, E., Reinheimer, J., Vinderola, G. (2018). Variability in gut mucosal secretory IgA in mice along a working day. *BMC Research Notes*. 11: 98.
- Cuffia, F., George, G., Renzulli, P., Reinheimer, J., Meinardi, C., Burns, P. (2017). Technological challenges in the production of a probiotic pasta filata soft cheese. *LWT Food Science and Technology*, 81, 111-117.