

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



Tesis presentada como parte de los requisitos de la
Universidad Nacional del Litoral para la obtención del grado académico de Doctor en
Ciencias Biológicas

**CULTIVOS PROBIÓTICOS PARA PRODUCTOS LÁCTEOS. RESPUESTA A NUEVOS
DESAFÍOS TECNOLÓGICOS Y ESTRATEGIAS PARA MEJORAR CEPAS**

Bioquímica Patricia G. Burns

Director: Dr. Jorge Reinheimer

Co-Director: Dr. Gabriel Vinderola

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET)



A mi familia...

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento,

Al Dr. Jorge Reinheimer, director de este trabajo, por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su grupo de investigación. Por su confianza y formación.

Al Dr. Gabriel Vinderola, mi co-director, por su guía en mi formación profesional, su apoyo y su constante estímulo durante estos años.

Al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) por haberme otorgado las becas que me permitieron realizar esta tesis doctoral.

A la Universidad Nacional del Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por haberme dado la formación necesaria para poder llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Clara González de los Reyes Gavilán y a toda la gente del IPLA (Asturias, España) (Patri, Abe, Miguel, Borja, Lore, Nuria, Maria) por permitirme un lugar entre ellos, por la excelencia en el trabajo y la calidez humana.

A la Dra. María Elizabetta Guerzoni por permitirme realizar parte de mi tesis en su grupo de investigación (Italia) y por la disposición para compartir sus conocimientos.

A Ana por su amistad, sus charlas y consejos.

A todos mis compañeros del INLAIN (Andrea, Vivi, Luján, Daniela, Diego, Mariángeles, Fer, Eli, Flor, Lisandro, Vero, Facu, Guille, Ayelén) por su amistad y los momentos compartidos.

A mi familia, por estar...siempre.

Los resultados de este trabajo de Tesis fueron publicados a través de los siguientes trabajos científicos:

1. Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. **(2008)**. Burns, P., Vinderola, G., Binetti, A., Quiberoni, A., de los Reyes-Gavilán, C. and Reinheimer J. **International Dairy Journal**. 18, 377-385.
2. Homogeneización de alta presión: una nueva tecnología para elaborar productos lácteos fermentados probióticos. **(2008)**. Burns, P., Patrignani, F., Vinderola, G., Serrazanetti, D., Reinheimer, J., Lanciotti, R. y Guerzoni, M.E. **Tecnología láctea latinoamericana**. 51, 52-57.
3. Probiotic Crescenza cheese containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high pressure-homogenized milk. **(2008)**. P. Burns, F. Patrignani, D. Serrazanetti, G. Vinderola, J. Reinheimer, R. Lanciotti and M.E. Guerzoni. **Journal of Dairy Science**. 91, 500-512.
4. Suitability of high pressure-homogenized milk for the production of probiotic fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus acidophilus*. **(2009)**. F. Patrignani, P. Burns, D. Serrazanetti, G. Vinderola, J. Reinheimer, R. Lanciotti and M.E. Guerzoni. **Journal of Dairy Research**. 76 (01), 74-82.
5. Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* to bile. **(2010)**. Burns, P., Sánchez, B., Vinderola, G., Ruas-Madiedo, P., Ruiz, L., Margolles, A., Reinheimer, J. and de los Reyes-Gavilán, C. **International Journal of Food Microbiology**. 142, 132-141.
6. Impact of bile salt adaptation of *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 on its interaction capacity with the gut. Burns, P., Vinderola, G., Reinheimer, J. (en preparación).

Congresos:

1. III Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos. Buenos Aires (2006). Obtención y caracterización de derivados resistentes a sales biliares a partir de cepas de *Lactobacillus* no intestinales. Burns, P; Vinderola, G; Quiberoni, A; Reinheimer, J.
2. XI Congreso Cytal y 2º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. Buenos Aires (2007). Efecto de la Homogeneización de Alta Presión (HPH) sobre algunas características de interés en lactobacilos probióticos. Vinderola, G; Patrignani, F; Burns, P; Lanciotti, R; Serrazanetti, D; Reinheimer, J; Guerzoni, M.E.
3. XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba (2007). Estudio microscópico y proteómico de la adaptación al estrés por bilis en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 193. Vinderola, G; Sánchez, B; Burns, P; Margolles, A; Reinheimer, J; de los Reyes Gavilán, C.
4. XI Congreso Cytal y 2º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. Buenos Aires (2007). Homogeneización de Alta Presión (HPH): una nueva tecnología para elaborar productos lácteos fermentados probióticos. Burns, P; Patrignani, F; Lanciotti, R; Vinderola, G; Serrazanetti, D; Reinheimer, J; Guerzoni, M.E.
5. XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Rosario (2008). Efecto de factores tecnológicos sobre la funcionalidad de bacterias probióticas. Burns, P., Vinderola, G., Binetti, A., Patrignani, F., Tabanelli, G., Lanciotti, R., Guerzoni, M.E. y Reinheimer, J.
6. XII Congreso Argentino de Ciencia Y Tecnología de Alimentos (Cytal) y 3º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías Alimentación y energía: globalización y desafíos. Concordia (2009). Caracterización de la adaptación al ambiente intestinal de una cepa de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* aislada de alimentos. Burns, P.; Ruas-Madiedo, P.; Vinderola, G.; G. de los Reyes Gavilán, C. y Reinheimer, J.

-
7. III Simposio Internacional de Bacterias Lácticas. II Encuentro Red BAL Argentina. Tucumán (2009). An insight into the adaptation of *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 to the intestinal environment. P. Burns, B. Sánchez, G. Vinderola, L. Ruiz, P. Ruas-Madiedo, A. Margolles, J. Reinheimer and C. González de los Reyes-Gavilán.

Distinciones obtenidas

- Premio AATA 2007 al Mejor Trabajo Original. *Homogeneización de alta presión (HPH): una nueva tecnología para elaborar productos lácteos fermentados probióticos*. XI Congreso CYTAL y 2º Simposio Internacional de nuevas tecnologías. Burns, P; Patrignani, F; Lanciotti, R; Vinderola, G; Serrazanetti, D; Reinheimer, J; Guerzoni, M.E. Buenos Aires, 12 - 14 de Septiembre de 2007.

Indice

Resumen	1
Summary	5
Introducción general	8
Objetivos	10
Capítulo I. HPH: una nueva tecnología para la elaboración de alimentos probióticos	11
I.1 Alta presión de homogeneización. Una revisión del estado del arte.	12
I.2 Efectos de la HPH sobre los microorganismos	14
<i>I.2.a Tipo de microorganismo</i>	15
<i>I.2.b Temperatura de entrada (Ti) de la muestra al equipo HPH</i>	16
<i>I.2.c Tipo de matriz</i>	16
<i>I.2.d Nivel de presión y cantidad de tratamientos HPH</i>	16
<i>I.2.e Carga microbiana/viral inicial</i>	17
I.3 Inactivación de la microflora de la leche	17
I.4 Efecto del tratamiento de HPH sobre los componentes de la leche	17
<i>I.4.a Efectos de la HPH sobre las proteínas</i>	17
<i>I.4.b Efectos de la HPH sobre las micelas de caseína</i>	18
<i>I.4.c Efectos de la HPH sobre las proteínas de suero</i>	18
<i>I.4.d Efectos de la HPH sobre la grasa de la leche</i>	19
<i>I.4.e Efectos de la HPH sobre las enzimas de la leche</i>	20
I.5 Elaboración de productos lácteos fermentados utilizando leche tratada por HPH	20
<i>I.5.a Quesos</i>	20
<i>I.5.b Leches fermentadas</i>	23
Capítulo Ia. Aplicación de la HPH a la elaboración de quesos probióticos	27
I.a.1 Introducción	28
I.a.2 Objetivo	29
I.a.3 Materiales y Métodos	30

<i>I.a.3.1 Cultivo iniciador y bacterias probióticas</i>	30
<i>I.a.3.2 Tratamientos de la leche</i>	30
<i>I.a.3.3 Elaboración de quesos, rendimiento y análisis de composición</i>	31
<i>I.a.3.4 Análisis microbiológico y medida de pH</i>	33
<i>I.a.3.5 Determinación de la proteólisis, lipólisis y del contenido de aminoácidos</i>	34
<i>I.a.3.6 Determinación de compuestos volátiles</i>	36
<i>I.a.3.7 Evaluación sensorial</i>	36
<i>I.a.3.8 Estudios moleculares</i>	37
<i>I.a.3.8.i Extracción de ADN de cultivos puros y extracción de ADN total de los quesos</i>	37
<i>I.a.3.8.ii Amplificación del ADN</i>	37
<i>I.a.3.8.iii Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante</i>	37
<i>I.a.3.9 Análisis estadístico</i>	38
I.a.4 Resultados	39
<i>I.a.4.1 Composición de la leche cruda, rendimiento y composición de los quesos</i>	39
<i>I.a.4.2 Cambios en la microflora de los quesos durante el almacenamiento refrigerado</i>	41
<i>I.a.4.3 Ácidos grasos libres</i>	44
<i>I.a.4.4 Patrones proteolíticos y perfiles de aminoácidos</i>	46
<i>I.a.4.5 Perfiles de GC-MS-SPME</i>	48
<i>I.a.4.6 Evaluación sensorial</i>	50
I.a.5 Discusión	51
I.a.6 Conclusiones	55
Capítulo Ib. Aplicación de la HPH a la elaboración de leches fermentadas probióticas	56
I.b.1 Introducción	57
I.b.2 Objetivo	58
I.b.3 Materiales y Métodos	59

<i>I.b.3.1 Cultivos iniciadores y probióticos</i>	59
<i>I.b.3.2 Elaboración de las leches fermentadas</i>	59
<i>I.b.3.3 Análisis microbiológicos</i>	60
<i>I.b.3.4 Análisis de textura</i>	61
<i>I.b.3.5 Perfiles de aroma</i>	61
<i>I.b.3.6 Extracción de ADN de cultivos puros, extracción de ADN total de las leches fermentadas, amplificación del ADN y electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante</i>	61
<i>I.b.3.7 Proteólisis</i>	61
<i>I.b.3.8 Evaluación sensorial</i>	62
<i>I.b.3.9 Análisis estadístico</i>	62
I.b.4 Resultados	63
<i>I.b.4.1 Viabilidad de bacterias ácido lácticas durante el almacenamiento y pH</i>	63
<i>I.b.4.2 Proteólisis</i>	65
<i>I.b.4.3 Análisis de textura</i>	65
<i>I.b.4.4 Análisis sensorial</i>	66
<i>I.b.4.5 Perfiles de compuestos volátiles</i>	67
I.b.5 Discusión	69
I.b.6 Conclusiones	73
Capítulo II. Adaptación a sales biliares de lactobacilos no intestinales	74
II.1 Microbiota del tracto gastrointestinal	75
II.2 Microorganismos probióticos. Definición	76
II.3 El género <i>Lactobacillus</i>	76
<i>II.3.1 Lactobacilos de origen intestinal y no intestinal</i>	77
II.4 Criterios de selección de cepas probióticas	78
II.5 Sobrevida a las condiciones adversas del TGI	79
II.6 Capacidad de adhesión /colonización transitoria del TGI	79
II.7 Actividad antimicrobiana	80

II.8 Factores de estrés en el TGI	80
<i>II.8.1 Sales biliares</i>	81
II.9 Adaptación de microorganismos a factores de estrés	83
II.10 Aplicación de proteómica al estudio de la respuesta a estrés	85
<i>II.10.1 Etapa 1: Extracción y preparación de las muestras</i>	86
<i>II.10.2 Etapa 2: Primera dimensión: isoelectroenfoque</i>	87
<i>II.10.3 Etapa 3: Segunda dimensión: electroforesis SDS-PAGE</i>	87
<i>II.10.4 Etapa 4: Identificación de las proteínas mediante huella peptídica</i>	89
Capítulo IIa. Adaptación de lactobacilos no intestinales a concentraciones fisiológicas de bilis y caracterización preliminar	91
II.a.1 Introducción	92
II.a.2 Objetivo	93
II.a.3 Materiales y Métodos	94
<i>II.a.3.1 Cepas, medios de cultivos y condiciones de incubación</i>	94
<i>II.a.3.2 Sensibilidad de las cepas de Lactobacillus a sales biliares y aislamiento de derivados resistentes a bilis</i>	94
<i>II.a.3.3 Extracción de ADN</i>	95
<i>II.a.3.4 Confirmación de la identidad de los derivados resistentes a bilis</i>	95
<i>II.a.3.5 Análisis RAPD</i>	96
<i>II.a.3.6 Cinéticas de crecimiento</i>	97
<i>II.a.3.7 Perfiles de fermentación de carbohidratos</i>	97
<i>II.a.3.8 Hidrofobicidad</i>	97
<i>II.a.3.9 Resistencia al almacenamiento congelado</i>	98
<i>II.a.3.10 Resistencia a condiciones ácidas e inducción de tolerancia a ácido</i>	98
<i>II.a.3.11 Análisis estadístico</i>	98
II.a.4 Resultados	99
<i>II.a.4.1 Sensibilidad de lactobacilos de origen intestinal y no intestinal a sales biliares</i>	99
<i>II.a.4.2 Obtención de derivados resistentes a sales biliares</i>	100

II.a.4.3 <i>Cinéticas de crecimiento de los derivados resistentes a bilis obtenidos</i>	100
II.a.4.4 <i>Fermentación de azúcares</i>	102
II.a.4.5 <i>Confirmación de la identidad de los derivados resistentes obtenidos</i>	103
II.a.4.6 <i>Hidrofobicidad y resistencia gástrica simulada de los derivados obtenidos</i>	104
II.a.5 <i>Discusión</i>	107
II.a.6 <i>Conclusiones</i>	110
Capítulo IIb. Estudio del impacto de la adaptación a sales biliares sobre las características fisiológicas de la cepa	111
II.b.1 <i>Introducción</i>	112
II.b.2 <i>Objetivo</i>	112
II.b.3 <i>Materiales y Métodos</i>	113
II.b.3.1 <i>Cepas y condiciones de cultivo</i>	113
II.b.3.2 <i>Cinéticas de crecimiento en presencia de sales biliares</i>	113
II.b.3.3 <i>Extracción de proteínas libres de células para electroforesis 2D</i>	114
II.b.3.4 <i>Condiciones para la electroforesis 2D e identificación de proteínas</i>	114
II.b.3.5 <i>Actividad metabólica de células en reposo (resting cells)</i>	115
II.b.3.6 <i>Análisis estadístico</i>	116
II.b.4 <i>Resultados</i>	117
II.b.4.1 <i>Cinéticas de crecimiento en presencia de concentraciones fisiológicas de sales biliares</i>	117
II.b.4.2 <i>Estudio proteómico de la adaptación a bilis de las cepas Lb. delbrueckii subsp. lactis 200 y 200+</i>	118
II.b.4.3 <i>Modificación de la ruta glucolítica debido a la adquisición de resistencia a bilis</i>	126
II.b.5 <i>Discusión</i>	127

II.b.6 Conclusiones	129
Capítulo IIc. Estudio <i>in vivo</i> de la interacción de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 200 y <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 200+ con el intestino	130
II.c.1 Introducción	131
II.c.2 Objetivo	131
II.c.3 Materiales y Métodos	132
II.c.3.1 Cepas y animales de experimentación	132
II.c.3.2 Microscopía electrónica	132
II.c.3.3 Cinética de crecimiento en presencia de sales biliares bovinas y porcinas	133
II.c.3.4 Deconjugación de ácidos biliares	133
II.c.3.5 Hidrofobicidad	133
II.c.3.6 Ensayo de adhesión a líneas celulares intestinales epiteliales	133
II.c.3.7 Capacidad de autoagregación	134
II.c.3.8 Coagregación con microorganismos patógenos	135
II.c.3.9 Sobrevida en fluido intestinal de ratón	135
II.c.3.10 Interacción de bacterias con el intestino. Empleo de bacterias marcadas fluorescentes	136
II.c.3.11 Determinación de la capacidad de activar la respuesta inmune: actividad fagocítica de macrófagos peritoneales y número de células productoras de IgA en intestino	137
II.c.3.11.i Administración oral de las cepas en estudio	137
II.c.3.11.ii Seguridad: traslocación bacteriana	137
II.c.3.11.iii Ensayo de fagocitosis de macrófagos peritoneales	137
II.c.3.11.iv Examen histológico de la mucosa intestinal	138
II.c.3.11.v Estudio de la proliferación de células productoras de IgA en lámina propia de intestino delgado	138
II.c.3.12 Análisis estadístico	138
II.c.4 Resultados	139
II.c.4.1 Microscopía electrónica	139
II.c.4.2 Cinética de crecimiento en presencia de sales biliares bovinas y porcinas	140

<i>porcinas</i>	
II.c.4.3 Deconjugación de ácidos biliares	141
II.c.4.4 Hidrofobicidad	141
II.c.4.5 Ensayo de adhesión a líneas celulares intestinales epiteliales	142
II.c.4.6 Capacidad de autoagregación	142
II.c.4.7 Coagregación con microorganismos patógenos	144
II.c.4.8 Sobrevida en fluido intestinal de ratón	144
II.c.4.9 Interacción de bacterias con el intestino. Empleo de bacterias	145
<i>marcadas fluorescentes</i>	
II.c.4.10 Determinación de la capacidad de activar la respuesta inmune: actividad fagocítica de macrófagos peritoneales y número de células productoras de IgA en intestino	150
II.c.5 Discusión	153
II.c.6 Conclusiones	156
Conclusiones generales y comentarios finales	157
Bibliografía	159

Abreviaturas y Símbolos

%H	Porcentaje de hidrofobicidad
2-DE	Electroforesis bidimensional (<i>TwoDimensional Electrophoresis</i>)
AAL	Aminoácidos libres
ABRV	Agar bilis rojo violeta
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGCR	Ácidos grasos de cadena ramificada
AGL	Ácidos grasos libres
ARN	Ácido ribonucleico
ARDRA	Análisis de Restricción del ADN Ribosomal Amplificado (<i>Amplified ribosomal DNA restriction analysis</i>)
atm	Atmósfera
ATP	Trifosfato de adenosina (<i>adenosine triphosphate</i>)
BAL	Bacterias ácido-lácticas
CLA	Ácido linoleico conjugado (<i>conjugated linoleic acid</i>)
COG	<i>Cluster of heterologous genes</i>
D.O.	Densidad óptica
DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
EPS	Exopolisacáridos
FA	Fosfatasa alcalina
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino (<i>gut-associated lymphoid tissue</i>)
GC-MS-SPME	Cromatografía gaseosa-espectrometría de masa asociada a microextracción en fase sólida (<i>gas chromatography-mass spectrometry- solid-phase microextraction</i>)
HHP	Alta presión hidrostática (<i>High hydrostatic pressure</i>)

Abreviaturas y Símbolos

HPH	Homogeneización de alta presión (<i>High pressure homogenization</i>)
HSPs	Proteínas de estrés al calor (<i>Heat shock proteins</i>)
HTST	Alta temperatura, corto período de tiempo (<i>High temperature short time</i>)
IgA	Inmunoglobulina A
IL	Interleuquina
log	Logaritmo
LPL	Lipoproteinlipasa
LP	Lactoperoxidasa
m/z	Relación masa/carga de un ión
MALDI	Desorción/Ionización mediante láser asistida por matriz (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
MLT	Microflora láctica total
MPa	Megapascal
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem (<i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
NIH	Instituto Nacional de Salud (<i>National Institute of Health</i>)
OMGE	Organización mundial de gastroenterología
OMGs	Organismos modificados genéticamente
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEFs	Campos eléctricos pulsados (<i>pulsed electric fields</i>)
pI	Punto isoelectrico
PL	Plasmina
PTFE	Politetrafluoroetileno
RAPD	Amplificación al azar del ADN polimórfico (<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>)
SDS	Duodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
TGI	Tracto gastrointestinal
Ti	Temperatura de entrada de la muestra

Abreviaturas y Símbolos

TOF	Tiempo de vuelo (<i>Time of flight</i>)
UFC	Unidades formadores de colonias
UFP	Unidades formadores de placas
UV	Ultravioleta
WHO	Organización mundial de la salud (<i>World Health Organization</i>)
α -la	α -lactoalbúmina
β -lg	β -lactoglobulina

Microorganismos

<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>C.</i>	<i>Candida</i>
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Ent.</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
<i>St.</i>	<i>Streptococcus</i>

Resumen

La homogeneización de alta presión (HPH, por sus siglas en inglés) es una de las alternativas más promisorias a los tratamientos térmicos tradicionales, aplicados a la leche, para la preservación de los aspectos nutricionales y para la diversificación de productos lácteos. Su efectividad en la inactivación de microorganismos patógenos y contaminantes está bien documentada tanto en alimentos como en sistemas modelos y es conocido también su efecto sobre numerosas propiedades de los componentes de los alimentos (proteínas, grasas). En la presente Tesis Doctoral se evaluó el potencial aplicativo del tratamiento HPH de la leche para la elaboración de queso Crescenza y yogur adicionados de bacterias probióticas comerciales.

Se elaboraron 4 variedades de quesos Crescenza y 4 tipos de yogures, siendo las variables el tratamiento tradicional de la leche con calor (pasteurización) o mediante HPH y el agregado o no de cultivos probióticos empleados en productos lácteos.

Para los quesos Crescenza se utilizó la cepa comercial de *Streptococcus thermophilus* St 0.20 como starter. Durante los 12 días de almacenamiento a 4°C se realizaron análisis de composición química, microbiológicos, fisicoquímicos y organolépticos de las variedades elaboradas. De acuerdo a los resultados obtenidos, no se observaron diferencias significativas entre los quesos en cuanto a composición (proteínas, grasas, humedad) y pH. El tratamiento HPH de la leche incrementó significativamente el rendimiento quesero en aproximadamente un 1% y afectó de manera positiva la viabilidad de las bacterias probióticas durante el almacenamiento a 4°C. Hacia el final del período de maduración (12 días) la viabilidad de *Lactobacillus paracasei* A13 se mantuvo en 8 órdenes log (UFC/g), mientras que *Lactobacillus acidophilus* H5 disminuyó 1 orden log (UFC/g) en el queso pasteurizado probiótico respecto al HPH probiótico. El tratamiento de HPH afectó de manera positiva los patrones lipolíticos y proteolíticos de los quesos. La presencia de bacterias probióticas también afectó dichos patrones. No se observaron diferencias significativas en cuanto a las características sensoriales “salado” y “cremosidad” para los quesos elaborados con leche pasteurizada o HPH. Para los quesos HPH con o sin probióticos y para el queso elaborado con leche pasteurizada adicionado de probióticos no hubo diferencias en cuanto a los parámetros “sabor picante”, “acidez”, “sabor dulce”, “sabor a leche”, “cremosidad”, “salado” y “aceptación general”.

Respecto a los yogures, se realizaron análisis microbiológicos, fisicoquímicos y organolépticos durante el almacenamiento refrigerado (35 días a 4°C). El tratamiento HPH de la leche no modificó la viabilidad de los cultivos probióticos pero sí protegió la viabilidad de los cultivos starters (aprox. en 1 orden log). El coágulo de los yogures HPH resultó significativamente más compacto (mayor firmeza) que el coágulo de los yogures elaborados con leche tratada térmicamente, además de presentar mayor consistencia, cohesión e índice de viscosidad. En el análisis sensorial todas las muestras recibieron puntajes elevados. Estos resultados permitieron concluir que el tratamiento HPH de la leche podría diversificar el mercado de las leches fermentadas adicionadas de bacterias probióticas, innovando especialmente en relación a los parámetros de textura.

En el segundo eje temático de esta Tesis se abordó la adaptación progresiva de lactobacilos de origen no intestinal a concentraciones fisiológicas de sales biliares. A partir de 24 cepas pertenecientes a las especies *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus* y una cepa de *Lb. acidophilus* con baja resistencia a sales biliares, se lograron obtener 6 derivados (5 cepas de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* y una de *Lb. acidophilus*) capaces de crecer en presencia de 0,5% (p/v) de sales biliares. El perfil de fermentación de carbohidratos no se modificó; sin embargo, la velocidad de fermentación de algunos azúcares resultó más lenta en los derivados resistentes a bilis que en la cepa original. No se observaron diferencias significativas respecto a la cepa original en los valores de hidrofobicidad superficial de los cultivos desarrollados en MRS, la capacidad de crecer en leche y la supervivencia durante el almacenamiento congelado. Algunos derivados resistentes a bilis también resultaron ser resistentes a valores bajos de pH que simulaban la acidez gástrica, mientras que otras cepas adquirieron esta capacidad luego de un proceso de adaptación progresiva a la acidez estomacal simulada. Para una cepa en particular, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y su derivado resistente a bilis *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ se caracterizó la respuesta a la bilis comparando los proteomas de proteínas citoplasmáticas de ambas cepas crecidas en presencia o ausencia de bilis. Los estudios de proteómica se complementaron con estudios morfológicos, fisiológicos y de funcionalidad tales como microscopía electrónica de los cultivos, la hidrofobicidad de las cepas crecidas en presencia de bilis, la determinación de metabolitos finales de la vía glicolítica, la capacidad de ambas cepas de adherirse a la línea celular epitelial intestinal

HT29-MTX, la capacidad de deconjugar ácidos biliares, la capacidad de desarrollo en bilis porcina, la autoagregación y coagregación con microorganismos patógenos, la sobrevida en fluido intestinal de ratón, la capacidad de interacción con el intestino delgado y el efecto sobre la respuesta inmune de la mucosa intestinal en ratones. La comparación de los patrones de proteínas de las cepas crecidas en presencia o ausencia de bilis nos permitió identificar 9 proteínas cuya producción estuvo regulada por la presencia de bilis en ambas cepas (respuesta) y 17 proteínas que mostraron diferencias en sus niveles de expresión entre la cepa original y el derivado resistente a bilis (adaptación). Entre estas proteínas encontramos proteínas chaperonas de respuesta general al estrés, proteínas involucradas en los procesos de transcripción y traslación, en la biosíntesis de peptidoglucanos/exopolisacáridos, en el metabolismo de lípidos y nucleótidos y varias enzimas de la vía glucolítica y del catabolismo del piruvato. Se encontraron diferencias en el nivel de metabolitos finales del catabolismo de azúcares entre ambas cepas (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 y 200+). Para *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+, desarrollado en presencia de bilis, se observaron cambios morfológicos en el tamaño y forma de la membrana celular y disminución de la hidrofobicidad, capacidad autoagregante, capacidad de adhesión a la línea celular intestinal utilizada y persistencia en el intestino. Por otro lado, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ fue capaz de crecer en presencia de los ácidos biliares taurodesoxicólico, tauroquenodesoxicólico y glicocólico pero no fue capaz de deconjugarlos y presentó mayor sobrevida en fluido intestinal de ratón. La cinética de crecimiento en bilis porcina en comparación con bilis bovina permitió corroborar, para esta cepa, que las sales biliares de origen porcino tienen mayor capacidad inhibitoria que las de origen bovino. Por otro lado, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 no fue capaz de coagregar con la cepa *Salmonella enterica* serovar Typhimurium OMS-Ca. Los estudios *in vivo* revelaron que la capacidad de activar la respuesta inmune de la mucosa intestinal también fue afectada, necesitando más tiempo que la cepa original para inducir la misma magnitud del parámetro funcional evaluado (aumento del número de células productoras de IgA en intestino delgado). De esta manera, el proceso de adaptación a bilis de *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 indujo cambios deseables y no deseables en la cepa, siendo los estudios *in vivo* los que más aportaron al conocimiento de la capacidad

funcional de la cepa, ratificándose su importancia para un conocimiento íntegro y definitivo de los efectos de la adaptación a sales biliares observados *in vitro*.

Summary

High pressure homogenization (HPH) is one of the most promising alternatives to traditional thermal treatment, applied to milk, for the preservation of its nutritional aspects and for the diversification of dairy products. Its effectiveness on the deactivation of pathogenic and spoilage microorganisms in model systems and real food is well documented. It is also known the effects on several properties of food components (proteins, fat). In this work we evaluated the potential of milk treated by HPH for the production of Crescenza cheese and fermented milk added of commercial probiotic bacteria.

Four types of cheeses and yogurts were manufactured: someones prepared with pasteurized or HPH treated milk with and without probiotics.

Crescenza cheeses were manufactured with *Streptococcus thermophilus* St. 0.20 as starter. Compositional, microbiological, physico-chemical and organoleptic analysis were carried out during the refrigerated storage (4°C). According to the results obtained, no significant differences among the 4 cheese types were observed for gross composition (protein, fat, moisture) and pH. The HPH treatment of milk significantly increased the cheese yield in about 1% and positively affected the viability of probiotic bacteria. By day 12 of storage, counts of *Lactobacillus paracasei* A13 were similar to initial counts (about 8 log orders) while *Lactobacillus acidophilus* H5 exhibited in HPH-Pro cheese a cell viability higher than in P-Pro cheeses (1 log order). The hyperbaric treatment had a significant effect on free fatty acids (FFA) release and, whereas cheeses made from pasteurized milk showed a less complex FFA profile. Probiotic cultures affected proteolytic cheese patterns. No significant differences were found for the sensory descriptors salty and creamy among HPH- and P-cheeses as well as for acid, piquant, sweet, milky, salty, creamy and overall acceptance among HPH-, HPH-Pro- and P-Pro-Crescenza cheeses.

In relation to fermented milks, microbiological, physicochemical and organoleptic analysis was carried out during the refrigerated period (35 d, 4°C). The application of HPH to milk did not modify, with respect to the traditional products, the viability of the probiotic cultures whereas was more effective in the maintenance of the cell loads of the starter cultures (about 1 log order higher than in pasteurized samples). The coagula from HPH treated milk resulted significantly ($P < 0.05$) more compacted

(higher firmness) than the one obtained with pasteurized milk, and it showed the highest values of consistency, cohesiveness and viscosity indexes with respect to fermented milks produced from milk without HPH treatment. In relation to the sensory analysis, all the samples received high scores for each descriptor considered, and were considered of high quality. The HPH treatment of milk has the potential of diversifying the market of probiotic fermented milks, especially in terms of texture parameters.

In the second axis of this Thesis, the progressive adaptation to bile of non-intestinal lactobacilli was studied. Six bile-salts resistant derivatives (five from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and one from *Lb. acidophilus*), able to grow in the presence of 0.5% bile salts, were obtained out of 24 strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus* and also one strain of *Lb. acidophilus* with low resistance to bile salts. Carbohydrate fermentation profiles remained unchanged but the rate of fermentation of several sugars was generally slower in bile-resistant derivatives. No significant differences with respect to the parent strains were observed for the cell-wall hydrophobicity of the strains grown in MRS broth, the capacity to grow in milk and the survival during frozen storage. Some bile-resistant derivatives were also resistant to low pH, but in other strains this capacity was acquired following progressive adaptation to low pH. For a strain in particular, the autoaggregative *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 and its bile-resistant derivative *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+, the adaptation to bile was studied by comparing cytosolic proteomes of both strains grown in the presence or absence of bile. Proteomic studies were complemented with physiological and functional studies on both strains by studying the phenotypes by transmission and scanning electron microscopy, the hydrophobicity of the strains grown in MRS with bile, the glycolytic end-products, the ability to adhere to the human intestinal epithelial cell line HT29-MTX, the capacity to deconjugate individual bile acids, the growth in porcine bile, the autoaggregation and co-aggregation with pathogens, the survival in mice intestinal fluid, the interaction capacity with the intestine and the effect on the gut mucosal immune system.

Protein pattern comparison of strains grown with and without bile allowed us to identify 9 different proteins whose production was regulated by bile in both strains (response) and 17 proteins that showed differences in their levels between the parental

and the bile resistant derivative (adaptation). These included general stress response chaperones, proteins involved in transcription and translation, in peptidoglycan/exopolysaccharide biosynthesis, in the lipid and nucleotide metabolism and several glycolytic and pyruvate catabolism enzymes. Differences in the level of metabolic end products of the sugar catabolism were found between the strains 200 and 200+. For *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ grown in bile, changes in the size and membrane structure were observed by electron microscopy, a decrease in the hydrophobicity, autoaggregative capacity, adhesion to cell lines and persistence in the intestine was observed. *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ was able to grow in the presence of individual bile salts but was not able to deconjugate them, and presented a higher survival capacity in mice intestinal fluid compared to the mother strain. The growth kinetics of *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200+ in the presence of porcine salts allowed us to confirm that these bile salts have a higher inhibitory capacity than bovine bile salts. *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 was not able to coaggregate with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium OMS-Ca. The *in vivo* studies showed that the capacity to activate the immune response was also affected by salt adaptation. The bile-resistant derivative needed a longer administration period to induce a similar magnitude of the effect observed for the mother strain (increase of the number of IgA-producing cells in the small intestine). In this way, the process of adaptation to bile of *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 200 induced desirable changes and undesirable changes in the strain, being the *in vivo* studies the ones that provided a better knowledge of the functional capacity of the strain, underlying their importance for an integral and definitive knowledge of the effects of the adaptation to bile salts observed *in vitro*.

Introducción general

La presente Tesis Doctoral se desarrolló en el marco del proyecto de investigación “*Cultivos probióticos para productos lácteos. Estrategias para mejorar cepas y respuesta a nuevos desafíos tecnológicos*” (PICT, 2004 N° 20358 2006-2009).

En los últimos años, la industria láctea fermentativa argentina ha asistido, en concordancia con una tendencia mundial, a una verdadera revolución en la formulación microbiológica de las leches fermentadas. Estos cambios notables implican el agregado de bacterias (lácticas y no lácticas) aisladas del intestino humano, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, con propiedades probióticas.

Un elemento clave a tener en cuenta para el diseño de alimentos dentro de cualquier sector agroalimentario es el consumidor, ya que sus gustos y preferencias van a condicionar la estrategia a seguir por parte de la industria alimentaria. En este sentido, la creciente demanda de productos más “naturales”, nutritivos y a la vez seguros ha conducido a que tecnologías tradicionales como el tratamiento térmico estén siendo sustituidas por tecnologías alternativas que eviten las pérdidas nutricionales y los cambios en las características organolépticas de los alimentos cuando son sometidos a altas temperaturas. La Alta Presión de Homogeneización representa, al momento, una de las tecnologías alternativas más estudiadas debido a su potencialidad aplicativa a nivel industrial (Paquin, 1999). Está demostrado que esta tecnología, además de ser efectiva en la inactivación de microorganismos patógenos y contaminantes, actúa sobre los constituyentes de los alimentos, especialmente las proteínas, grasas y polisacáridos, con la consecuente modificación de sus propiedades funcionales, susceptibilidad al ataque enzimático y microestructura (Kheadr y col., 2002; Vachon y col., 2002; Sandra y Dalgleish, 2005).

En relación ya no a la matriz alimentaria sino a las cepas, existe en el mundo un buen número de microorganismos probióticos que se utilizan, o se han utilizado, intensamente en una enorme variedad de productos lácteos comerciales como Actimel, Leche SanCor BIO, Yakult, Activia, Bioqueso Ilolay Vita, Quesos La Serenísima con LGG, entre otros.

Durante los últimos 30 años, el mejoramiento de cepas microbianas fue un tema intensamente estudiado. El desarrollo de innumerables técnicas y herramientas genéticas

se mostró eficaz para modular la expresión de fenotipos de importancia tecnológica y funcional, incrementando el nivel de dicha expresión o agregando a una cepa caracteres inexistentes en ésta. Un gran número de estos organismos modificados genéticamente (OMGs) se encuentran, en realidad, listos para ser utilizados industrialmente. Sin embargo, las restricciones que todavía pesan sobre su uso han disminuido sensiblemente los esfuerzos y recursos dirigidos a “ingenierizar” cepas. Dado que, al margen de esto, la demanda por parte de la industria de cepas “mejoradas”, a las cuales se les exige una alta performance industrial, es cada vez mayor, se están revalorizando últimamente estrategias metodológicas más “naturales”, las cuales no poseen ningún tipo de restricción para su aprovechamiento.

La propuesta de la presente Tesis Doctoral recoge la mirada de la innovación tanto de la matriz alimentaria como de las cepas empleadas. Por un lado se investigó la capacidad de bacterias probióticas de mantenerse viables en productos lácteos probióticos (quesos y/o yogur) elaborados con leche homogeneizada a alta presión. En el otro eje temático, se abordó la obtención de derivados adaptativos, que son métodos poco explotados hasta el momento. La ausencia de cuestionamientos hacia los mismos y algunos resultados exitosos logrados, los convierten en métodos prometedores pero que necesitan ser conocidos en profundidad.

Objetivos

Objetivo general

- Estudiar el efecto de nuevas herramientas tecnológicas y metodológicas sobre la funcionalidad de bacterias probióticas.

Objetivos particulares

- Estudiar la performance de cultivos probióticos en quesos y yogures elaborados con leche tratada por Homogeneización de Alta Presión y las características del producto obtenido.
- Obtener derivados (variantes adaptadas) con resistencia incrementada a sales biliares a partir de cepas de lactobacilos de origen no intestinal y estudiar el efecto de la adaptación a bilis sobre sus propiedades funcionales.

CAPÍTULO I

HPH- Una nueva tecnología para la elaboración de alimentos probióticos

I.1 Alta presión de homogeneización. Una revisión del estado del arte.

Poco a poco el consumidor ha ido evolucionando en el sentido de sensibilizarse ante aspectos como la seguridad y la calidad alimentaria, el respeto por el medio ambiente y, por supuesto, los aspectos nutricionales y organolépticos de los alimentos que consume. Debido a ello, en los últimos años, diversas industrias han comenzado a trabajar para cubrir las demandas del consumidor, abordando la modernización de instalaciones, la búsqueda de nuevas tecnologías y la creación de sistemas de seguridad y de calidad. Estas nuevas tendencias de mercado han conducido a que tecnologías tradicionales como el tratamiento térmico estén siendo sustituidas en diferentes alimentos por tecnologías alternativas que evitan las pérdidas nutricionales y los cambios en las características organolépticas de estos alimentos cuando son sometidos a altas temperaturas. Dentro de estos nuevos tratamientos no térmicos podemos mencionar: alta presión hidrostática (HHP: high hydrostatic pressure), campos de pulsos eléctricos (PEFs: pulsed electric fields), ultrasonido de alta intensidad, luz ultravioleta, luz pulsada, radiación ionizante y campos magnéticos oscilantes (Ross y col., 2003). En los últimos años varios investigadores se han dedicado a estudiar la tecnología de altas presiones. La HHP, a pesar de mostrar resultados interesantes, tiene ciertas limitaciones tecnológicas. El hecho de que esta tecnología sólo permita tratar volúmenes pequeños de alimentos, sumado a que es un proceso discontinuo, ha llevado a que se comenzara a investigar una nueva tecnología de alta presión específica para el procesamiento de líquidos de manera continua llamada Alta Presión de Homogeneización (HPH).

La homogeneización ha sido utilizada por la industria láctea y alimentaria desde mediados del siglo XX. Si bien era utilizada para estabilizar emulsiones de alimentos, recién a partir del año 1970 comenzó a existir mayor interés en la aplicación de las altas presiones para el procesado de alimentos. Más recientemente, a principios de los años '90, se desarrolló una nueva generación de homogeneizadores llamados HPH (high pressure homogenizers). El diseño de los equipos de esta nueva tecnología es diferente y permite alcanzar presiones entre 10-15 veces mayores que los homogeneizadores clásicos (Paquin, 1999).

Los homogeneizadores convencionales que trabajan a presiones moderadas (entre 20-50 MPa = 197-494 atm) son comúnmente utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética para dispersar fases no miscibles, estabilizar

emulsiones y/o preparar productos con propiedades reológicas adecuadas. La homogeneización es de especial interés en la industria láctea donde es utilizada, desde hace años, para reducir el tamaño de los glóbulos de grasa en la leche y cremas y para prevenir el desnatado y la coalescencia durante el almacenamiento (Thiebaud y col., 2003). La HPH, también llamada presión dinámica, se basa en los mismos principios que la homogeneización convencional con la gran ventaja de que se pueden alcanzar presiones superiores a 350 MPa. Además, esta tecnología tiene la ventaja, en comparación con la tecnología de alta presión hidrostática (HHP), que permite tratar grandes volúmenes de alimentos, sumado a que es un proceso continuo y que el tiempo de aplicación es de unos pocos milisegundos (1/20 seg).

Podemos definir a la homogeneización de alta presión como una tecnología continua, o semicontinua, basada en la aplicación a alimentos fluidos (o a sustancias fluidificables), de presiones entre 20 y 400 MPa. En la HPH el fluido es impulsado bajo presión a través de un estrecho orificio donde está sujeto primero a una rápida aceleración y luego a un brusco descenso de presión. Durante esta secuencia se forman burbujas de vapor de agua y otros solventes en la masa del fluido (fenómeno de cavitación). Estas burbujas colapsan y ejercen un efecto explosivo sobre las partículas en suspensión e incluso sobre las células microbianas (Guerzoni y col., 1999a). En la Figura 1 se muestran los mecanismos de acción más probables de la HPH.

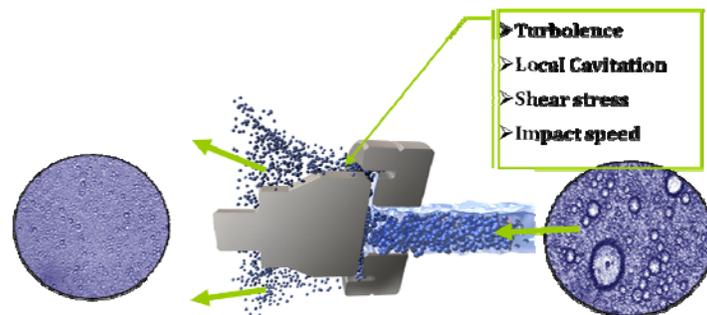


Figura 1. Mecanismos de acción más probables (turbulencia, cavitación local, fuerza de corte, velocidad de impacto) de la homogeneización de alta presión sobre una matriz líquida (GEA, Niro, Soavi, Italia).

Actualmente existen numerosos fabricantes de homogeneizadores de alta presión entre los que se encuentran: Panda (Gea Niro Soavi, Parma, Italia), APV-Rannie (Dinamarca), APV-Gaulin (USA), Microfluidizer (Microfluidics Corporation, USA), Nanojet (Askel, USA), Emulsiflex (Avestin, Canadá) y Stansted (Reino Unido). Estos equipos pueden alcanzar presiones de hasta 350 MPa y operan mediante mecanismos diferentes.

Si bien la HPH es considerada una tecnología alternativa a los tratamientos térmicos, durante el proceso de alta presión se produce un cierto incremento en la temperatura del fluido. Parte del calentamiento térmico viene dado por el calentamiento adiabático, mientras que la mayor parte del incremento de temperatura se debe a la energía cinética de las fuerzas de corte, cavitación y turbulencia que sufre el fluido al pasar por la válvula, parte de la cual es convertida en energía térmica en el producto (Hayes y Kelly 2003a). La diferencia es que en los tratamientos térmicos convencionales el fluido se calienta durante varios segundos, mientras que el tiempo de aplicación del tratamiento HPH es de milisegundos (Thiebaud y col., 2003; Bouaouina y col., 2006). Varios autores han informado un incremento de temperatura del fluido de entre 16 y 19°C por cada 100 MPa aplicados utilizando distintos equipos y distintas matrices y temperatura de entrada de la muestra (T_i) (Hayes y Kelly 2003a; Thiebaud y col., 2003; Datta y col., 2005).

1.2 Efectos de la HPH sobre los microorganismos

Los tratamientos térmicos (ej. pasteurización) siguen siendo los métodos más utilizados en la industria láctea para eliminar células vegetativas de microorganismos patógenos que pudieran estar presentes en la leche cruda y reducir la carga de microorganismos alterantes causantes de deterioros. Sin embargo, estos tratamientos pueden provocar cambios indeseables en la leche como off-flavours, oxidación no enzimática y desnaturalización de ciertas vitaminas y proteínas (Vachon y col., 2002). Respecto a la tecnología HPH, se ha evaluado su capacidad para inactivar a los diferentes microorganismos presentes en la leche como así también los mecanismos involucrados y los factores que afectan la inactivación microbiana.

Actualmente existe un gran debate respecto a los mecanismos que causan la inactivación de las células microbianas en un equipo de alta presión de

homogeneización. Kleinig y Middelberg (1998) proponen varios mecanismos como los responsables de la destrucción de la célula microbiana, entre ellos fenómenos de turbulencia, cavitación, impacto sobre superficies sólidas y movimiento viscoso. El incremento de temperatura alcanzado por el producto luego de pasar por la válvula también puede ejercer un efecto en la inactivación de los microorganismos (Hayes y col., 2005). Cuando la célula microbiana es sometida a altas presiones se producen cambios que resultan perjudiciales para el microorganismo. Se destruyen las membranas celulares debido a cambios irreversibles en las macromoléculas, principalmente las proteínas, se altera la homogeneidad de la capa intermedia entre la pared celular y la membrana plasmática, se inactiva la ATPasa de membrana y se alteran los ácidos nucleicos y ribosomas encargados de la síntesis de proteínas (Datta y Deeth, 1999).

Existen varios factores que pueden afectar la inactivación de los microorganismos tratados por alta presión. Entre ellos podemos mencionar el tipo de microorganismo (ya que la inactivación puede ser diferente según la forma y la composición de la pared), la temperatura de entrada de la muestra al equipo de HPH, la matriz en la cual se encuentra el microorganismo, la presión aplicada, el número de pases y la carga microbiana inicial.

1.2.a Tipo de microorganismo

En general, debido a las diferencias en la composición de las paredes celulares, las bacterias Gram positivas (entre ellas las BAL) son más resistentes a los tratamientos de alta presión que las bacterias Gram negativas (Vachon y col., 2002; Wuytack y col., 2002). Por otro lado, los bacilos se destruyen más fácilmente que los cocos. La destrucción de las esporas bacterianas es difícil debido a la elevada resistencia de las mismas tanto a las presiones como al calor (Thiebaud y col., 2003).

Algunos autores sugieren que las levaduras son más sensibles que las células bacterianas debido a su mayor tamaño y a que la estructura de su pared celular es diferente (Geciova y col., 2002). La HPH también ha sido utilizada para inactivar bacteriófagos (Moroni y col., 2002; Capra y col., 2009). Los resultados fueron diversos según el tipo de fago y, en general, el grado de inactivación alcanzado fue mayor al aumentar la presión aplicada y el número de pases por el equipo.

1.2.b Temperatura de entrada (Ti) de la muestra al equipo HPH

A temperatura ambiente, los lípidos de las membranas biológicas se encuentran en estado líquido-cristalino que provee la máxima permeabilidad y flexibilidad. A temperaturas bajas (2-10°C) se produce la cristalización de los fosfolípidos y la membrana se vuelve más rígida y, por lo tanto, más sensible a la presión. A temperaturas moderadamente altas (40-50°C) los enlaces de hidrógeno e hidrofóbicos se debilitan y las membranas celulares presentan menor resistencia a las altas presiones (Vachon y col., 2002). En su trabajo, Vachon y col. (2002) encontraron que la mayor resistencia de los microorganismos a las altas presiones se obtuvo a 25°C previo al tratamiento HPH y lo atribuyen a la mayor flexibilidad de la membrana celular a esta temperatura. Por otro lado, varios autores coinciden en que al incrementar la temperatura de entrada de la muestra se logra mayor inactivación microbiana (Thiebaud y col., 2003; Briñez y col., 2006; Smiddy y col., 2007).

1.2.c Tipo de matriz

La resistencia de un microorganismo al tratamiento HPH puede variar según la matriz en la cual se encuentre, ya que algunos componentes de la misma podrían ejercer un efecto protector sobre la célula. Vachon y col. (2002) inocularon *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 en dos matrices diferentes (buffer y leche) y observaron que el grado de inactivación de estos patógenos fue menor en leche que en buffer. Por otro lado, el contenido de grasa de la leche podría influir en el efecto del tratamiento HPH sobre los microorganismos aportando un efecto protector. Kheadr y col. (2002) observaron mayor inactivación de *Listeria innocua* en leche descremada o reducida en grasas que en leche entera.

1.2.d Nivel de presión y cantidad de tratamientos HPH

Varios trabajos realizados sobre diversos microorganismos, en diferentes matrices y utilizando equipos diferentes han demostrado que al incrementar la presión y el número de pases, se incrementa la inactivación de los microorganismos (Vachon y col., 2002; Wuytack y col., 2002; Thiebaud y col., 2003; Capra y col., 2009).

1.2.e Carga microbiana/viral inicial

Existen controversias en los resultados encontrados por diversos autores respecto a la carga inicial del microorganismo y el grado de inactivación alcanzado. Capra y col. (2009) observaron que al aplicar una presión de 100 MPa a una suspensión de fagos de $10^5 - 10^6$ UFP/ml, se logró una reducción $\geq 1,6$ ciclos logarítmicos, mientras que cuando la carga inicial fue más baja (10^2 , 10^3 ó 10^4 UFP/ml), la inactivación fue menor (< 1 ciclo log). Moroni y col. (2002), en cambio, observaron que el mayor grado de inactivación se observó cuando la concentración de fagos no superó 10^4 UFP/ml. Por su lado, Vachon y col. (2002) encontraron que la inactivación completa de *L. monocytogenes* a 200 MPa se alcanzó cuando la concentración bacteriana inicial no superó 10^4 UFC/ml.

1.3 Inactivación de la microflora de la leche

Pereda y col. (2007) estudiaron el efecto de la HPH (100-300 MPa, $T_i = 30-40^\circ\text{C}$) en la vida útil de la leche almacenada a 4°C . Los resultados mostraron que el tratamiento a 100 MPa no fue efectivo para reducir la población microbiana mientras que los tratamientos a 200 y 300 MPa mostraron una eficiencia del 99,9% (similar a la pasteurización HTST) en la reducción (3,5 órdenes logarítmicos) de microorganismos psicrotrofos, lactococos y bacterias totales, mientras que coliformes, enterococos y lactobacilos fueron completamente eliminados. Por otro lado, Vachon y col. (2002) inocularon *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en leche cruda y aplicaron tratamientos HPH de entre 100-300 MPa. Los resultados de sus estudios demostraron que luego de 5 pases a 200 MPa se logró una reducción de 8,3 órdenes log para *E. coli* O157:H7, mientras que para *L. monocytogenes* se redujeron 5,8 órdenes log luego de 5 pases a 300 MPa.

1.4 Efecto del tratamiento de HPH sobre los componentes de la leche

1.4.a Efectos de la HPH sobre las proteínas

En general, las propiedades funcionales de las proteínas se pueden clasificar en tres grupos: I) propiedades de hidratación que influyen en humectabilidad, adhesión, dispersión, solubilidad, viscosidad, absorción y retención de agua; II) propiedades

interfaciales que influyen en las características emulsionantes y espumantes; y III) propiedades de agregación y formación de geles, relacionadas a las interacciones proteína-proteína. Los efectos de las altas presiones sobre las proteínas están relacionados a la ruptura de las interacciones no-covalentes dentro de la molécula proteica y a la posterior formación de enlaces intra e intermoleculares dentro de la misma molécula o entre moléculas diferentes. Así, las altas presiones alteran la estructura cuaternaria y terciaria de las proteínas globulares pero casi no alteran la estructura secundaria (Bouaouina y col., 2006).

1.4.b Efectos de la HPH sobre las micelas de caseína

Sandra y Dalglish (2005) estudiaron el efecto de la HPH sobre las propiedades estructurales de las micelas de caseínas en leche a presiones de 41, 114 y 186 MPa. Sólo el tratamiento a 114 y 186 MPa generó una disminución significativa en el tamaño de las micelas. Por otro lado, Hayes y Kelly (2003a) demostraron que la leche descremada sometida a homogeneización convencional (18 MPa) y a alta presión (50-200 MPa) no presentó cambios en el tamaño de la micela de caseína a presiones ≤ 150 MPa, mientras que hubo una disminución del 5% del tamaño en las muestras homogeneizadas a 200 MPa. Es probable que la ruptura de las interacciones hidrofóbicas e iónicas causadas por la alta presión (Datta y Deeth, 1999) sumado a los fenómenos de cavitación, turbulencia y fuerzas de corte de la HPH sean los responsables de causar la ruptura de la micela de caseína (Sandra y Dalglish, 2005). Por otro lado, la HPH afecta la composición de las micelas, principalmente la κ - y α_s - caseínas, haciéndolas más solubles. Estas modificaciones en la estructura de la micela llevan a una ligera disminución en el tiempo de coagulación (Sandra y Dalglish, 2007).

1.4.c Efectos de la HPH sobre las proteínas de suero

Hayes y col. (2005) aplicaron tratamientos de 150-250 MPa ($T_i = 45^\circ\text{C}$) a leche entera y observaron que la β -lactoglobulina (β -lg) fue más sensible al tratamiento HPH que la α -lactoalbúmina (α -la). El porcentaje de desnaturalización de la β -lg se incrementó a medida que aumentó la presión aplicada, con más del 50% de desnaturalización a 250 MPa. La desnaturalización de la α -la en este rango de presiones fue, sin embargo, menor al 10%. La β -lg, que contiene dos enlaces disulfuro y un grupo

sulfhidrilo libre, es más sensible a las altas presiones que la α -la, que contiene cuatro enlaces disulfuro (Huppertz y col., 2002). En un trabajo previo, Hayes y Kelly (2003a) no observaron desnaturalización de las proteínas de suero. Esto podría deberse a la diferencia de temperatura alcanzada por la muestra, que en el último caso no superó los 55°C, mientras que en el primero llegó a 84°C. Bouaouina y col. (2006) estudiaron el efecto de la HPH sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas de suero. En este trabajo se utilizaron soluciones de aislados de proteínas de suero (3% p/p) las cuales fueron sometidas a presiones de entre 50 y 300 MPa. Las proteínas tratadas por HPH presentaron mejores propiedades estabilizantes y mayor hidrofobicidad superficial (atribuido a una mayor exposición de sitios hidrofóbicos debido a la ruptura de los agregados proteicos). De esta manera, el tratamiento a altas presiones parece mejorar la estabilidad y capacidad espumante de las proteínas.

1.4.d Efectos de la HPH sobre la grasa de la leche

Debido a que la HPH se basa en los mismos principios que la homogeneización convencional, varios autores han reportado disminución en el tamaño del glóbulo graso según la presión aplicada. Hayes y Kelly (2003a), trabajando a 50-200 MPa ($T_i = 6-10^\circ\text{C}$), observaron que no hubo diferencias significativas en la reducción del tamaño del glóbulo graso entre la leche control y la leche tratada a 50 MPa (1 paso). Los autores sugieren que el tratamiento HPH no fue efectivo debido a que la leche nunca alcanzó una temperatura mayor a 28°C por lo cual la grasa no estaba en estado líquido. Sólo con un tratamiento a 200 MPa se observó disminución en el tamaño de los glóbulos de grasa. Thiebaud y col. (2003) observaron que un tratamiento de 200-250 MPa y $T_i = 4-24^\circ\text{C}$ redujo significativamente el tamaño de los glóbulos de grasa de la leche cruda, mientras que a 300 MPa se observó la formación de agregados. Los autores sugieren que la formación de estos agregados puede deberse a que las proteínas del suero podrían estar demasiado desnaturalizadas para estabilizar los nuevos glóbulos grasos formados. Hayes y col. (2005) publicaron resultados similares a 250 MPa y sugirieron que la cantidad de caseína disponible para cubrir la mayor área de los glóbulos grasos sería limitada y podría haber aglomeración de los glóbulos grasos pequeños insuficientemente recubiertos.

1.4.e Efectos de la HPH sobre las enzimas de la leche

Datta y col. (2005) estudiaron el efecto de la HPH (200 MPa, Ti=10-50°C) sobre la actividad residual de la plasmina (PL), la fosfatasa alcalina (FA), la lactoperoxidasa (LP) y la lipoproteinlipasa (LPL) en leche de vaca cruda. La inactivación de la LP y la PL fue mayor en la leche tratada por HPH que en la leche tratada térmicamente; sin embargo, la inactivación de la FA fue similar para ambos tratamientos. La actividad residual de la LPL fue muy diferente según el tratamiento aplicado e incluso se observó un incremento significativo en la actividad de esta enzima en la leche tratada por HPH. Cuando la temperatura de salida de la leche HPH fue de aprox. 57°C, la actividad de la LPL fue un 240% mayor que el control. El mecanismo por el cual aumentaría la actividad de la enzima en el tratamiento HPH aún no se conoce. Hayes y Kelly (2003b) sugieren que la inactivación de la plasmina y de los derivados del plasminógeno por el tratamiento HPH estaría relacionada a la presencia de grasa en la leche. Las proteínas de membrana del glóbulo graso, que actúan como agentes emulsionantes, que previenen la floculación y coalescencia de la grasa de la leche y que además protegen la grasa contra la acción de las enzimas, no están presentes en cantidades suficientes luego del tratamiento HPH como para cubrir la mayor área interfacial grasa-líquido que se genera. Esta mayor superficie se estabiliza mediante la adsorción de micelas de caseínas. Como resultado de esta adsorción, las micelas de caseína distribuidas alrededor del glóbulo graso se pueden romper. Como la plasmina y el plasminógeno están asociados principalmente a las caseínas, la redistribución de las micelas podría desestabilizar la actividad de estos compuestos.

1.5 Elaboración de productos lácteos fermentados utilizando leche tratada por HPH

1.5.a Quesos

El grupo italiano liderado por la Dra. Guerzoni de la Università degli Studi di Bologna es pionero y de referencia en el estudio y aplicación de esta tecnología, alternativa al tratamiento térmico, para la elaboración de productos lácteos. En el año 1999 reportaron el efecto de 100 MPa de HPH sobre las características microbiológicas y fisicoquímicas de quesos elaborados con leche de cabra (Guerzoni y col., 1999b). Los

efectos directos de la HPH estarían relacionados, principalmente, a los cambios en la capacidad de ligar agua de las proteínas lo cual se vio reflejado por la menor sinéresis de los quesos. Los efectos indirectos estarían relacionados al crecimiento y la actividad microbiana, generando modificaciones en la población de bacterias lácticas naturalmente presentes en la leche y cambios durante la maduración. El tratamiento HPH favoreció el crecimiento de levaduras y la proliferación de BAL heterofermentantes. Los quesos HPH presentaron mayor rendimiento, mayor lipólisis y una microestructura más homogénea. El análisis sensorial luego de 30 días de maduración indicó que los quesos HPH se caracterizaron por presentar un sabor picante, sin retrogusto amargo y una textura más cremosa y untable. Los autores concluyeron que la mayor concentración inicial de los diferentes grupos microbianos en la cuajada de los quesos HPH se debería particularmente a la escasa separación de suero. Por otro lado, la presencia de ácidos grasos libres (AGL) de cadena corta podría favorecer el crecimiento de determinados grupos microbianos. Algunas especies de BAL homofermentantes (*Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) podrían inhibirse por la presencia de ácidos oleico, caproico y linoleico. La mayor actividad lipolítica y proteolítica de estos quesos podría estar relacionada a los cambios en la población microbiana o ser consecuencia de una diferente exposición de las macromoléculas a la actividad enzimática. A nivel molecular, el tratamiento HPH incrementaría la exposición de regiones hidrofóbicas de las proteínas.

Kheadr y col. (2002) estudiaron el efecto de la HPH (200 MPa) sobre la calidad microbiológica, reológica y microestructural de queso Cheddar. El tratamiento HPH provocó una marcada reducción en el tamaño de las micelas de caseína y de los glóbulos grasos además de mayor retención de humedad y proteína, y consecuentemente un aumento del rendimiento quesero en comparación con los quesos elaborados con leche pasteurizada. Los análisis reológicos revelaron que los quesos HPH mostraron una textura más firme, elástica y cohesiva debido a la formación de una matriz de caseína muy compacta y regular en la cual se detectaron glóbulos grasos pequeños.

Lanciotti y col. (2004a; 2006) compararon quesos Crescenza y Caciotta elaborados a partir de leche tratada térmicamente y por HPH. El tratamiento de la leche a 100 MPa provocó una disminución significativa en el pH del suero y en el tiempo de

coagulación, mientras que hubo un incremento del 1% en el rendimiento de los quesos Crescenza. Por otro lado, el tratamiento inicial de la leche afectó la carga inicial y la evolución durante la maduración de los cultivos starters, *Pseudomonas* spp. y levaduras. El tratamiento HPH favoreció el crecimiento de lactobacilos, mientras que no hubo diferencias para lactococos y redujo el número de *Pseudomonas fluorescens*, responsable de la producción de péptidos amargos en quesos Crescenza tradicionales. Por otro lado, estos autores observaron diferencias entre el tratamiento térmico y la HPH en cuanto a la acción selectiva sobre las levaduras ya que el primero parece favorecer las especies oxidativas y el segundo las fermentativas.

Varios autores han observado que el tratamiento HPH mejora las características de coagulación de la leche y modifica los equilibrios entre las formas solubles e insolubles del calcio, fósforo y nitrógeno (López-Fandino y col., 1998; Guerzoni y col., 1999b; Kheadr y col., 2002). Al igual que en los trabajos anteriores, los quesos Crescenza elaborados con leche tratada por HPH se caracterizaron por presentar lipólisis temprana. La menor lipólisis de los quesos elaborados con leche pasteurizada se podría atribuir a la inactivación térmica de la LPL nativa de la leche, la cual es resistente e incluso parece activarse con tratamientos a altas presiones.

Los quesos Caciotta elaborados con leche tratada por HPH presentaron mayor lipólisis y altas concentraciones de AGL luego del salado, además de mayor proteólisis, rendimiento y modificaciones en el perfil de compuestos volátiles. Lanciotti y col. (2006) sugieren que las modificaciones en la población microbiana y los diferentes patrones lipolíticos y proteolíticos causados por el tratamiento HPH podrían explicar las diferencias en las características sensoriales de los quesos Caciotta. A pesar de presentar perfiles de compuestos volátiles más sencillos, los quesos HPH recibieron los mayores puntajes respecto a color, apariencia, flavour, textura y sabor dulce. Estas características se pueden asociar a la ausencia de metil cetonas y compuestos sulfurados, a la mayor hidrólisis de proteínas y a las modificaciones de la microestructura de los quesos generados por el tratamiento HPH de la leche. Resultados similares fueron publicados por Vannini y col. (2008) para queso Pecorino elaborado con leche de oveja homogeneizada a 100 MPa.

Quevedo y col. (2008) estudiaron quesos de cabra elaborados con leche tratada a 200 MPa. Los estudios de microestructura mostraron que los glóbulos grasos en los

quesos elaborados con leche tratada por HPH se integraron completamente en la matriz proteica dando una estructura más compacta y los estudios de textura indicaron que dichos quesos fueron más firmes durante la maduración. En cuanto a la calidad microbiológica durante la maduración, los quesos HPH presentaron los mayores recuentos de lactobacilos, enterococos y micrococos. Estas diferencias en la microbiota de los quesos durante la maduración podrían afectar las características sensoriales de los mismos. Los lactobacilos podrían contribuir al proceso de maduración a través de la producción de ácido láctico o por sus actividades lipolíticas y proteolíticas.

1.5.b Leches fermentadas

Las leches fermentadas, consideradas como alimentos saludables, son productos de consumo masivo y, por lo tanto, cada vez es mayor el interés de la industria en la elaboración de productos que no presenten sinéresis durante el almacenamiento y que minimicen el agregado de estabilizantes. Teniendo en consideración las modificaciones generadas por el tratamiento de HPH sobre los componentes de la leche se podría esperar que esta tecnología mejore las propiedades gelificantes y la calidad de los yogures.

Lanciotti y col. (2004b), pertenecientes al grupo italiano donde se desarrolló esta parte del trabajo de Tesis, fueron los primeros investigadores en publicar un trabajo sobre los efectos de la HPH en la producción de yogures. Las presiones aplicadas fueron entre 30 y 75 MPa. En el trabajo mencionado, los autores evaluaron las características microbiológicas y reológicas de yogures elaborados con diferente contenido de grasa y sólidos de leche. El tratamiento de HPH pareció favorecer el crecimiento de *St. thermophilus* respecto a *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, lo cual podría ser beneficioso para evitar riesgos de post acidificación durante el almacenamiento refrigerado. La menor pérdida de viabilidad de *St. thermophilus* podría deberse al mayor contenido de aminoácidos en los yogures elaborados con leche tratada por HPH. El incremento en la viscosidad de los yogures al incrementar la presión estaría relacionado, por un lado, a modificaciones en el tamaño de los glóbulos de grasa y de las micelas de caseína y por otro, a modificaciones en las propiedades funcionales de los componentes de la leche. La textura de las leches fermentadas es un criterio importante para evaluar su calidad y juega un rol importante en la aceptación por parte del consumidor. Este

parámetro depende principalmente de la red de proteínas formada por las micelas de caseína en la cual quedan atrapados glóbulos grasos y suero. Algunos factores que afectan directamente la matriz proteica son el contenido de proteínas, el tratamiento térmico, la concentración de grasa, la presencia de agentes estabilizantes y la presencia de exopolisacáridos bacterianos. Los parámetros de viscosidad y firmeza dependen, sin embargo, del contenido de sólidos totales y del contenido y tipo de proteínas. Patrignani y col. (2007) demostraron que el tratamiento HPH de la leche afectó de manera significativa la textura de las leches fermentadas. Los parámetros reológicos como firmeza, índice de viscosidad y consistencia se incrementaron a medida que se incrementó la presión aplicada en el caso de leche con menos de 3% de sólidos no grasos. Los principales compuestos de aroma de las leches fermentadas y los yogures son el acetaldehído, etanol, 2 propanona, diacetilo y 2-butanona. Estos autores sugieren que el tratamiento HPH de la leche podría ser útil para la elaboración de leches fermentadas con elevados contenidos de diacetilo y acetaldehído o con perfiles aromáticos específicos. Los datos de la bibliografía indican que el tratamiento mediante HPH incrementa la fracción de nitrógeno soluble a pH 4,6, la susceptibilidad de las proteínas de suero y de las caseínas a la proteólisis, y por consiguiente, incrementa la disponibilidad de aminoácidos libres que pueden actuar como precursores del acetaldehído. Por otro lado, Hayes y col. (2003b) informaron que el tratamiento HPH de la leche descremada disminuyó el pH de la misma en mayor o menor medida según la severidad del tratamiento. Esta disminución en el pH podría favorecer la producción de diacetilo. Por otro lado, las modificaciones conformacionales y fisicoquímicas de las proteínas de la leche que generan cambios en la microestructura del alimento afectan indirectamente el crecimiento y metabolismo microbiano. Serra y col. (2007), sin embargo, evaluaron el efecto del tratamiento de HPH en la elaboración de yogures pero aplicando presiones mayores, de hasta 300 MPa. Los yogures elaborados a partir de leche tratada a 200 o 300 MPa presentaron mayor firmeza del gel, menor sinéresis y menor acidez titulable que los yogures obtenidos a partir de leche tratada térmicamente y adicionada de 3% de leche en polvo descremada. Estos resultados demuestran que la HPH podría ser útil para reemplazar, al menos parcialmente, el agregado de leche en polvo descremada. Este mismo grupo de investigadores estudió los niveles de proteólisis, lipólisis, oxidación lipídica y propiedades físicas durante el almacenamiento

de yogures elaborados a partir de leche tratada por HPH a 200 y 300 MPa, con $T_i = 30$ o 40°C (Serra y col., 2008; 2009a; 2009b). Los datos de proteólisis mostraron que los yogures elaborados a partir de leche tratada a 300 MPa mostraron perfiles proteolíticos similares a los yogures elaborados con leche tratada térmicamente. Por el contrario, los yogures elaborados a partir de leche tratada a 200 MPa mostraron mayor cantidad de péptidos hidrofóbicos sobre todo al final del período de almacenamiento (28 días) lo cual podría producir un sabor amargo indeseable. Tanto el nivel de lipólisis como el de oxidación fueron similares en todos los yogures, excepto en el yogur obtenido a partir de leche tratada a 200 MPa y $T_i = 30^\circ\text{C}$ en el cual los valores de AGL fueron elevados desde el día 1 de almacenamiento. Según los autores, esto se podría atribuir a la actividad residual de la LPL. La evaluación de las propiedades físicas de yogures firmes y batidos mostró que el tratamiento de HPH podría ser una alternativa a la tecnología tradicional para elaborar yogures firmes ya que los yogures batidos, si bien presentaron menor sinéresis y mayor consistencia, mostraron una textura granulosa que podría ser considerada como un defecto por los consumidores.

Cruz y col. (2009) y Ferragut y col. (2009) evaluaron el efecto de la HPH (200-300 MPa) sobre la leche de soja para la elaboración de yogures. De manera similar a los yogures elaborados con leche de vaca tratada por HPH, los yogures de leche de soja mostraron mayor firmeza y capacidad de retención de agua y la microestructura resultó más homogénea y compacta.

Más recientemente, Ciron y col. (2010) compararon los efectos de la HPH y la homogeneización convencional en la elaboración de yogures batidos con 0 y 1,5% de grasa. El tratamiento a altas presiones de la leche causó defectos en la calidad de los yogures sin grasa ya que los mismos presentaron mayor sinéresis y menor firmeza, cohesión y viscosidad. Los yogures con 1,5% de grasa, no mostraron diferencias en cuanto a textura y retención de agua, sin embargo, el tratamiento HPH fue más eficiente en la emulsificación de la leche (glóbulos de grasa más pequeños y homogéneos). Los dos tratamientos generaron diferencias en la microestructura del yogur. Los geles de los yogures HPH presentaron mayor tamaño de partículas, posiblemente debido a una mayor cantidad de glóbulos grasos unidos a proteínas.

En este contexto, queda demostrado que la tecnología de HPH es una herramienta útil para el desarrollo de nuevos productos lácteos, diferentes a los

tradicionales y con características estructurales, sensoriales y propiedades funcionales mejoradas respecto a aquellos. Sin embargo, al momento de la realización de este trabajo de Tesis no existían reportes sobre los efectos que estos cambios en la matriz láctea tratada por HPH podrían ejercer sobre el comportamiento de bacterias probióticas y sobre las características sensoriales de los productos que las contengan. En este contexto, el objetivo de esta parte del trabajo fue evaluar el potencial de la leche tratada por HPH para la elaboración de queso Crescenza y leches fermentadas conteniendo bacterias probióticas. En particular se evaluó la viabilidad de cultivos probióticos comerciales de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei*, adicionados como cultivos adjuntos, y el efecto de su adición sobre las características fisicoquímicas y sensoriales de los productos obtenidos.

CAPÍTULO Ia

Aplicación de la HPH a la elaboración de quesos probióticos

I.a.1 Introducción

El reconocimiento de los productos lácteos fermentados conteniendo bacterias probióticas como alimentos funcionales que proveen un efecto benéfico más allá de la nutrición básica y las evidencias clínicas de sus capacidades en la prevención, al menos parcial, de ciertas patologías ha incrementado notablemente su consumo y ha estimulado el desarrollo de nuevos productos (Boylston y col., 2004; Ong y col., 2007). Si bien las leches fermentadas son los productos más utilizados como vehículos para bacterias probióticas, varios trabajos han evaluado a los quesos como vehículos de estos microorganismos. Algunos de los quesos evaluados como vehículos de bacterias probióticas han sido: Gouda (Gomez y col., 1995); Cottage (Blanchette y col., 1996); Crescenza (Gobbetti y col., 1998); Arzua-Ulloa (Menéndez y col., 2000); Queso Fresco Argentino (Vinderola y col., 2000b); Caneastro Pugliese (Corbo y col., 2001); queso blanco (Kasimoglu y col., 2004); Estonio Pikatne (Songisepp y col., 2004); Queso Fresco Minas (Buriti y col., 2005); queso de cabra (Kalavrouzioti y col., 2005); Pategrass (Bergamini y col., 2006) y Cheddar (Ong y col., 2006).

Los quesos presentan varias ventajas respecto a los yogures y leches fermentadas como matrices para microorganismos probióticos debido a que generalmente presentan mayor pH y capacidad buffer, consistencia más sólida (menos oxígeno incluido) y mayor contenido de grasa (Boylston y col., 2004; Ong y col., 2007). Estas características confieren protección a las bacterias probióticas durante el almacenamiento y el paso a través del tracto gastrointestinal (TGI). La desventaja tecnológica del empleo de quesos como vehículos de probióticos es la pérdida de cultivos probióticos en el suero (Dinakar y Mistry, 1994; Ong y col., 2006), a menos que se emplee la tecnología de ultrafiltración, como se ha aplicado en el Bioqueso Ilolay Vita (Vinderola y col., 2000b). La mayoría de los trabajos científicos sobre la incorporación de probióticos a quesos se han focalizado en la sobrevivencia del microorganismo durante la elaboración y el almacenamiento; sin embargo, muchos menos estudios han considerado, además, el efecto de la incorporación de estos microorganismos sobre las características organolépticas de los quesos (Gobbetti y col., 1998; Buriti y col., 2005). La mayoría de las investigaciones se basan en la incorporación de cepas probióticas de bifidobacterias (solas o junto a lactobacilos) en quesos elaborados con cultivos iniciadores (starters) mesófilos (Ross y col., 2002). Por

el contrario, existen pocos trabajos sobre quesos elaborados con cultivos starters termófilos adicionados de lactobacilos probióticos (Gobbetti y col., 1998; Bergamini y col., 2006).

La homogeneización de alta presión es una de las alternativas más prometedoras a los tratamientos térmicos tradicionales para la preservación y diversificación de alimentos. Su efectividad en la inactivación de microorganismos patógenos y contaminantes en sistemas modelos y en alimentos está bien documentada (Guerzoni y col., 2002; Briñez y col., 2006). Además de las modificaciones en la microflora del alimento crudo, el tratamiento HPH induce cambios sobre las proteínas y grasas (Sandra y Dalgleish, 2005) y en las poblaciones microbianas capaces de crecer en el producto durante la maduración o el almacenamiento (Lanciotti y col., 2004a, b; 2006; 2007a).

El queso Crescenza es un queso blando, típico italiano, sin cáscara, de corto período de maduración y elaborado con starters termófilos. La tecnología y la selección de los cultivos starters han sido estandarizadas y estudiadas en profundidad (Neviani y Giraffa, 1993). De manera similar a otros quesos frescos, el queso Crescenza parece ser un vehículo apropiado para las bacterias probióticas ya que no se necesitan largos períodos de maduración, y el almacenamiento se realiza a temperaturas de refrigeración (Heller y col., 2003).

I.a.2 Objetivo

Evaluar la viabilidad de cultivos probióticos comerciales de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei*, adicionados como cultivos adjuntos, y los efectos de su adición sobre las características fisicoquímicas y sensoriales de queso Crescenza elaborado con leche tratada por HPH.

I.a.3 Materiales y Métodos

Los estudios de la aplicación de HPH para la elaboración de quesos Crescenza y yogures adicionados de bacterias probióticas se realizaron en el grupo de investigación que dirige la Dra. M.E. Guerzoni de la Università di Bologna, sede de Cesena, Italia.

I.a.3.1 Cultivo iniciador y bacterias probióticas

Se utilizó como cultivo iniciador (starter acidificante) un cultivo comercial liofilizado de *Streptococcus thermophilus* St 0.20 (Sacco, SRL, Como, Italia) y 2 cepas de bacterias probióticas comerciales *Lb. paracasei* A13 y *Lb. acidophilus* H5 (la identidad se mantiene reservada por cuestiones de confidencialidad). El cultivo starter se reactivó en 500 ml de leche estéril a 42°C, según las instrucciones del fabricante, para alcanzar un nivel de inóculo de 1×10^6 UFC/ml. Las bacterias probióticas se cultivaron en caldo MRS (Biokar, Beauvais, Francia) durante 16 hs (tres cultivos overnight previos a la elaboración) a 37°C y se centrifugaron (8.000 g, 20 min, 4°C). Los pellets se lavaron 2 veces con solución salina (NaCl 9 g/l) y se resuspendieron en leche descremada estéril (100 g/l) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido).

I.a.3.2 Tratamientos de la leche

Para cada elaboración de queso se homogeneizaron 20 l de leche cruda a 100 MPa (un ciclo) utilizando un homogeneizador de alta presión Panda (Niro Soavi, Parma, Italia) equipado con una válvula PNSA con un flujo de 10 l/h. La temperatura de entrada de la leche fue de aproximadamente 5°C y la temperatura de salida no superó los 30 ± 2 °C. La leche se recogió en recipientes estériles y se refrigeró inmediatamente a 4°C durante 12 hs. El tratamiento de pasteurización industrial de la leche (20 l) se realizó a 72,5°C durante 15 seg según procedimientos estándares de la planta (Mambelli, Bertinoro, Italia). La leche pasteurizada se enfrió inmediatamente a 40°C. En la Figura 2 se muestra el equipo de alta presión utilizado en este estudio.



Figura 2. Homogeneizador de alta presión utilizado en este estudio.

I.a.3.3 Elaboración de quesos, rendimiento y análisis de composición

Las elaboraciones se llevaron a cabo en una planta quesera industrial (Mambelli, Bertinoro, Italia). Se elaboraron 4 quesos tipo Crescenza: 1) queso HPH (queso elaborado con leche tratada por HPH); 2) queso P (elaborado con leche pasteurizada); 3) queso HPH-Pro (elaborado con leche tratada por HPH y adicionada luego de cultivos probióticos) y 4) queso P-Pro (elaborado con leche pasteurizada y adicionada luego de cultivos probióticos). Para la elaboración de cada queso se utilizaron 10 l de leche. A cada una de las leches mantenidas a 40°C se adicionó 4 g/l de acidificante (Lacmon S, Sacco, SRL). Luego de 5 minutos, se adicionaron 500 ml del cultivo starter (*St. thermophilus* St 0.20) para obtener un inóculo inicial de aprox. 1×10^6 UFC/ml. Se inocularon los cultivos frescos de *Lb. paracasei* A13 y *Lb. acidophilus* H5 a las leches para elaborar los quesos HPH-Pro y P-Pro de forma tal de alcanzar un recuento inicial de aproximadamente 7,5 log UFC/g de queso. Cuando el pH de las leches alcanzó un valor de 6,35 se adicionaron 7 g/l de NaCl (Carlo Erba, Milán, Italia) y 3 ml de cuajo comercial (12.500 U, 20% pepsina, 80% quimosina, Concorde, Novara, Italia). La coagulación se produjo en los siguientes 15 min. Luego de cortar la cuajada y dejarla en reposo 45 min, ésta se separó del suero y se colocó en moldes plásticos perforados hasta que alcanzó un valor de pH de 5,15 según procedimientos estándares y sugerencias propuestas por Neviani y Giraffa (1993) y Gobetti y col. (1998). Finalmente, los quesos

se almacenaron en recipientes plásticos herméticos a 4°C. El diagrama de flujo de las elaboraciones realizadas se muestra en la Figura 3.

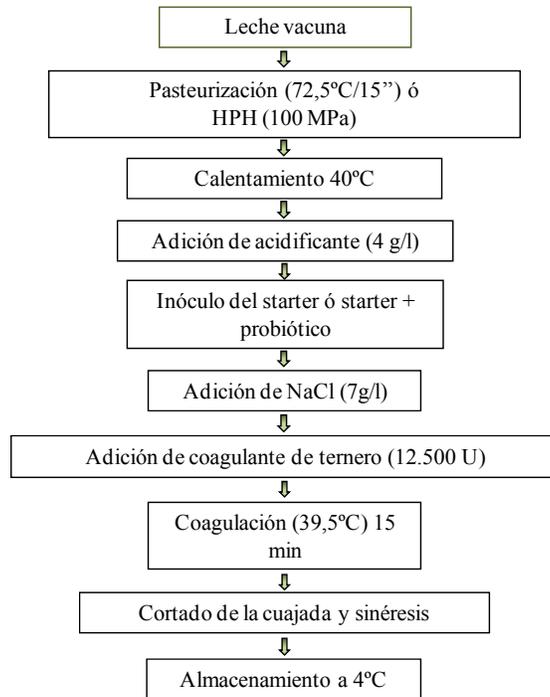


Figura 3. Diagrama de flujo de la elaboración de quesos.

El procedimiento de elaboración de los quesos se repitió en 3 días consecutivos en la misma planta industrial y utilizando leche de la misma granja. La composición de la leche cruda de vaca fue: pH: $6,76 \pm 0,04$; proteínas $3,59 \pm 0,04\%$ (p/p) y grasas $4,20 \pm 0,15\%$ (p/p).

El rendimiento de los quesos se calculó como la relación entre el peso de la leche utilizada para la elaboración de los quesos y el peso del queso obtenido. La composición de la leche y de los quesos al final del período de maduración se analizó según procedimientos estándares de la Federación Internacional de lechería (IDF, International Dairy Federation). Las proteínas de la leche y el contenido de grasa se determinaron según procedimientos de la IDF (1993 y 1986, respectivamente). El contenido de grasa, humedad y proteínas en quesos se cuantificaron mediante métodos de la IDF (1986, 1970, 1964, respectivamente). Durante el período de almacenamiento a

4°C de los quesos se realizaron análisis microbiológicos, fisicoquímicos y organolépticos.

I.a.3.4 Análisis microbiológico y medida de pH

Para los recuentos microbianos se agregó una muestra de 10 ml de leche o de 20 g de queso a 90 o 180 ml de citrato de sodio al 2% (p/v), respectivamente. Las muestras de queso se homogeneizaron durante 3 min en stomacher (Lab-Blender 80, Pbi, International, Milán, Italia). Se realizaron diluciones decimales de las muestras de leche y de los homogenados en agua de peptona 0,1% (p/v) y se sembraron 100 µl de las diluciones correspondientes en superficie en medio agarizado. Los medios de cultivo empleados y las condiciones de incubación se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Medios de cultivo empleados y condiciones de incubación para los recuentos microbiológicos.

Microorganismo/Grupo	Medio de cultivo	Incubación (aerobiosis)
<i>St. thermophilus</i> St 0.20	Agar M17 (Biokar)	37°C, 48 hs
<i>Lb. paracasei</i> A13	Agar MRS-LP (0,2 % p/v cloruro de litio y 0,3% p/v de propionato de sodio) (Biokar)	37°C, 48 hs
<i>Lb. acidophilus</i> H5	Agar MRS-bilis (0,15% p/v sales biliares bovinas, Sigma) (Biokar)	37°C, 48 hs
Microflora láctica total (MLT)	Agar para Recuento en Placa (Oxoid) + 10% (v/v) leche descremada estéril (Oxoid)	37°C, 48 hs
Levaduras	Agar Sabouraud dextrosa (Oxoid)	30°C, 48 hs
Microestafilococos (incluyendo <i>Staphylococcus aureus</i>)	Agar Baird Parker (Oxoid) + emulsión de yema de huevo (50 ml/l) y telurito (0,1 g/l)	37°C, 48 hs
Enterococos	Slanetz y Bartley (Oxoid)	37°C, 48 hs
Enterobacterias	Agar glucosa bilis rojo violeta (Oxoid)	37°C, 24 hs
<i>Escherichia coli</i>	Agar bilis rojo violeta (Oxoid) + 4 methylumbelliferyl-β-D-glucuronido (0,1g/l)	37°C, 24 hs

Para la detección de *Listeria monocytogenes* se siguió el método propuesto por Mc Clain y Lee (1988), mientras que la presencia de *Salmonella* spp. se investigó según Andrews y Hammark (1998).

El pH de la leche y de los quesos se midió utilizando un pHmetro Hanna Instruments 8519 (Incofar, Modena, Italia). La medida se realizó en 10 ml de leche y en 10 g de queso homogeneizado con 10 ml de agua destilada.

I.a.3.5 Determinación de la proteólisis, lipólisis y del contenido de aminoácidos

La proteólisis de los quesos se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE. Se utilizó un sistema de geles vertical Hoefer SE 600 Series (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido) según el método de Laemmli (1970). El volumen de la muestra sembrado fue de 20 μ l y las concentraciones de los geles de separación y concentración fueron 15% (v/v) y 5% (v/v) de acrilamida-bisacrilamida, respectivamente. Los extractos de proteínas y péptidos se prepararon homogeneizando en stomacher 5 g de queso con 20 ml de agua destilada durante 3 min a 20°C, luego se incubaron durante 1 h a 40°C a pH 4,6 (ajustado con HCl 0,1N) según el método de Kuchroo y Fox (1982). La muestra se centrifugó (3.000 g, 20 min, 5°C), el pellet se resuspendió en 5 ml de urea 5M y se almacenó en freezer a -20°C hasta el momento del análisis SDS-PAGE. Antes de realizar el análisis se tomaron 150 mg de la suspensión anterior y se mezclaron con 2,5 ml de Tris 0,166M-EDTA 1mM, pH 8, y 2,5 ml de SDS 7%. La mezcla se centrifugó a 5.000 g durante 20 min a 4°C. Las soluciones de péptidos largos y proteínas se prepararon calentando 1 ml de los sobrenadantes durante 5 min a 95°C y luego se añadió 0,2 ml de β -mercaptoetanol. Antes de cargar las muestras en los geles se les añadió 0,2 ml de glicerol y 0,2 ml de bromofenol (0,02% p/v). Se utilizaron estándares de peso molecular SDS-PAGE Molecular Weight Standard Broad Range (Bio-Rad Laboratories, Milán, Italia). Luego de la corrida electroforética, los geles se tiñeron con una solución de Coomassie Blue, 0,3 mM, 40% de metanol y 7% de ácido acético glacial. Los geles se decoloraron en una solución de metanol 5% (v/v) y ácido acético glacial 7% (v/v) durante 15 hs.

La presencia de ácidos grasos libres en los 4 tipos de quesos se determinó luego de 1 y 12 días de almacenamiento refrigerado. La extracción de lípidos de los quesos se realizó según el método descrito por de Jong y Badings (1990). El extracto de heptano-

dietil éter se pasó a través de una columna de extracción de aminopropilo (Bond Elut aminopropil) (3 ml con 500 mg de sílice modificada con grupos aminopropilos, IST, Mid Glamorgan, Reino Unido) la cual fue acondicionada con 10 ml de heptano. Los AGL se eluyeron con 10 ml de dietil éter adicionado de ácido fórmico 2% (v/v). Para el análisis de cromatografía gaseosa se utilizó un cromatógrafo de gas (Agilent Hewlett-Packard 6890GC) equipado con un detector de masas 5970 MSD (Hewlett-Packard, Geneva, Suiza) y una columna capilar de sílice fundida recubierta con un film de 0,2 μm de Carbowax como fase estacionaria (30 m x 0,32 μm i.d) (Supelco, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: temperatura de inyección 250°C, temperatura del detector 250°C, gas carrier (He) con un flujo de 1,5 ml/min; relación de split 1:50 (v/v). El programa de temperatura del horno fue el siguiente: 50°C durante 2 min, aumento de la temperatura hasta 220°C a razón de 4°C/min la cual se mantuvo durante 8 min. La identificación de los AGL se realizó comparando los tiempos de retención de los AGL desconocidos con los tiempos de retención de AGL estándares conocidos (Sigma-Aldrich). Además, la identificación de los AGL se realizó mediante comparación de los datos de masas espectrales con los datos de aquellos compuestos encontrados en la base de datos de masas espectrales Agilent Hewlett-Packard NIST 98 y Wiley versión 6. La cuantificación de los niveles de AGL presentes en las muestras de quesos se realizó utilizando un estándar interno (C13:0) en una concentración de 2 mg/ml.

El análisis de HPLC en fase reversa de los aminoácidos libres (AAL) se realizó según el método de Izco y col. (2000) al final del período de maduración de los quesos (12 días). El equipo de HPLC (Waters Corporation, Milford, MA) tenía 2 bombas M510 conectadas a un inyector Ultra Wisp 715. La columna de fase reversa Waters Pico-Tag C18 (Waters, Milán, Italia) se termostató a 46°C y los picos se detectaron utilizando un detector de arreglos de fotodiodos M966 a 254 nm y una computadora NEC PowerMate 486/33i, con el software Millennium 2010 para la cuantificación. Para la identificación y cuantificación de los AAL se utilizó como estándar interno una solución de aminoácidos (Sigma-Aldrich) a la cual se le adicionó metionina sulfona. Se utilizó un gradiente con 2 solventes para correr las muestras: solución A (compuesta de acetato de sodio pH 6,55 ajustado con ácido acético y tratado con acetonitrilo 2,5%) y, solución B (acetonitrilo 45%, agua 40%, metanol 15%). Antes de cada inyección se

equilibró la columna con el solvente A durante 20 min. Los análisis fisicoquímicos se realizaron por duplicado en 3 muestras (elaboradas en 3 días diferentes) de cada tipo de queso y, por lo tanto, los datos son valores promedios de 3 repeticiones y 2 replicados.

I.a.3.6 Determinación de compuestos volátiles

Se determinaron los compuestos volátiles a los días 1 y 12 de almacenamiento refrigerado. Se utilizó la técnica de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas acoplada a microextracción en fase sólida (GC-MS-SPME). Se colocaron 5 g de muestra en viales estériles de 10 ml de capacidad, se sellaron con un septum de politetrafluoroetileno (PTFE)/silicona. Las muestras se equilibraron durante 20 min a 50°C y los compuestos volátiles se adsorbieron en una fibra de sílice fundida recubierta de Carboxen/Polydimethyl Siloxane 75 µm (Supelco) durante 40 min. Las moléculas volátiles retenidas en la fibra fueron desorbidas en el cromatógrafo gaseoso durante 5 min. Para la detección de los picos se utilizó un cromatógrafo de gas Agilent Hewlett-Packard 6890 GC equipado con un detector de masas 5970 MSD (Hewlett-Packard, Geneva, Suiza) y una columna capilar de sílice fundida (50 m x 0,32 i.d) recubierta con una fase de 1,2 µm polietilenglicol (Chrompack CP-Wax 52 CB, Meddelburg, Holanda) como fase estacionaria. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: temperatura de inyección 250°C, temperatura del detector 250°C, gas carrier (He) flujo 1 ml/min; relación de split 1:20 (v/v). La temperatura del horno se programó de la siguiente manera: 50°C durante 1 min., de 50°C a 65°C a 4,5°C/min, de 65°C a 230°C a 10°C/min la cual se mantuvo durante 25 min. La identificación de los picos de los compuestos volátiles se realizó mediante comparación de sus masas espectrales con las publicadas en las librerías Agilent Hewlett-Packard NIST 98 y Wiley versión 6. El análisis GC-MS-SPME se realizó por triplicado.

I.a.3.7 Evaluación sensorial

El análisis sensorial de los quesos se realizó luego de 8 días de almacenamiento refrigerado. El mismo fue realizado por 25 evaluadores entrenados pertenecientes a la universidad. Se analizaron 20 g de cada muestra las cuales se sirvieron a 15°C bajo condiciones ambientales y de luz controladas de acuerdo a los estándares 8589 (ISO, 1988), sugerido por Gallardo-Escamilla y col. (2007). Se solicitó que se evalúe color,

flavour, firmeza, apariencia, acidez, sabor picante, amargo, sabor dulce, sabor a leche, salado, cremosidad y aceptación general dándole a cada atributo un valor entre 0 (bajo o pobre) y 10 (alto o muy bueno).

I.a.3.8 Estudios moleculares

I.a.3.8.i Extracción de ADN de cultivos puros y extracción de ADN total de los quesos

Para la extracción de ADN genómico de los cultivos puros y de ADN total de los quesos se utilizaron los kits Insta Gene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Milán, Italia) y Mo-bio (Cambrex Biosciences, Bergamo, Italia), respectivamente, según los procedimientos indicados por los fabricantes.

I.a.3.8.ii Amplificación del ADN

La amplificación del ADN se realizó mediante PCR de un fragmento de aproximadamente 200 pb de la región variable (V2-V3) del gen del 16S ARNr. Se utilizaron los primers HDA1-GC (5'-AC TCC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'; un segmento GC de 40 bp se añadió al extremo terminal 5' del primer) y HDA2 (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3') (Walter y col., 2000). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 40 µl conteniendo 0,5 mM de cada primer, 200 mM de dNTPs (Takara, Otsu, Shiga, Japón), 2,5 mM de MgCl₂ (Takara), 0,5 U de Taq ADN polimerasa (Takara), buffer de PCR 1x (Takara) y 10 µg/ml de ADN (Theunissen y col., 2005). El programa de amplificación fue el siguiente: 94°C durante 4 min, 30 ciclos de 94°C durante 30 seg, 56°C durante 30 seg, 72°C durante 60 seg y luego 72°C durante 8 min (Fasoli y col., 2003). Se utilizó un termociclador T3000 (Biometra, Göttingen, Alemania).

I.a.3.8.iii Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante

Los fragmentos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) utilizando el sistema Bio-Rad DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Milán, Italia). Se cargaron directamente 35 µl del producto de PCR en un gel de poliacrilamida (80 g/l) en buffer TAE 0,5 X con un gradiente desnaturizante lineal de

30% a 70% (v/v). La solución desnaturizante al 100% contenía 40% (v/v) de formamida y 7,9 M de urea. La corrida electroforética se realizó durante 6 hs a 60°C con un voltaje constante de 130V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, se enjuagaron con agua destilada y se fotografiaron bajo luz UV (Theunissen y col., 2005). Como marcadores se utilizaron iguales cantidades de los amplicones obtenidos a partir del ADN de las cepas *St. thermophilus* St. 0.20, *Lb. acidophilus* H5 y *Lb. paracasei* A13.

1.a.3.9 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía utilizando el paquete estadístico Statistica para Windows 6.1 (Statsoft Inc., Tulsa, Reino Unido). La capacidad de cada evaluador para discriminar entre las muestras se investigó utilizando comparaciones post-hoc del ANOVA.

I.a.4 Resultados

I.a.4.1 Composición de la leche cruda, rendimiento y composición de los quesos

Algunos parámetros fisicoquímicos de la leche cruda fueron los siguientes: pH: $6,76 \pm 0,04$; proteínas $3,59 \pm 0,04\%$ (p/p) y grasas $4,20 \pm 0,15\%$ (p/p). Los datos de recuentos microbianos de la leche cruda, tratada por HPH y pasteurizada se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Recuentos microbianos (log UFC/ml \pm SD) de la leche cruda, tratada por HPH y pasteurizada.

Grupos microbianos	Leche		
	Cruda	HPH	Pasteurizada
Microflora láctica total (MLT)	$4,0 \pm 0,2^a$	$3,8 \pm 0,3^{ab}$	$3,2 \pm 0,2^b$
Levaduras	$3,0 \pm 0,3^a$	$1,6 \pm 0,3^b$	$2,0 \pm 0,5^{ab}$
Enterococos	$2,0 \pm 0,2^a$	$1,6 \pm 0,3^{ab}$	$1,0 \pm 0,2^b$
Microestafilococos	$3,0 \pm 0,3^a$	$3,2 \pm 0,3^a$	$2,1 \pm 0,3^b$
BAL (bacilos)	$4,0 \pm 0,2^a$	$4,2 \pm 0,4^a$	$1,9 \pm 0,1^b$
BAL (cocos)	$4,3 \pm 0,4^a$	$4,3 \pm 0,3^a$	$3,6 \pm 0,4^a$
Enterobacterias	$2,0 \pm 0,2^a$	$0,8 \pm 0,3^b$	$1,2 \pm 0,2^b$

^{a, b} Para cada fila, los valores con distinto superíndice son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

El tratamiento HPH fue menos efectivo ($p < 0,05$) que la pasteurización en la reducción de lactobacilos totales y microestafilococos, mientras que no se observaron diferencias entre los dos tratamientos para cocos lácticos, levaduras, enterobacterias y enterococos que presentaron, en todos los casos, niveles menores a 2 órdenes log. No se detectó *L. monocytogenes* ni *Salmonella* spp. El nivel de *E. coli* y *Staphylococcus aureus* fue menor a la sensibilidad del límite de detección (1 orden log). El pH de la leche HPH, medido inmediatamente antes de la adición de los cultivos (probióticos y starter) y del cuajo (12 hs luego del tratamiento HPH) mostró una disminución de 0,23 puntos con respecto al pH de la leche pasteurizada ($6,55 \pm 0,02$). Luego de 12 días de almacenamiento refrigerado se determinó la composición de los quesos. No se

observaron diferencias significativas en relación al tratamiento previo de la leche ni a la adición de bacterias probióticas. En la Tabla 3 se observan los valores obtenidos, los cuales están dentro de los valores reportados como normales para quesos Crescenza (Botazzi, 1993).

Tabla 3. Composición de los quesos luego de 12 días de almacenamiento a 4°C.

Tipo de queso	Contenido (%)		
	Proteínas	Materia grasa	Humedad
HPH	13,14 ± 2,13 ^a	20,50 ± 2,50 ^a	63,18 ± 3,27 ^a
P	13,14 ± 1,80 ^a	23,50 ± 2,30 ^a	60,00 ± 3,40 ^a
HPH-Pro	14,29 ± 1,80 ^a	21,00 ± 2,15 ^a	61,83 ± 3,10 ^a
P-Pro	14,99 ± 1,20 ^a	20,00 ± 2,00 ^a	62,25 ± 3,20 ^a

^a Para cada columna, los valores con los mismos superíndices no son estadísticamente diferentes ($p > 0,05$).

El tratamiento HPH de la leche incrementó ($p < 0,05$) significativamente el rendimiento de los quesos en aproximadamente un 1%. Este parámetro no resultó afectado por la adición de microorganismos probióticos. La presencia de *Lb. acidophilus* H5 y *Lb. paracasei* A13 generó una disminución significativa ($p < 0,05$) en el pH de los quesos durante el almacenamiento refrigerado, independientemente del tratamiento inicial de la leche (HPH o pasteurización). Sólo los quesos adicionados de las bacterias probióticas presentaron valores de pH por debajo de 5 ($4,97 \pm 0,03$ y $4,69 \pm 0,06$ en los quesos HPH-Pro y P-Pro, respectivamente). El queso HPH presentó el valor de pH más elevado ($5,13 \pm 0,07$) mientras que el queso P presentó un valor de pH característico de $5,08 \pm 0,05$.

En la Figura 4 se observan las 4 variedades de queso Crescenza elaborados. Los quesos se almacenaron a 4°C envueltos en papel dentro de recipientes plásticos herméticos. Luego de 12 días de almacenamiento se observó que los quesos HPH y HPH-Pro no presentaban desuerado a diferencia de los quesos P y P-Pro (Figs. 4a y b, respectivamente). Por otro lado, se puede observar la diferencia en la textura de los mismos. Los quesos elaborados a partir de leche HPH presentaron una textura más

firme (mayor consistencia) que los quesos elaborados a partir de leche pasteurizada (Figs. 4c y d).

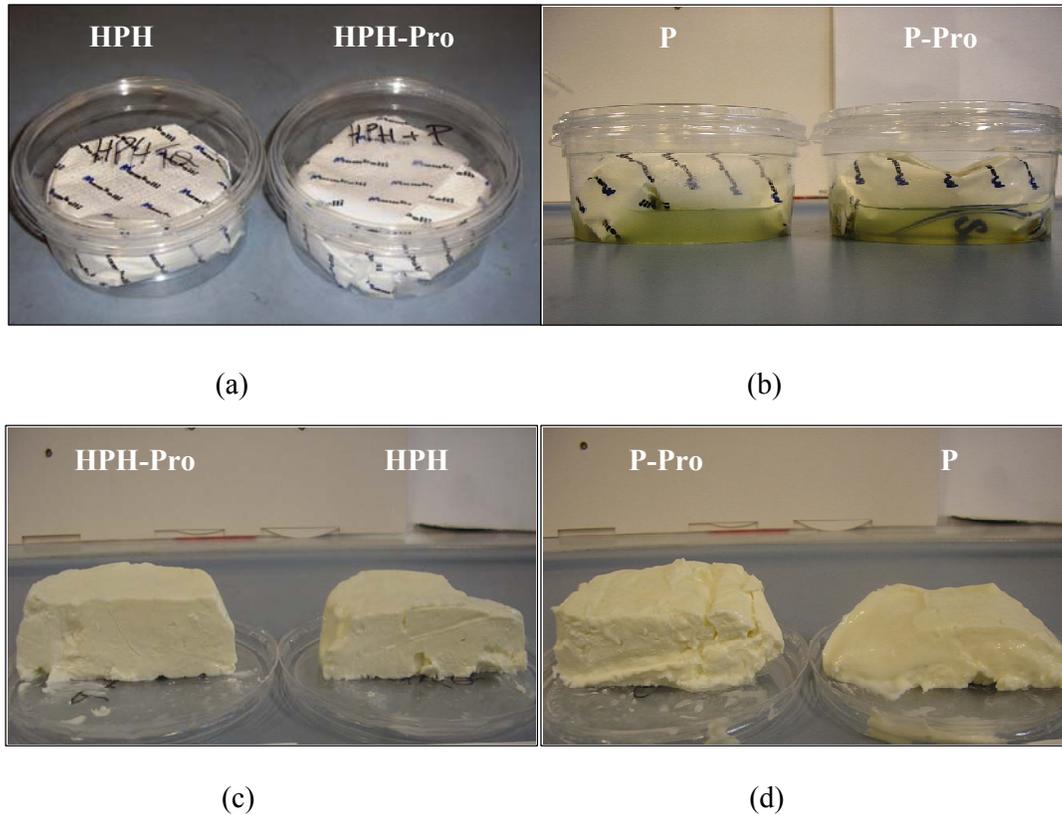


Figura 4. Fotografía del desuerado de los quesos HPH, HPH-Pro, P y P-Pro (a y b) y de la textura de los mismos (c y d) luego de 12 días de almacenamiento a 4°C.

1.a.4.2 Cambios en la microflora de los quesos durante el almacenamiento refrigerado

Los cambios en la microflora de los quesos durante el almacenamiento refrigerado a 4°C se muestran en la Tabla 4. Los análisis microbiológicos se realizaron por duplicado en 3 muestras (elaboradas en 3 días diferentes) de cada tipo de queso y, por lo tanto, los datos son valores promedios de 3 repeticiones y 2 replicados.

Tabla 4. Recuentos (log UFC/ml \pm SD) de la microflora de los quesos durante la conservación refrigerada.

Tipo de queso	Almacenamiento (días)	MLT	<i>St. thermophilus</i> St 0.20	<i>Lb. paracasei</i> A13	<i>Lb. acidophilus</i> H5	Levaduras	Enterobacterias	Microestafilococos	Enterococos
HPH	1	8,8 \pm 1,0	7,1 \pm 0,5	-	-	2,8 \pm 0,8	3,3 \pm 0,3	6,1 \pm 0,3	5,7 \pm 0,8
	5	8,9 \pm 0,6	8,5 \pm 1,0	-	-	2,9 \pm 1,1	3,6 \pm 0,6	6,3 \pm 0,7	5,6 \pm 0,4
	8	8,8 \pm 0,5	8,6 \pm 1,5	-	-	3,0 \pm 0,9	3,8 \pm 0,4	6,3 \pm 1,3	5,6 \pm 0,9
	12	8,8 \pm 0,1 ^a	8,9 \pm 0,3 ^a	-	-	3,3 \pm 0,3 ^b	4,7 \pm 0,1 ^a	6,2 \pm 0,2 ^a	5,4 \pm 0,1 ^a
HPH-Pro	1	7,9 \pm 1,1	7,0 \pm 0,3	8,0 \pm 0,8	7,2 \pm 0,6	2,9 \pm 0,2	3,5 \pm 0,6	5,5 \pm 0,4	3,8 \pm 0,8
	5	8,9 \pm 0,9	8,8 \pm 0,8	7,8 \pm 1,2	7,2 \pm 1,0	3,1 \pm 0,1	3,9 \pm 0,9	5,8 \pm 0,2	5,6 \pm 0,5
	8	8,7 \pm 0,5	8,7 \pm 1,0	7,8 \pm 0,5	6,3 \pm 0,4	2,8 \pm 0,3	4,8 \pm 0,3	4,5 \pm 0,3	5,1 \pm 0,9
	12	8,9 \pm 0,1 ^a	8,6 \pm 0,1 ^{ab}	7,9 \pm 0,3 ^a	7,0 \pm 0,2 ^a	3,5 \pm 0,2 ^a	4,6 \pm 0,2 ^a	5,5 \pm 0,3 ^b	4,9 \pm 0,1 ^b
P	1	8,9 \pm 0,6	7,9 \pm 0,1	-	-	2,0 \pm 0,1	2,7 \pm 0,2	3,6 \pm 1,0	2,6 \pm 0,3
	5	9,0 \pm 0,3	8,5 \pm 0,8	-	-	2,5 \pm 0,6	2,8 \pm 0,2	4,0 \pm 0,5	3,1 \pm 0,7
	8	9,2 \pm 0,6	8,7 \pm 0,8	-	-	3,0 \pm 0,3	2,5 \pm 0,7	4,0 \pm 0,5	3,2 \pm 0,2
	12	9,0 \pm 0,1 ^a	8,4 \pm 0,1 ^b	-	-	4,4 \pm 0,4 ^c	2,6 \pm 0,2 ^b	3,7 \pm 0,5 ^c	3,2 \pm 0,2 ^c
P-Pro	1	8,7 \pm 0,9	8,0 \pm 0,3	7,6 \pm 0,9	7,2 \pm 0,5	2,1 \pm 0,2	2,6 \pm 0,4	4,3 \pm 0,2	2,6 \pm 0,7
	5	8,9 \pm 1,1	8,5 \pm 0,5	7,8 \pm 1,0	6,0 \pm 0,7	2,3 \pm 0,3	3,3 \pm 0,2	4,5 \pm 0,7	2,7 \pm 0,4
	8	9,1 \pm 0,4	8,9 \pm 0,7	8,0 \pm 0,5	5,3 \pm 0,5	3,8 \pm 0,4	3,0 \pm 0,4	4,6 \pm 0,1	2,7 \pm 0,7
	12	9,0 \pm 0,2 ^a	8,6 \pm 0,1 ^{ab}	7,7 \pm 0,2 ^a	6,0 \pm 0,1 ^b	3,6 \pm 0,2 ^a	2,2 \pm 0,3 ^b	4,6 \pm 0,1 ^d	3,0 \pm 0,1 ^c

^{a-d} Para cada columna, los valores luego de 12 días de almacenamiento refrigerado con los mismos superíndices no son estadísticamente diferentes ($p > 0,05$).

En nuestro trabajo, los recuentos de *St. thermophilus* St 0.20 fueron de aproximadamente 7,5 órdenes log UFC/g luego de un día de almacenamiento refrigerado y entre 8,4 y 8,9 órdenes log UFC/g hacia el final del período de maduración (12 días). Los microorganismos probióticos mostraron buena viabilidad luego de 12 días de almacenamiento refrigerado. Los recuentos de *Lb. paracasei* A13 se mantuvieron similares a los recuentos iniciales (8,0 y 7,6 órdenes log UFC/g en los quesos HPH-Pro y P-Pro respectivamente). *Lb. acidophilus* H5 mostró, sin embargo, mayor viabilidad celular en los quesos HPH-Pro que en los quesos P-Pro. En los quesos HPH-Pro, los recuentos iniciales y finales fueron similares (aprox. 7 órdenes log UFC/g) mientras que en los quesos P-Pro, el recuento inicial (7,2 órdenes log UFC/g) disminuyó a 6,0 órdenes log UFC/g luego de 12 días de almacenamiento. La presencia e identidad de las dos cepas probióticas hacia el final del período de maduración se confirmó mediante técnicas moleculares (DGGE) (Fig. 5).

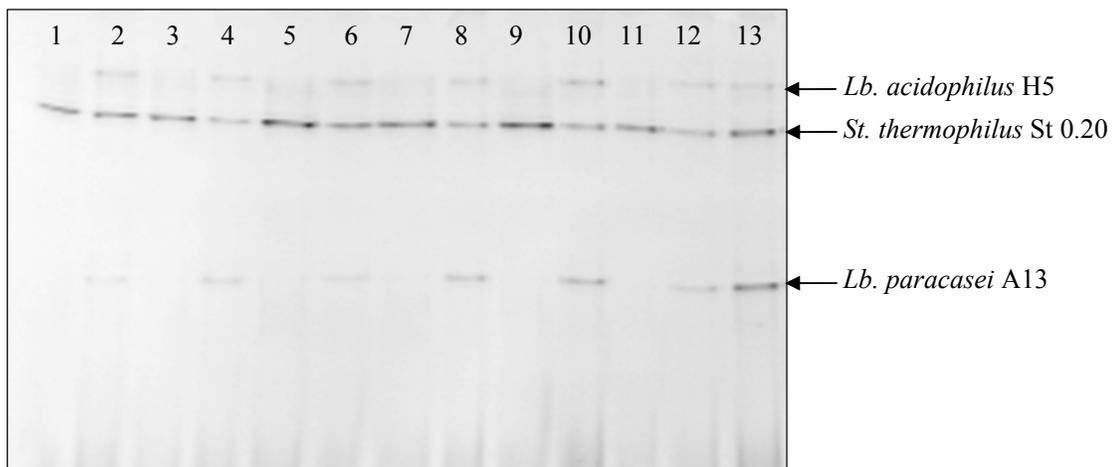


Figura 5. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). Perfiles de los amplicones de los diferentes quesos Crescenza a los días 1, 5 y 12 de almacenamiento refrigerado. 1: Queso P (1 d); 2: Queso P-Pro (1 d); 3: Queso HPH (1 d); 4: Queso HPH-Pro (1 d); 5: Queso P (5 d); 6: Queso P-Pro (5 d); 7: Queso HPH (5 d); 8: Queso HPH-Pro (5 d); 9: Queso P (12 d); 10: Queso P-Pro (12 d); 11: Queso HPH (12 d); 12: Queso HPH-Pro (12 d); 13: mezcla de ADN de las cepas inoculadas (*St. thermophilus* St 0.20, *Lb. acidophilus* H5 y *Lb. paracasei* A13).

Al comienzo del período de almacenamiento (día 1) los quesos HPH presentaron mayores recuentos de levaduras, enterobacterias, microestafilococos y enterococos que los quesos elaborados con leche pasteurizada, posiblemente debido a la mayor eficiencia del tratamiento térmico en la inactivación de la microflora de la leche cruda. El recuento de esta microflora no láctica se incrementó sólo ligeramente ($<0,6$ órdenes log UFC/g) en los quesos, con excepción de las levaduras (en los quesos P y P-Pro), enterobacterias (en los quesos HPH y HPH-Pro) y enterococos (en quesos HPH-Pro) (donde hubo incrementos de entre 1,1 a 2,4 órdenes log UFC/g).

1.a.4.3 Ácidos grasos libres

En la Tabla 5 se muestran los contenidos de AGL en los quesos a los días 1 y 12 de almacenamiento a 4°C. Hacia el primer día de almacenamiento los quesos HPH y HPH-Pro se caracterizaron por la presencia de 17 y 16 ácidos grasos de cadena media y larga, respectivamente. Estos perfiles se mantuvieron prácticamente inalterados hacia el final del período de conservación.

Por otro lado, los quesos elaborados a partir de leche pasteurizada mostraron, al día 1, un patrón de ácidos grasos más simple, con ausencia de los ácidos C8:0, C10:0, C12:0, iC15:0, aC15:0, C16:1, C17:0, iC17:0, aC17:0 e incluso ácidos grasos de cadena larga como C18:2, C18:3 y C20:0. Hacia el día 12 de almacenamiento los quesos P presentaron un perfil de AGL más complejo, mientras que los quesos P-Pro mantuvieron un perfil más simple, comparable con el observado en el día 1.

Para todos los quesos, aumentó la concentración de casi todos los AGL durante el almacenamiento. La presencia de bacterias probióticas redujo la concentración total de AGL en los quesos, independientemente del tratamiento de la leche. En el queso HPH-Pro se observó un marcado incremento del ácido C18:2 (linoleico). En todos los quesos, los AGL más abundantes al final del período de maduración fueron C14:0, C16:0, C18:0 y C18:1.

Tabla 5. Concentración de AGL (ppm) \pm SD luego de 1 y 12 días de almacenamiento a 4°C (-: menor al límite de detección).

AGL	Tipo de queso							
	Período de almacenamiento							
	P		P-Pro		HPH		HPH-Pro	
	1 d	12 d	1 d	12 d	1 d	12 d	1 d	12 d
C8:0	-	-	-	-	4,7 \pm 0,9	6,0 \pm 0,2	2,4 \pm 0,9	2,8 \pm 0,9
C10:0	-	4,5 \pm 0,9	-	-	26,3 \pm 1,0	27,1 \pm 1,7	11,1 \pm 1,2	13,5 \pm 2,0
C12:0	-	18,0 \pm 1,9	-	1,3 \pm 0,3	36,3 \pm 3,1	46,0 \pm 10,0	18,6 \pm 1,7	22,9 \pm 1,9
C14:0	3,4 \pm 0,8	63,9 \pm 2,1	2,4 \pm 0,5	56,7 \pm 2,0	81,0 \pm 2,2	162,2 \pm 22,0	58,5 \pm 9,3	79,6 \pm 11,2
i-C15:0	-	1,0 \pm 0,4	-	-	1,6 \pm 0,5	4,3 \pm 0,8	1,1 \pm 0,2	1,7 \pm 0,9
a-C15:0	-	2,4 \pm 1,0	-	-	2,0 \pm 0,7	6,1 \pm 0,2	1,6 \pm 0,5	2,6 \pm 0,3
C15:0	-	6,6 \pm 1,4	1,0 \pm 0,1	45,1 \pm 1,9	9,7 \pm 1,0	26,8 \pm 0,7	7,9 \pm 2,4	11,2 \pm 0,9
C16:0	16,4 \pm 1,2	204,8 \pm 10,4	7,0 \pm 0,4	176,8 \pm 11,2	212,0 \pm 14,5	541,6 \pm 33,1	166,0 \pm 30,5	253,3 \pm 30,7
C16:1	-	11,6 \pm 2,0	-	-	8,9 \pm 1,1	30,3 \pm 1,9	7,1 \pm 1,4	13,3 \pm 1,9
iC17:0	-	-	-	-	3,2 \pm 0,7	9,4 \pm 1,8	2,3 \pm 1,1	-
aC17:0	-	1,8 \pm 0,9	-	-	2,7 \pm 0,4	8,1 \pm 0,9	1,8 \pm 0,2	2,9 \pm 0,5
C17:0	-	3,4 \pm 0,8	-	2,3 \pm 0,9	4,8 \pm 1,0	12,9 \pm 0,9	2,8 \pm 0,7	5,0 \pm 1,1
C18:0	13,0 \pm 1,4	143,0 \pm 2,5	5,0 \pm 0,7	25,8 \pm 2,5	118,0 \pm 15,0	213,8 \pm 11,5	65,2 \pm 2,3	108,0 \pm 20,9
C18:1	4,6 \pm 0,7	73,1 \pm 3,5	3,0 \pm 0,8	4,3 \pm 0,9	143,3 \pm 18,0	321,1 \pm 24,2	86,4 \pm 2,8	133,3 \pm 11,2
C18:2	-	12,1 \pm 0,8	-	-	13,7 \pm 1,1	36,0 \pm 2,1	8,0 \pm 1,5	158,0 \pm 15,8
C18:3	-	1,8 \pm 0,5	-	1,0 \pm 0,1	3,5 \pm 0,9	8,7 \pm 0,9	1,9 \pm 0,9	3,2 \pm 0,9
C20:0	-	2,1 \pm 0,8	-	-	1,6 \pm 1,0	1,9 \pm 1,1	-	1,3 \pm 0,5
AGL totales	37,4 \pm 5,0	550,1 \pm 52,8	18,4 \pm 2,0	313,3 \pm 29,6	673,3 \pm 71,2	1462,3 \pm 90,1	439,9 \pm 36,7	812,6 \pm 78,1

I.a.4.4 Patrones proteolíticos y perfiles de aminoácidos

En la Figura 6 se muestran los perfiles SDS-PAGE de los diferentes quesos luego de 1 y 12 días de almacenamiento a 4°C. Tanto el tratamiento inicial de la leche como la presencia de bacterias probióticas afectaron los patrones proteolíticos, independientemente del tiempo de almacenamiento. En los quesos HPH y HPH-Pro se observó 1 banda de peso molecular menor a 14,4 kDa que no se detectó en los quesos P-Pro y P. Luego de 12 días de almacenamiento, en los quesos HPH-Pro desaparecieron 2 bandas de PM<14,4 kDa indicando que la adición de microorganismos probióticos incrementó la proteólisis de los quesos.

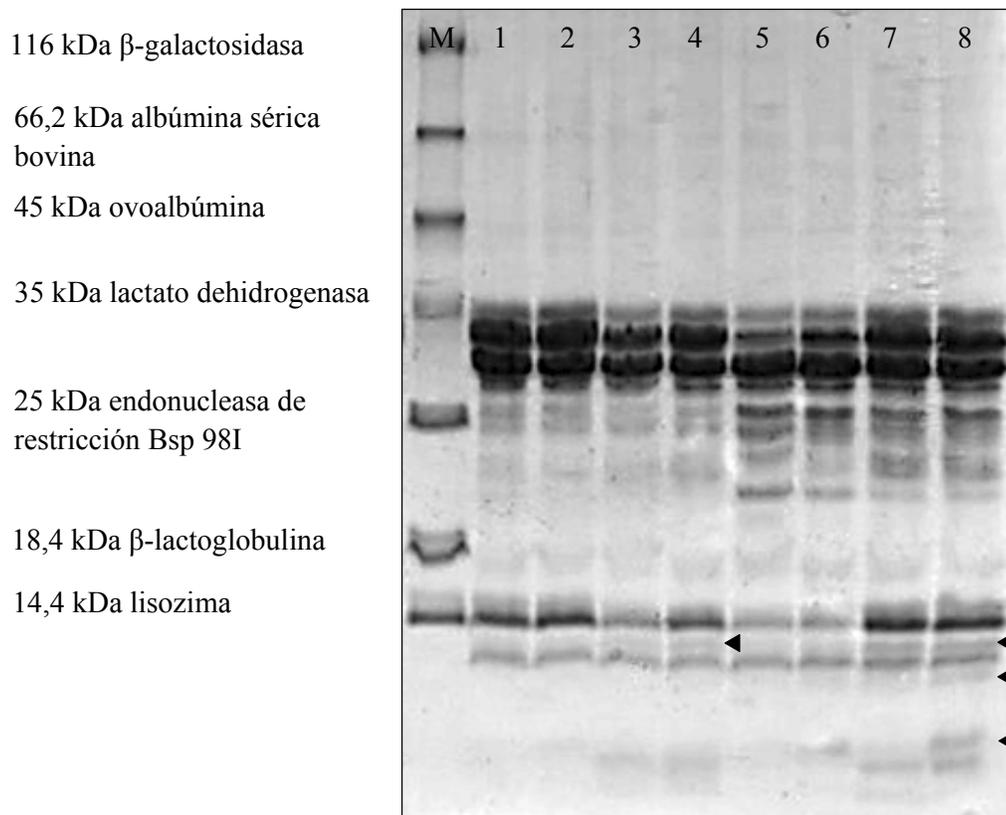


Figura 6. Perfiles de SDS-PAGE de los diferentes quesos Crescenza luego de 1 y 12 días de almacenamiento a 4°C. **M:** Patrón de peso molecular; **1:** Queso P-Pro (1 d); **2:** Queso P (1 d); **3:** Queso HPH-Pro (1 d); **4:** Queso HPH (1 d); **5:** Queso P-Pro (12 d); **6:** Queso P (12 d); **7:** Queso HPH-Pro (12 d); **8:** Queso HPH (12 d).

Por otro lado, la presencia de microorganismos probióticos incrementó la concentración de aminoácidos libres (AAL) en los quesos, independientemente del tratamiento de la leche (Tabla 6). Se observó un incremento en el contenido de todos los aminoácidos con excepción de Ala, Gln, Ser y Tyr.

Tabla 6. Concentración de AAL* (mg/100g) \pm SD luego de 12 días de almacenamiento a 4°C.

Aminoácidos	Tipo de queso			
	HPH	HPH-Pro	P	P-Pro
Ácido aspártico	-	3,00 \pm 0,40 ^a	-	4,89 \pm 0,73 ^b
Ácido γ -aminobutírico	-	-	-	-
Alanina	23,90 \pm 1,22 ^a	7,67 \pm 0,76 ^b	14,10 \pm 1,07 ^c	10,50 \pm 1,70 ^b
Arginina	1,50 \pm 0,40 ^a	6,05 \pm 0,95 ^b	0,81 \pm 0,21 ^a	8,22 \pm 0,79 ^c
Asparagina	0,58 \pm 0,08 ^{ab}	0,80 \pm 0,20 ^a	-	0,56 \pm 0,13 ^b
Fenilalanina	3,52 \pm 0,76 ^a	5,68 \pm 1,10 ^b	1,31 \pm 0,37 ^c	7,21 \pm 0,83 ^b
Glicina	0,52 \pm 0,22 ^a	0,85 \pm 0,22 ^a	-	1,29 \pm 0,28 ^b
Glutamina	1,50 \pm 0,04 ^a	1,52 \pm 0,02 ^a	1,18 \pm 0,06 ^b	1,34 \pm 0,19 ^{ab}
Isoleucina	1,44 \pm 0,35 ^a	3,65 \pm 0,31 ^b	0,65 \pm 0,30 ^a	3,79 \pm 0,60 ^b
Histidina	1,51 \pm 0,43 ^a	3,02 \pm 0,90 ^b	0,68 \pm 0,36 ^a	1,60 \pm 0,20 ^a
Lisina	0,53 \pm 0,23 ^a	3,24 \pm 0,50 ^b	-	1,97 \pm 0,55 ^c
Metionina	-	0,76 \pm 0,35 ^a	0,55 \pm 0,30 ^a	0,78 \pm 0,32 ^a
Ornitina	-	-	-	-
Prolina	2,29 \pm 0,70 ^{ac}	4,55 \pm 0,50 ^b	1,34 \pm 0,56 ^a	4,10 \pm 0,70 ^{bc}
Serina	0,79 \pm 0,20 ^a	0,53 \pm 0,25 ^a	-	-
Tirosina	5,71 \pm 0,61 ^a	5,92 \pm 1,47 ^a	2,46 \pm 0,76 ^b	3,74 \pm 0,75 ^{ab}
Treonina	0,87 \pm 0,15 ^a	1,82 \pm 1,18 ^a	-	2,20 \pm 0,41 ^a
Valina	2,12 \pm 0,46 ^a	3,74 \pm 0,95 ^a	-	3,72 \pm 0,57 ^a
Cisteína y Cistina	-	-	-	-
Triptofano	-	-	-	-

^{a, b, c} Para cada fila, los valores con los mismos superíndices no son estadísticamente diferentes ($p > 0,05$). -: No detectado.* Los valores de AAL corresponden al valor medio de 3 replicados de quesos elaborados el mismo día.

El patrón de AAL más complejo se observó en los quesos HPH-Pro, mientras que los quesos elaborados con leche pasteurizada mostraron menor cantidad de aminoácidos libres y en menores concentraciones. Comparando los patrones de los quesos P y HPH, el tratamiento a altas presiones incrementó de manera significativa ($p < 0,05$) la liberación de los siguientes aminoácidos: Ala, Asn, Phe, Gly, Gln, Lys, Ser, Tyr, Thr y Val, mientras que disminuyó la concentración de Met.

1.a.4.5 Perfiles de GC-MS-SPME

El análisis de compuestos volátiles mediante GC-MS-SPME se realizó en los quesos luego de 1 y 12 días de almacenamiento refrigerado. Al día 1, los perfiles de compuestos volátiles de los quesos elaborados con leche pasteurizada se caracterizaron por presentar los siguientes compuestos: 2-propanona, acetaldehído, acetoina, ácido acético, hexanol y hexanal, mientras que los ácidos butanoico, hexanoico y octanoico se encontraban en bajas concentraciones. Por el contrario, los perfiles de compuestos volátiles de los quesos HPH se caracterizaron por presentar altas concentraciones de los ácidos butanoico, hexanoico, octanoico y decanoico. Luego de 12 días de almacenamiento refrigerado, en los quesos HPH, HPH-Pro y P-Pro hubo una marcada disminución de ácido decanoico y los quesos adicionados de cultivos probióticos presentaron mayor concentración de ácido acético. La concentración de acetaldehído disminuyó en los quesos elaborados con leche pasteurizada (datos no mostrados). La evolución de algunos de estos compuestos se muestra en las Figuras 7 y 8.

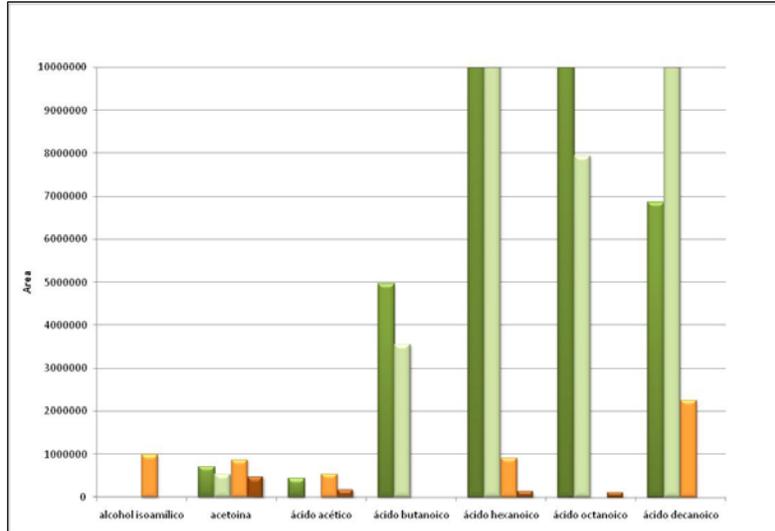


Figura 7. Perfil de compuestos volátiles al día 1 de almacenamiento a 4°C en los quesos HPH-Pro (■), HPH (■), P-Pro (■) y P (■).

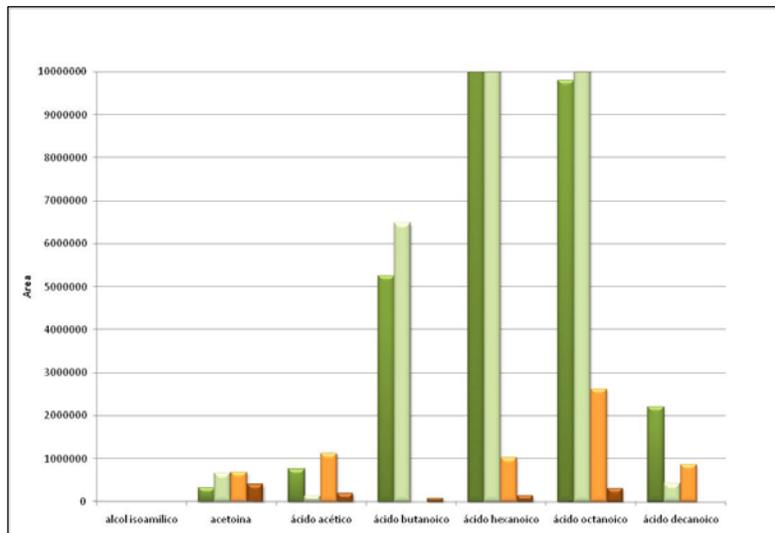


Figura 8. Perfil de compuestos volátiles al día 12 de almacenamiento a 4°C en los quesos HPH-Pro (■), HPH (■), P-Pro (■) y P (■).

I.a.4.6 Evaluación sensorial

Los resultados de la evaluación sensorial luego de 8 días de almacenamiento refrigerado se muestran en la Tabla 7. Los panelistas no detectaron diferencias significativas para las características cremosidad y salado en las 4 variedades de quesos.

Tabla 7. Puntaje \pm SD para cada una de las características sensoriales analizadas en quesos Crescenza luego de 8 días de almacenamiento a 4°C.

Parámetro	Tipo de queso			
	HPH-Pro	HPH	P-Pro	P
Acidez	6,3 \pm 2,4 ^a	5,7 \pm 2,6 ^{ab}	5,7 \pm 2,8 ^{ab}	2,9 \pm 2,3 ^b
Sabor picante	5,0 \pm 3,2 ^a	4,4 \pm 3,1 ^a	3,0 \pm 2,6 ^{ab}	1,0 \pm 0,9 ^b
Sabor amargo	5,4 \pm 2,9 ^{ac}	5,8 \pm 2,8 ^c	2,6 \pm 2,5 ^{ab}	1,2 \pm 0,9 ^b
Sabor dulce	1,9 \pm 1,1 ^a	2,3 \pm 1,45 ^{ab}	3,8 \pm 2,7 ^{ab}	4,9 \pm 2,8 ^b
Sabor a leche	3,0 \pm 2,2 ^a	3,3 \pm 2,7 ^a	3,7 \pm 2,0 ^{ab}	6,1 \pm 1,1 ^b
Salado	4,9 \pm 2,0 ^a	4,4 \pm 2,0 ^a	4,4 \pm 2,3 ^a	4,3 \pm 2,1 ^a
Cremosidad	5,2 \pm 2,7 ^a	5,4 \pm 2,8 ^a	6,8 \pm 2,8 ^a	5,8 \pm 1,4 ^a
Aceptación general	3,9 \pm 1,9 ^a	5,0 \pm 1,8 ^a	5,0 \pm 1,4 ^a	7,1 \pm 0,9 ^b

^{a, b, c} Para cada fila, los valores con los mismos superíndices no son estadísticamente diferentes ($p > 0,05$).

Se observaron diferencias significativas en cuanto a acidez, sabor picante, sabor amargo, sabor dulce, sabor a leche y aceptación general entre los quesos Crescenza P y HPH-Pro. Además, para estas mismas cualidades, el queso Crescenza P fue el mejor caracterizado y aceptado. No se observaron diferencias significativas respecto a acidez, sabor picante, sabor dulce, sabor a leche, salado, cremosidad y aceptación general entre los quesos HPH, HPH-Pro y P-Pro.

I.a.5 Discusión

El tratamiento inicial de la leche afectó de manera significativa todos los parámetros considerados, en particular el rendimiento quesero, el perfil de compuestos volátiles, la proteólisis y lipólisis de los quesos. En cuanto al efecto del tratamiento HPH de la leche sobre la inactivación de la microflora láctea se observó que la misma logró la reducción del contenido de células viables de levaduras, enterococos y enterobacterias de manera similar a la pasteurización. Sin embargo, fue menos efectiva en la inactivación de lactobacilos y microestafilococos. Estas observaciones concuerdan con observaciones previas (Lanciotti y col., 2006; 2007a y b). Por otro lado, el tratamiento HPH provocó también cambios significativos y selectivos en la microbiota de los quesos. De hecho, al final del período de almacenamiento, enterobacterias, enterococos y microestafilococos presentaron niveles más elevados en los quesos elaborados con leche tratada por HPH que en los quesos elaborados a partir de leche pasteurizada, los cuales presentaron niveles más elevados de levaduras. Guerzoni y col. (1999b) y Lanciotti y col. (2004a) observaron cambios en la población microbiana de quesos obtenidos a partir de leche de cabra y de vaca tratada por HPH, respectivamente. Los quesos de cabra elaborados con leche tratada por HPH contenían mayores recuentos de enterococos, levaduras y BAL y menores recuentos de *Staphylococcus* coagulasa positivos que los quesos elaborados con leche pasteurizada (Guerzoni y col., 1999b). Lanciotti y col. (2004a) informaron que el tratamiento de la leche modificó la carga microbiana inicial y la evolución durante el almacenamiento de los cultivos starters, *Pseudomonas* spp. y levaduras. Si bien no observaron diferencias significativas en el número de lactococos, el tratamiento HPH de la leche pareció favorecer el crecimiento de lactobacilos. Por otro lado, el crecimiento de *Pseudomonas* spp. y levaduras fue menor en los quesos Crescenza elaborados a partir de leche HPH. Estos autores no observaron diferencias significativas en los recuentos de enterococos, coliformes totales y coliformes fecales entre los distintos tratamientos (HPH o P).

En cuanto a los microorganismos probióticos, los resultados indican que el tratamiento de HPH de la leche incrementó significativamente la viabilidad de *Lb. acidophilus* H5 durante el almacenamiento refrigerado de los quesos. Para esta cepa probiótica, el queso tipo Crescenza HPH-Pro resultó un vehículo más apropiado que el queso P-Pro ya que permitió mantener una viabilidad de 7 órdenes log durante los 12

días de almacenamiento refrigerado. Este efecto positivo podría deberse al incremento temprano en la disponibilidad de péptidos de bajo peso molecular y de ácidos grasos libres (AGL) como el ácido C18:1, esencial para el crecimiento o mantenimiento de varias especies de BAL (Guerzoni y col., 2001; Partanen y col., 2001; Endo y col., 2006). Por otro lado, el tratamiento HPH incrementó notablemente la lipólisis incluso hacia el primer día de almacenamiento a 4°C. La liberación temprana de AGL en leche y quesos se atribuye principalmente a la reducción del tamaño de los glóbulos de grasa y a la activación de las lipoproteinlipasas (LPL) endógenas por acción del tratamiento HPH (Lanciotti y col., 2006). En este caso, la liberación temprana de AGL se vió favorecida por el tiempo transcurrido entre el tratamiento HPH de la leche y la elaboración de los quesos (12 hs).

Los patrones electroforéticos y la pronta liberación de ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR) mostraron que los quesos Crescenza HPH se caracterizaron por presentar proteólisis temprana, sugiriendo que el tratamiento HPH también incrementa la acción de proteasas nativas de la leche. El catabolismo de los aminoácidos podría ser una explicación posible a la presencia de AGCR en quesos ya que la grasa de la leche carece de estos ácidos grasos (Ganesan y Weimer, 2004). Los AGL se pueden originar a partir de lipólisis, proteólisis y fermentación de la lactosa. Esterasas y lipasas endógenas o microbianas pueden causar la liberación de AG de cadena lineal, mientras que las enzimas proteolíticas son responsables de la formación de los ácidos grasos iC15:0, aC15:0 y aC17:0 a partir del catabolismo de Ile y Leu (Berdagué y col., 1987). La viabilidad de *Lb. paracasei* A13 durante el almacenamiento refrigerado de los quesos no se vió afectada por el tratamiento inicial de la leche. En ambos tipos de quesos (HPH-Pro y P-Pro) la cepa mantuvo niveles mayores a 7 órdenes log UFC/g. La elevada actividad peptidasa de esta especie está bien documentada (Fox y col., 1998). Dentro de las BAL mesófilas no starters, aunque con variaciones dependientes de cada cepa, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* demostraron contribuir a la proteólisis secundaria a través de varias peptidasas (Fox y col., 1998) incluso bajo condiciones menos favorables como las encontradas en los quesos (Laan y col., 1998; Gobbetti y col., 1999a y b). Por otro lado, el tratamiento HPH también generó mayor proteólisis y lipólisis durante el período de almacenamiento de los quesos a 4°C. Estos datos son similares a los reportados por otros investigadores (Guerzoni y col., 1999b; Kheadr y

col., 2002; Lanciotti y col., 2004a; 2006). La tecnología HPH produce efectos sobre el tamaño de los glóbulos de grasa, la desnaturalización de proteínas y polisacáridos y la agregación y formación de micropartículas (Sandra y Dalgleish, 2005). Además, la HPH puede inducir la formación de complejos entre proteínas, glóbulos de grasa y polisacáridos. Los efectos causados sobre estos componentes, sumado a modificaciones en sus propiedades funcionales y a cambios en la microestructura del alimento, puede afectar la actividad y especificidad de las enzimas como así también la susceptibilidad de las macromoléculas al ataque enzimático, modificando el perfil proteolítico y lipolítico de los productos (Guerzoni y col., 1999b; Wuytack y col., 2002). Sin embargo, también la diferente composición de la microbiota y los mayores niveles de enterococos y microestafilococos podría haber favorecido la acumulación de AGL y la liberación de aminoácidos.

La adición de microorganismos probióticos modificó de manera significativa los patrones proteolíticos y lipolíticos de los quesos, en concordancia con los reportes de Ong y col. (2007) quienes encontraron mayores niveles de proteólisis en quesos Cheddar probióticos, elaborados con leche tratada de forma térmica, y particularmente en aquellos que contenían *Lb. casei* 279 y *Lb. paracasei* LAFTIs L26. Por el contrario, aunque algunos datos de la bibliografía reportan que cepas de lactobacilos probióticos pueden contribuir a la lipólisis de la leche (Alonso y col., 2003; Yadav y col., 2007), aquí se observó una reducción de casi todos los AGL detectados en presencia de los cultivos probióticos independientemente del tratamiento inicial de la leche. Esta reducción se puede deber a una disminución en la actividad de lipasas y esterases debido al alto nivel de inóculo inicial de bacterias probióticas y al consumo de algunos AGL por BAL. Fox y col. (1998) informaron efectos negativos de elevados recuentos de BAL no starters (NSLAB) en sus actividades lipasa y esterasa en quesos. Endo y col. (2006) demostraron una fuerte actividad promotora del crecimiento para *Lactobacillus* spp. de AGL específicos principalmente ácidos octadecanoico y ácidos grasos trans debido a su incorporación en la membrana lipídica. Además de la disminución de casi todos los AGL, la incorporación de bacterias probióticas provocó un marcado incremento del ácido C18:2 en los quesos obtenidos a partir de leche HPH. La liberación de este ácido graso a partir de *Lb. acidophilus* y *Lb. casei* también ha sido descrita por Yadav y col. (2007). A pesar de que estos autores demostraron la capacidad

de las cepas probióticas de producir ácido linoleico conjugado (CLA, conjugated linoleic acid) a partir del ácido linoleico liberado, está bien documentada la capacidad de BAL de sintetizar CLA en medios suplementados con ácido linoleico (Alonso y col., 2003; Ogawa y col., 2005). El ácido linoleico conjugado posee numerosas propiedades benéficas (Ogawa y col., 2005).

La diferencia en el contenido de aminoácidos y en los perfiles de AGL en los quesos HPH-Pro y P-Pro se puede atribuir a los cambios conformacionales generados por el tratamiento HPH en las proteínas y en los glóbulos de grasa, lo que genera una exposición diferente de las proteínas al ataque enzimático (Guerzoni y col., 1999b).

Si bien se observaron diferencias en los perfiles proteolíticos, lipolíticos y de moléculas volátiles en relación al tratamiento HPH, el análisis sensorial realizado luego de 8 días de almacenamiento refrigerado mostró sólo diferencias significativas entre el queso elaborado con leche pasteurizada (similar al tradicional) y los demás quesos. Los quesos P-Pro, HPH y HPH-Pro fueron similares en cuanto a acidez, sabor picante, dulce, a leche, salado, cremosidad y aceptación general. El queso tradicional (P) recibió mayores puntajes que los demás. En este sentido, se debe admitir que el análisis sensorial fue realizado por panelistas italianos quienes están acostumbrados a consumir el queso tradicional que es cremoso, suave, que sabe a levadura y ligeramente ácido. Las características óptimas para el consumo de este tipo de quesos se alcanzan luego de 7 días de almacenamiento refrigerado a 4°C. El almacenamiento prolongado o inapropiado puede provocar que la pasta del queso se vuelva amarilla y desarrolle un sabor agrio debido al desarrollo de microorganismos alterantes. La frescura del queso Crescenza se asocia generalmente a baja acidez, proteólisis limitada y ausencia de sabor amargo y agrio (Benedetti y col., 2005). En este caso, los altos niveles iniciales de proteólisis en los quesos P-Pro, HPH y HPH-Pro debido principalmente al tratamiento inicial de la leche y a la presencia de microorganismos probióticos aceleraron la maduración del producto y estos quesos presentaron características similares a las que presenta el queso Crescenza tradicional en los días cercanos a la fecha de caducidad.

I.a.6 Conclusiones

El uso de leche tratada por HPH, en lugar de leche pasteurizada, incrementó el mantenimiento de la viabilidad durante el almacenamiento refrigerado de la cepa *Lb. acidophilus* H5 y permitió obtener un producto más firme y con menos desuerado. Además, esta tecnología contribuyó, junto con el agregado de bacterias probióticas, a modificar las características sensoriales del producto.

En los últimos años, hubo un incremento en la demanda por parte de los consumidores de nuevas variedades de productos lácteos similares a los tradicionales en cuanto a seguridad pero diferentes en características nutricionales, sensoriales y reológicas (Duncan, 1998). El incremento en la liberación del ácido graso C18:2 (linoleico) podría mejorar las propiedades funcionales de los quesos HPH-Pro. Se necesitarán estudios adicionales para asegurar que el tratamiento HPH pueda reemplazar completamente el tratamiento térmico de saneamiento de la leche para elaborar quesos.

CAPÍTULO Ib

Aplicación de la HPH a la elaboración de leches fermentadas probióticas

I.b.1 Introducción

Las bacterias probióticas fueron definidas como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto benéfico en la salud del consumidor” (FAO/WHO, 2002). El deseo de los consumidores de utilizar métodos naturales para el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades más allá de la utilización de agentes terapéuticos como los antibióticos, relacionado al hecho de esperar de que los alimentos sean una fuente de salud, ha incrementado notablemente el consumo de alimentos probióticos y de ese modo también ha estimulado la innovación y el desarrollo de nuevos productos (Ong y col., 2007). Más allá de los efectos benéficos para la salud, las propiedades generales de las leches fermentadas, incluyendo perfiles sensoriales y valor nutricional, son importantes para los consumidores (Ott y col., 2000). Las leches fermentadas elaboradas con microorganismos probióticos como únicos microorganismos fermentativos o “starters”, principalmente del género *Lactobacillus* se caracterizan por lo general por no tener cuerpo, textura y características sensoriales deseables (Penna y col., 2006), por lo que normalmente se los acompaña con un fermento láctico acidificante y texturizante compuesto por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Las propiedades físicas como firmeza y la capacidad de retener agua son los principales criterios para evaluar la calidad de las leches fermentadas (Hassan y col., 1996). Con el objetivo de mejorar el cuerpo y la textura de las leches fermentadas se han propuesto varias alternativas tales como el uso de cepas productoras de exopolisacáridos, en lugar del uso de aditivos químicos (Lucey, 2004) los cuales pueden afectar de manera negativa el sabor, flavour, y aroma de los productos (De Ancos y col., 2000) o el agregado de sólidos de la leche y/o concentrados de proteínas de suero (Mistry y Hassan, 1992). Por otro lado, también es posible mejorar las propiedades sensoriales mediante variaciones en los procesos tecnológicos y fisicoquímicos como la aplicación de homogeneización por alta presión (Gardini y col., 1999; Patrignani y col., 2006; 2007) cuyas características y potencial de aplicación se expusieron en las secciones previas. El tratamiento HPH es interesante para el desarrollo de nuevos productos con características estructurales y propiedades funcionales diferentes a los productos tradicionales (Guerzoni y col., 1999b; Lanciotti y col., 2004b; Madadlou y col., 2006) para así diversificar el mercado de este tipo de productos. Sin embargo, es

escaso el conocimiento que se tiene sobre el comportamiento de bacterias probióticas en leches fermentadas elaboradas a partir de leche tratada por HPH y sobre las características sensoriales de estos productos.

I.b.2 Objetivo

Evaluar el potencial de la leche tratada por HPH para la elaboración de leches fermentadas incorporando bacterias probióticas.

I.b.3 Materiales y Métodos

I.b.3.1 Cultivos iniciadores y probióticos

Para la elaboración de las leches fermentadas se utilizaron como fermentos acidificantes o “starters” las cepas *St. thermophilus* Sty1 y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lby1 (colección del Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Bologna, Italia). Como fermentos probióticos adjuntos se utilizaron las cepas comerciales *Lactobacillus acidophilus* 08 y *Lactobacillus paracasei* A13, cuya identidad se mantiene reservada por cuestiones de confidencialidad y que se conservan en la colección del Instituto de Lactología Industrial. Los cultivos acidificantes se cultivaron en caldo Elliker (*St. thermophilus* Sty1) o MRS (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lby1) durante 16 hs a 37°C. Estos cultivos se transfirieron y mantuvieron separados por repiques sucesivos, en leche descremada reconstituida (100 g/l) (Oxoid, Basingtoke, Reino Unido). Los microorganismos probióticos se cultivaron en caldo MRS (16 hs a 37°C) y se centrifugaron (8.000 g, 20 min, 4°C). Los pellets se lavaron 2 veces con solución salina (NaCl 9 g/l) y se resuspendieron en leche descremada estéril (100 g/l) antes de ser adicionados a la leche para la elaboración de las leches fermentadas.

I.b.3.2 Elaboración de las leches fermentadas

La elaboración de las leches fermentadas se llevó a cabo en una planta local a escala piloto (Mambelli, Bertinoro, Italia). Para las mismas se utilizaron 6 l leche descremada reconstituida (100 g/l) (Oxoid) tratada por calor (90°C durante 20 min). La mitad del volumen de la leche tratada por calor además recibió el siguiente tratamiento HPH. La leche se homogeneizó a 60 MPa (un ciclo) utilizando un homogeneizador de alta presión PANDA (Niro Soavi, Parma, Italia) equipado con una válvula PNSA con un flujo de 10 l/h. La temperatura de entrada de la leche fue de aproximadamente 5°C y la temperatura de salida no superó los $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La leche se recogió en recipientes estériles.

Se elaboraron 4 tipos de leches fermentadas: 1) a partir de leche tratada por calor + cultivos starters (TC: tratada por calor); 2) a partir de leche tratada por calor + cultivos starters + probióticos (TC-Pro); 3) a partir de leche tratada calor y HPH +

cultivos starters (HPH) y 4) a partir de leche tratada calor y HPH + cultivos starters + probióticos (HPH-Pro).

Se inocularon las muestras de leche (1,5 l) con cultivos overnight (1% v/v) (en leche descremada reconstituida) de los cultivos starters (*St. thermophilus* Sty1 y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lby1 en relación 100:1). Para la elaboración de las leches fermentadas probióticas TC-Pro y HPH-pro, la leche se inoculó (1% v/v), además, con cultivos overnight lavados de *Lb. acidophilus* 08 y *Lb. paracasei* A13. Luego de ser inoculada, la leche se fraccionó en recipientes estériles de 100 ml y se incubó a 42°C en baño de agua. Cuando el pH alcanzó un valor de 4,6, las leches fueron enfriadas inmediatamente a 4°C y se almacenaron a esta temperatura. Se realizaron análisis microbiológicos y físico-químicos por duplicado de cada tipo de leche fermentada elaborada en tres días consecutivos en la misma planta láctea.

I.b.3.3 Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos se realizaron a los días 1, 7, 14, 21, 28 y 35 de almacenamiento refrigerado a 4°C. Para el recuento de los microorganismos starters, probióticos y la microflora láctica total se pesaron 20 g de leche fermentada, se colocaron en 180 ml de solución de citrato de sodio (20 g/l) y se homogeneizaron en stomacher (Lab-blender 80, Pbi International, Milán, Italia) durante 3 minutos. Se realizaron diluciones decimales de los homogenados en agua de peptona (1 g/l) y se sembraron 100 µl en diferentes medios de cultivo. Los recuentos de *St. thermophilus* Sty1 se realizaron en agar Elliker (Biokar) (37°C, 48 hs) y los de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lby1 en agar MRS (Biokar) acidificado con ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemania) a pH 5,4 en anaerobiosis (Kit Oxoid BR38) (42°C, 48 hs). Para el recuento de *Lb. paracasei* A13 y *Lb. acidophilus* 08 se utilizó agar MRS-LP y agar MRS-bilis (Vinderola y Reinheimer, 1999) (37°C, 48 hs), respectivamente. El recuento de la microflora láctica total se realizó en Agar para Recuento en Placa (Oxoid) adicionado de leche descremada (10% v/v) (Oxoid) a 37°C durante 48 hs.

1.b.3.4 Análisis de textura

Luego de 24 hs desde la coagulación, se tomaron muestras de las leches fermentadas y se analizaron las características de textura. Se determinó la firmeza, consistencia, cohesión e índice de viscosidad utilizando una celda de extrusión reversa (A/AB) en un analizador de texturas TA DHI (Stable Micro System, Reino Unido) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se introdujo una varilla sólida (35 mm de diámetro) en un recipiente cilíndrico (48 mm de diámetro) con 100 ml de muestra y se utilizó una carga de 5 kg. Para cada muestra se realizaron 3 medidas independientes.

1.b.3.5 Perfiles de aroma

La determinación de compuestos volátiles se realizó a los días 1 y 35 de almacenamiento a 4°C. Se utilizó la técnica de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas acoplada a microextracción en fase sólida (GC-MS-SPME). Se colocaron 5 g de muestra en viales estériles de 10 ml de capacidad, se sellaron con un septum de PTFE/silicona y se calentaron durante 10 min a 45°C. Luego se introdujo una fibra de sílice recubierta de Carboxen Polydimethyl Siloxane 75 µm (CAR/PDMS) (Supelco, Steiheim, Alemania) en el espacio cabeza durante 50 min. Las moléculas adsorbidas fueron desorbidas en el cromatógrafo gaseoso durante 5 min. La detección e identificación de los picos se realizó de igual manera que para las muestras de queso.

1.b.3.6 Extracción de ADN de cultivos puros, extracción de ADN total de las leches fermentadas, amplificación del ADN y electroforesis en gel de gradiente desnaturizante

La extracción de ADN, amplificación y electroforesis se realizaron de igual manera a la descrita para quesos Crescenza. Para la DGGE se utilizaron como marcadores iguales cantidades de los amplicones obtenidos a partir de las cepas *St. thermophilus* Sty1, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lby1, *Lb. acidophilus* 08 y *Lb. paracasei* A13.

1.b.3.7 Proteólisis

Los análisis de proteólisis se realizaron como se describió para quesos Crescenza.

1.b.3.8 Evaluación sensorial

El análisis sensorial de las leches fermentadas se realizó luego de 14 días de almacenamiento refrigerado. El mismo fue realizado por 25 evaluadores entrenados. Las muestras se sirvieron a 15°C bajo condiciones ambientales y de luz controladas de acuerdo a los estándares 8589 (ISO, 1988). Se solicitó que se evalúe color, flavour, apariencia, consistencia, sabor, acidez, sabor residual y aceptación general dándole a cada atributo un valor entre 0 (bajo o pobre) y 10 (alto o muy bueno).

1.b.3.9 Análisis estadístico

Los datos microbiológicos, de textura y del panel asesor se analizaron mediante ANOVA de una vía utilizando el paquete estadístico Statistica para Windows 6.1 (Statsoft Inc., Tulsa, Reino Unido). La capacidad de cada evaluador para discriminar entre las muestras se investigó utilizando comparaciones post-hoc del ANOVA.

I.b.4 Resultados

I.b.4.1 Viabilidad de bacterias ácido lácticas durante el almacenamiento y pH

En la Tabla 8 se muestran los valores de viabilidad de la microflora láctica total, cultivos starters y bacterias probióticas en las leches fermentadas almacenadas durante 35 días a 4°C.

Tabla 8. Evolución de la microflora (media \pm SD log UFC/g) en las distintas leches fermentadas durante el almacenamiento a 4°C.

Leche fermentada	Almacenamiento (días)	MLT	<i>St. thermophilus</i> Sty1	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Lby1	<i>Lb. acidophilus</i> 08	<i>Lb. paracasei</i> A13
HPH	1	9,1 \pm 0,1	9,1 \pm 0,4	7,0 \pm 0,4	-	-
	7	9,3 \pm 0,4	9,1 \pm 0,1	7,3 \pm 0,3	-	-
	14	8,9 \pm 0,2	9,0 \pm 0,2	7,0 \pm 0,1	-	-
	21	8,4 \pm 0,3	8,3 \pm 0,3	6,8 \pm 0,1	-	-
	28	8,2 \pm 0,2	8,1 \pm 0,3	5,8 \pm 0,2	-	-
	35	8,1 \pm 0,3 ^a	7,9 \pm 0,2 ^a	6,0 \pm 0,4 ^a	-	-
HPH-Pro	1	9,1 \pm 0,2	8,9 \pm 0,2	7,5 \pm 0,3	7,6 \pm 0,3	8,7 \pm 0,2
	7	9,2 \pm 0,4	8,9 \pm 0,3	8,2 \pm 0,2	7,4 \pm 0,2	8,0 \pm 0,4
	14	8,7 \pm 0,2	8,8 \pm 0,4	7,1 \pm 0,1	7,0 \pm 0,3	8,0 \pm 0,4
	21	8,7 \pm 0,4	8,5 \pm 0,2	7,8 \pm 0,3	4,9 \pm 0,2	8,1 \pm 0,3
	28	8,6 \pm 0,1	8,3 \pm 0,1	6,2 \pm 0,3	4,8 \pm 0,3	7,7 \pm 0,2
	35	8,5 \pm 0,1 ^a	8,2 \pm 0,2 ^a	6,5 \pm 0,2 ^a	5,1 \pm 0,4 ^a	7,0 \pm 0,2 ^a
TC	1	9,2 \pm 0,2	8,7 \pm 0,5	7,6 \pm 0,3	-	-
	7	9,1 \pm 0,4	8,7 \pm 0,3	7,2 \pm 0,3	-	-
	14	9,0 \pm 0,2	8,7 \pm 0,4	7,1 \pm 0,5	-	-
	21	8,6 \pm 0,3	7,2 \pm 0,4	7,0 \pm 0,2	-	-
	28	7,0 \pm 0,3	6,9 \pm 0,2	6,0 \pm 0,1	-	-
	35	7,0 \pm 0,2 ^b	6,8 \pm 0,4 ^b	5,0 \pm 0,1 ^b	-	-
TC-Pro	1	9,2 \pm 0,3	9,1 \pm 0,2	7,5 \pm 0,3	7,3 \pm 0,4	8,6 \pm 0,2
	7	8,7 \pm 0,2	8,8 \pm 0,3	7,7 \pm 0,3	6,9 \pm 0,3	7,8 \pm 0,2
	14	8,8 \pm 0,2	8,7 \pm 0,4	7,5 \pm 0,4	6,9 \pm 0,2	8,0 \pm 0,3
	21	8,8 \pm 0,1	8,2 \pm 0,2	7,6 \pm 0,2	5,4 \pm 0,3	8,2 \pm 0,6
	28	7,6 \pm 0,1	7,4 \pm 0,1	7,5 \pm 0,2	5,0 \pm 0,4	7,2 \pm 0,1
	35	7,2 \pm 0,2 ^b	7,1 \pm 0,2 ^b	6,4 \pm 0,2 ^a	5,0 \pm 0,1 ^a	7,0 \pm 0,3 ^a

^{a, b} Para cada columna, los valores con los mismos superíndices hacia el día 35 no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$). -: No adicionado.

Los recuentos de *St. thermophilus* Sty1 y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lby1 al final de la fermentación alcanzaron niveles de entre 8,7 y 9,1 órdenes log UFC/g y entre 7,0 y 7,5 órdenes log UFC/g, respectivamente, en todas las muestras. Luego de 35 días de almacenamiento a 4°C *St. thermophilus* mantuvo mayor viabilidad en las leches fermentadas HPH que en aquellas elaboradas con leche tratada térmicamente. La mayor pérdida de viabilidad para *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se observó en las leches fermentadas TC donde el recuento disminuyó a 5 órdenes log UFC/g, valor significativamente menor que los encontrados para las demás leches fermentadas (HPH, HPH-Pro y TC-Pro). *Lb. paracasei* A13 mantuvo buena viabilidad durante el período de almacenamiento en ambas leches fermentadas (HPH-Pro y TC-Pro) con valores de recuentos finales de aprox. 7,0 órdenes log UFC/g. Sin embargo, la cepa *Lb. acidophilus* 08 presentó menor capacidad de sobrevivir con valores finales de recuentos de células viables de 5,0 órdenes log UFC/g, independientemente del tratamiento inicial de la leche.

La identidad de ambas cepas probióticas durante el almacenamiento refrigerado se confirmó mediante técnicas moleculares (DGGE) (Fig. 9).

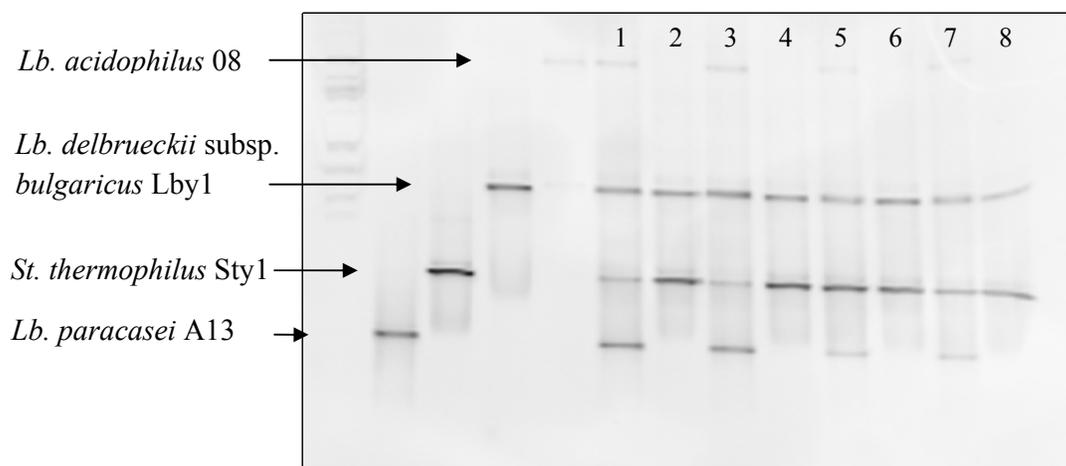


Figura 9. Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). Perfiles de los amplicones de las diferentes leches fermentadas a los días 1 y 35 de almacenamiento refrigerado. 1: TC-Pro (1d); 2: TC (1d); 3: HPH-Pro (1d); 4: HPH (1d); 5: TC-Pro (35d); 6: TC (35d); 7: HPH-Pro (35d); 8: HPH (35d).

Al final del período de almacenamiento las leches fermentadas adicionadas de cultivos probióticos presentaron valores de pH significativamente más bajos ($4,27 \pm 0,02$, HPH-Pro y $4,28 \pm 0,03$, TC-Pro) que las leches fermentadas sin estos cultivos ($4,45 \pm 0,03$, TC y $4,55 \pm 0,02$, HPH).

I.b.4.2 Proteólisis

Los perfiles SDS-PAGE de las diferentes leches fermentadas resultaron similares (Fig. 10).

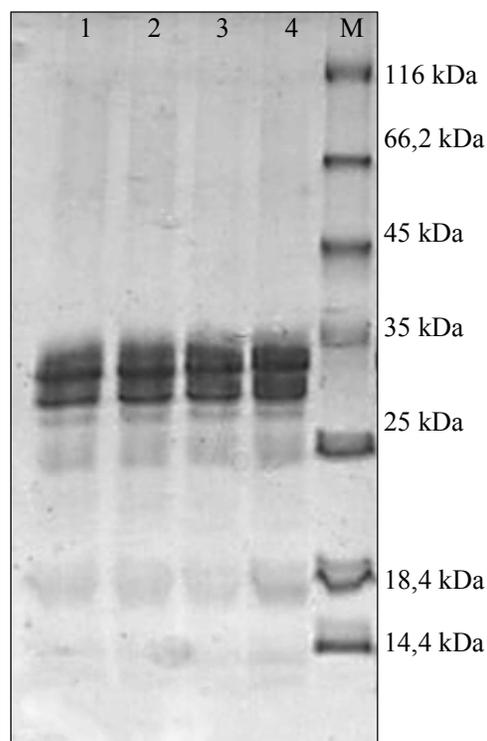


Figura 10. Perfiles SDS-PAGE de las diferentes leches fermentadas luego de 12 hs de la coagulación. **M:** patrón de peso molecular; **1:** TC-Pro; **2:** TC; **3:** HPH-Pro; **4:** HPH.

I.b.4.3 Análisis de textura

Los resultados de firmeza, cohesión, consistencia e índice de viscosidad se muestran en la Tabla 9. El coágulo de las leches fermentadas HPH resultó significativamente ($p < 0,05$) más compacto (mayor firmeza) que el coágulo de las leches fermentadas TC, y se caracterizó, además, por presentar los mayores valores de

consistencia, cohesión e índice de viscosidad. Por otro lado, en las leches fermentadas HPH, la consistencia fue significativamente mayor en presencia de bacterias probióticas.

Tabla 9. Parámetros de textura (media \pm SD) en las distintas leches fermentadas luego de 24 hs de coagulación.

Leche fermentada	Firmeza (g)	Consistencia (g.s)	Cohesión (g)	Índice de viscosidad (g.s)
HPH	395,0 \pm 18,0 ^a	6560,0 \pm 70,0 ^a	421,7 \pm 32,5 ^a	613,3 \pm 35,1 ^a
HPH-Pro	433,0 \pm 25,2 ^a	7020,0 \pm 197,0 ^b	426,7 \pm 52,0 ^a	596,7 \pm 30,5 ^a
TC	287,0 \pm 17,5 ^b	4943,0 \pm 150,4 ^c	325,0 \pm 27,8 ^b	490,0 \pm 18,0 ^b
TC-Pro	296,0 \pm 15,3 ^b	5043,0 \pm 55,1 ^c	291,0 \pm 20,8 ^b	419,3 \pm 32,0 ^b

^{a, b, c} Para cada columna, los valores con los mismos superíndices no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$).

I.b.4.4 Análisis sensorial

Luego de 14 días de almacenamiento refrigerado, no se detectaron diferencias significativas entre las diferentes leches fermentadas en cuanto a color, apariencia, sabor, acidez, sabor residual y aceptación general. Sí hubo diferencias en flavour y consistencia (Tabla 10).

Las leches fermentadas TC recibieron los mayores puntajes en cuanto a flavour pero los menores puntajes en cuanto a consistencia, datos que coinciden con el análisis de textura.

Tabla 10. Puntaje de las distintas características sensoriales (media \pm SD) de las leches fermentadas luego de 14 días de almacenamiento a 4°C.

Característica sensorial	Leche fermentada			
	HPH	HPH-Pro	TC	TC-Pro
Color	7,8 \pm 1,6 ^a	7,5 \pm 1,3 ^a	8,0 \pm 1,5 ^a	7,5 \pm 1,4 ^a
Flavour	6,1 \pm 1,4 ^a	5,9 \pm 1,2 ^a	7,7 \pm 1,0 ^b	6,1 \pm 1,7 ^a
Apariencia	7,5 \pm 1,6 ^a	6,6 \pm 1,5 ^a	7,4 \pm 1,0 ^a	7,1 \pm 1,8 ^a
Consistencia	7,2 \pm 1,4 ^a	7,9 \pm 1,4 ^a	4,5 \pm 1,6 ^b	6,5 \pm 1,8 ^a
Sabor	5,9 \pm 2,0 ^a	5,8 \pm 1,7 ^a	6,8 \pm 1,6 ^a	6,6 \pm 1,6 ^a
Acidez	3,1 \pm 1,4 ^a	4,8 \pm 1,9 ^a	3,7 \pm 1,4 ^a	4,8 \pm 2,3 ^a
Sabor residual	3,0 \pm 2,0 ^a	3,5 \pm 2,9 ^a	2,7 \pm 1,8 ^a	3,4 \pm 2,5 ^a
Aceptación general	6,8 \pm 1,7 ^a	5,8 \pm 2,0 ^a	6,6 \pm 1,6 ^a	6,7 \pm 2,0 ^a

^{a, b} Para cada fila, los valores con los mismos superíndices no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$).

1.b.4.5 Perfiles de compuestos volátiles

En la Tabla 11 se muestran los compuestos más importantes que caracterizaron el aroma de las leches fermentadas. Los valores más elevados de acetona, 2-butanona y diacetilo, luego de 24 hs de la coagulación, fueron detectados en las leches fermentadas HPH, mientras que la mayor cantidad de acetaldehído se detectó en las leches fermentadas TC-Pro. El contenido de ácido acético se incrementó en ambas leches fermentadas probióticas. Luego de 14 días de almacenamiento a 4°C, las leches fermentadas sin adición de microorganismos probióticos presentaron las mayores concentraciones de 2-butanona y diacetilo, mientras que aquellas leches fermentadas adicionadas de probióticos se caracterizaron por la presencia de acetaldehído, acetona (2-propanona), ácido acético, 2-pentanona, hexanal, 2-metil-3-pentanona, butanol, ácido butanoico, hexanoico y octanoico. Las leches fermentadas HPH se caracterizaron por la presencia de acetoina, 3-decen-2-ona y furfural alcohol.

Tabla 11. Compuestos volátiles (área x 10⁻⁴) en las diferentes leches fermentadas.

Compuestos volátiles	Almacenamiento							
	Día 1				Día 14			
	HPH	HPH-Pro	TC	TC-Pro	HPH	HPH-Pro	TC	TC-Pro
acetaldehído	3874	2803	2399	5393	2501	4692	2300	3276
2-propanona	4017	976	1972	1894	891	1454	1408	2166
2-butanona	3879	813	2004	1004	2145	1158	1868	1272
diacetilo	4900	4026	4439	4373	5166	2225	5602	2036
2-pentanona	1211	1332	1938	1999	1012	1827	1514	2177
2,4-pentadiona	275	772	406	229	918	-	-	-
hexanal	1236	948	1011	-	-	1978	764	1355
acetoina	8987	8575	10003	9023	8686	9735	8522	7974
hexanol	1065	914	778	555	-	-	-	-
2-metil-3-pentanona	671	1462	719	1369	718	1443	765	1190
butanol	272	727	383	879	281	735	337	591
2-nonanona	-	412	291	1242	589	-	816	557
ácido acético	2256	7584	2352	9356	1248	9557	1139	7441
benzaldehído	-	17	-	588	-	-	-	-
ácido butanoico	2312	2249	2880	2410	1539	2760	1413	1695
3-decen-2-ona	2551	2368	1987	1072	2577	2338	2240	2022
furfuril alcohol	1411	1531	1032	584	1557	1917	963	1361
ácido hexanoico	3410	3721	3881	3656	2522	4037	2562	2834
fenetil alcohol	901	789	1317	1061	508	479	680	597
ácido octanoico	1688	1924	1710	1773	1470	2202	1566	1793

-: no detectado.

I.b.5 Discusión

Varias estrategias han sido propuestas, incluido el tratamiento HPH, para mejorar las características sensoriales de los productos lácteos fermentados probióticos y/o para diversificar esta rama del sector alimentario (Patrignani y col., 2007). Los datos obtenidos en este trabajo muestran que el uso de leche tratada por HPH favorece el mantenimiento de la viabilidad de los cultivos starters, particularmente de *St. thermophilus* Sty1, incluso hacia el final del período de almacenamiento refrigerado sin observarse efectos en la viabilidad de las cepas de bacterias probióticas ensayadas en particular, recordando que en probióticos todos los efectos son cepas dependientes. La presencia de niveles elevados de BAL viables al final de la fecha de caducidad de las leches fermentadas HPH y HPH-Pro es una característica interesante del producto debido a que actualmente se consideran también probióticos a los cultivos starters tradicionales (Guarner y col., 2005). Resultados similares fueron informados por Lanciotti y col. (2004b) quienes encontraron que el tratamiento HPH de la leche incrementó la viabilidad de los cultivos starters durante el almacenamiento refrigerado y favoreció el crecimiento de *St. thermophilus* respecto a *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, reduciendo el riesgo de post acidificación.

Además, *Lb. acidophilus* 08 y *Lb. paracasei* A13 mantuvieron recuentos de células viables cercanos a 5,0 y 7,0 órdenes log UFC/g, respectivamente, al final de la vida útil de ambas leches fermentadas (TC-Pro y HPH-Pro). De esta manera podemos indicar que las leches fermentadas elaboradas a partir de leche tratada por HPH resultan ser tan apropiadas, como los yogures tradicionales, en cuanto al mantenimiento de la viabilidad de las bacterias probióticas utilizadas, aunque siempre las conclusiones deben alcanzar a las cepas ensayadas y no extenderlas a la especie estudiada debido a la gran dependencia de los resultados obtenidos y la cepa en cuestión. Probablemente, el uso de mayores presiones de homogeneización podría haber mejorado la viabilidad de los cultivos probióticos como vimos anteriormente para quesos Crescenza HPH-Pro. En el caso del queso, se aplicó una presión de 100 MPa a la leche y se observó mayor viabilidad de la cepa *Lb. acidophilus* H5 luego de 12 días de almacenamiento a 4°C en los quesos HPH-Pro. La mayor viabilidad se atribuyó al incremento temprano en la disponibilidad de péptidos de bajo peso molecular y de ácidos grasos como el ácido oleico, esencial para el crecimiento de varias BAL (Guerzoni y col., 2001). En el caso

de yogures y leches fermentadas, altos niveles de proteólisis y lipólisis son considerados negativos. Los perfiles electroforéticos no mostraron diferencias significativas entre las distintas muestras, indicando que el nivel de presión aplicado (60 Mpa), capaz de modificar las características organolépticas y estructurales del producto, no afectó los patrones hidrolíticos. Patrignani y col. (2007) informaron valores de presión entre 60 y 80 Mpa como óptimos para mantener la viabilidad de bacterias probióticas y para mejorar las características sensoriales de leches fermentadas elaboradas sólo con bacterias probióticas.

Varios autores han informado una mayor sensibilidad de cepas de la especie *Lb. acidophilus*, comparada con la de cepas del grupo *Lactobacillus casei*, a las condiciones adversas encontradas en una leche fermentada. Nighswonger y col. (1996) encontraron mayor viabilidad de *Lb. casei* en yogur y suero de manteca fermentado comparada con varias cepas de *Lb. acidophilus* durante el almacenamiento refrigerado. Dave y Shah (1998) observaron una reducción de 2 órdenes log para *Lb. acidophilus* en yogur, mientras que Vinderola y col. (2000a) observaron una reducción de hasta 4 órdenes log dependiendo del tipo de yogur analizado. En un estudio previo realizado por Gilliland y Speck (1977) *Lb. acidophilus* NCFM no se mantuvo viable cuando se adicionó a yogur. Se cree que la formación de H₂O₂ por las especies de *Lactobacillus* y el bajo pH alcanzado en el producto son factores que afectan la viabilidad de las bacterias probióticas durante el almacenamiento. No obstante esto, se han atribuido características probióticas a productos lácteos en los cuales las bacterias no se encontraban viables (Ouwehand y Salminen, 1998; Vinderola y col., 2005). En este contexto no es sorprendente notar que, al menos en Argentina el mercado de leches fermentadas probióticas iniciado a mediados de los 90' con las denominadas "leches cultivadas" (conteniendo bifidobacterias y *Lb. acidophilus*) haya sido progresivamente dominado por productos conteniendo *Lb. casei*, *Lb. paracasei* o *Lactobacillus rhamnosus*, que son especies aparentemente más robustas desde el punto de vista tecnológico que *Lb. acidophilus*. Estudios futuros *in vivo* podrían demostrar si luego del almacenamiento, las leches fermentadas HPH-Pro que contienen menor número de células viables que al inicio, presentan las mismas características probióticas que los productos recién elaborados.

Los principales compuestos de aroma característicos de los yogures son acetaldehído, etanol, 2-propanona, diacetilo y 2-butanona (Ott y col., 1997). Estos compuestos confieren el flavour característico a estos productos (Tamime y Robinson, 1999). En este trabajo, tales compuestos se detectaron tanto al comienzo como al final de la vida útil del producto. La pérdida de flavour en leches fermentadas, debido a la reducción del diacetilo, puede ocasionar un problema de aceptabilidad del producto (Oberman y Libudsisz, 1998). En nuestro trabajo, la pérdida más importante de diacetilo se observó en las leches fermentadas adicionadas de cultivos probióticos, que se caracterizaron, además, por tener bajos valores de pH y elevadas concentraciones de ácido acético. Durante el análisis sensorial, los panelistas detectaron diferencias significativas en el flavour de la leche fermentada tradicional (TC) respecto a las demás. Sin embargo, todas las muestras recibieron altos puntajes y fueron consideradas de buena calidad y sin diferencias en la aceptabilidad general entre ellas. El menor puntaje de las leches fermentadas HPH-Pro se podría atribuir a la retención de compuestos de flavour asociado a la formación de un gel de proteínas diferente. En un trabajo previo de Guerzoni y col. (1999b) se reportó que el tratamiento HPH provocó mayor exposición de regiones hidrofóbicas de las proteínas. Además, la liberación de compuestos de sabor y aroma y su percepción durante el consumo, los cuales son un parámetro clave de calidad, están indudablemente afectados por la matriz y la microestructura del alimento (Lanciotti y col., 2004b). Si bien se sabe que el tratamiento HPH afecta a los diversos componentes de la leche, las modificaciones que se producen en la matriz alimentaria dependen de varios factores como son la severidad del tratamiento (nivel de presión aplicado y número de pases), la temperatura de entrada y de salida del fluido y las características fisicoquímicas y composición del alimento (Lanciotti y col., 1996, Vachon y col., 2002; Patrignani y col., 2007). En nuestro trabajo, los yogures elaborados presentaron diferentes características reológicas según el tratamiento inicial de la leche y la presencia de bacterias probióticas. En general, las leches fermentadas HPH fueron significativamente más firmes, viscosas, cohesivas y de mayor consistencia que las leches fermentadas TC. Estos resultados coinciden con los presentados por Penna y col. (2007a). La homogeneización de la leche es considerada una práctica común para mejorar la consistencia de los yogures y para producir geles más firmes (Lucey y Singh, 1997; Lanciotti y col., 2004a y b). Lanciotti y col. (2004b) demostraron

que un incremento en la presión aplicada mejoró la viscosidad de yogures enteros. La aplicación de altas presiones puede modificar el tamaño de los glóbulos de grasa y de las micelas de caseína generando subunidades más pequeñas lo cual mejoraría las propiedades de agregación (Lopez-Fandiño y col., 1998; Lanciotti y col., 2004a y b). Si comparamos las leches fermentadas adicionadas de bacterias probióticas con sus respectivos controles sin probióticos, las primeras se caracterizaron por presentar mayor firmeza y consistencia pero menores índices de viscosidad. Penna y col. (2007b) informaron resultados similares ya que los yogures elaborados con bacterias probióticas presentaron menor viscosidad que los yogures elaborados solamente con el cultivo starter. Shihata y Shah (2002) y Hassan y col. (1996) encontraron que el índice de viscosidad y la firmeza dependían del tipo de fermento utilizado y del pH final del yogur. En general una mejor firmeza se debe a la fijación de cepas mucogénicas a la matriz proteica a través de exopolisacáridos (EPS) (Rawson y Marshall, 1997) mientras que el índice de viscosidad parece estar afectado por la presencia de cepas proteolíticas capaces de hidrolizar proteínas y de reducir este parámetro (Shihata y Shah, 2002). De este modo, la viscosidad aparente, como se mostró también en otros estudios (Faber y col., 1998), no está relacionada simplemente a la concentración de EPS en las leches fermentadas sino que también depende de otros factores. De cualquier forma, el tratamiento de alta presión afectó significativamente y de manera positiva los parámetros de textura del coágulo debido a su capacidad de mejorar o modificar la textura y otras características organolépticas. Los datos del análisis sensorial confirmaron la mayor consistencia de las leches fermentadas HPH.

I.b.6 Conclusiones

El tratamiento HPH aplicado permitió mejorar la viabilidad de la cepa de *St. thermophilus*, no así la de las cepas de *Lb. acidophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* empleadas, para las condiciones ensayadas y no afectó a la viabilidad de *Lb. paracasei* A13. Este tratamiento podría resultar una herramienta útil para diversificar el mercado de las leches fermentadas probióticas, especialmente en términos de textura. Este parámetro es un criterio importante para evaluar la calidad de una leche fermentada y juega un rol importante en la aprobación del producto por parte del consumidor.

CAPÍTULO II

Adaptación a sales biliares de lactobacilos no intestinales

II.1 Microbiota del tracto gastrointestinal

El tracto gastrointestinal es un ecosistema complejo en el cual coexisten e interaccionan permanentemente tres componentes principales: las células del huésped (muchas de ellas con capacidad inmunológica), los nutrientes y los microorganismos, indígenas (microbiota) y los que provienen de la dieta.

La microbiota intestinal es un conjunto diverso y dinámico compuesto por microorganismos que se han adaptado a vivir en la superficie de la mucosa intestinal o dentro de la luz intestinal. El estómago y el duodeno alojan números muy bajos de microorganismos: $<10^3$ UFC por gramo de contenido. *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Candida albicans* y *Helicobacter pylori* son los microorganismos comúnmente encontrados en el estómago y el duodeno. Las secreciones ácidas, biliares, y pancreáticas inhiben a la mayoría de los microorganismos ingeridos. En yeyuno e íleon el número de bacterias aumenta progresivamente desde aproximadamente 10^4 células en el yeyuno hasta 10^7 células por gramo de contenido en el íleon distal. La microbiota que se encuentra en el yeyuno está constituida por *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *C. albicans* y *Bacteroides* mientras que en el íleon están presentes *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Clostridium* y enterobacterias. El intestino grueso, en cambio, se encuentra densamente poblado por microorganismos anaerobios: aprox. 10^{12} UFC por gramo de contenido intestinal. Los microorganismos encontrados son *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* (OMGE, 2008; Tannis, 2008). La composición de la microbiota, así como las interacciones entre sus componentes y con la mucosa intestinal, condicionan tanto los estados de salud como de enfermedad. Entre ellos, los probióticos son microorganismos implicados en el mantenimiento o mejora de la salud del TGI por ser, en su mayoría, habitantes naturales de este nicho con funciones fisiológicas exclusivamente benéficas en él. El equilibrio entre las diferentes poblaciones microbianas es dinámico y se modifica por factores tales como la edad del individuo, el estrés, su estado de salud, la dieta, la administración de antibióticos o las terapias con rayos.

La microbiota intestinal es esencial para el desarrollo del intestino, el mantenimiento de la homeostasis y la protección contra agentes patológicos, a tal punto que algunos investigadores la consideran como un “órgano difuso” del huésped. En

particular, esta microbiota participa en reacciones metabólicas como la fermentación de fibras no digeribles (almidones, algunos oligosacáridos), biotransformación de ácidos biliares conjugados, degradación de complejos de oxalato y síntesis de algunas vitaminas (como las vitaminas B12 y K). Por otro lado, ejerce efectos tróficos sobre el epitelio intestinal favoreciendo el desarrollo de las microvellosidades intestinales y juega un rol importante en la maduración de las respuestas inmune innata y adaptativa del huésped (Montalto y col., 2009).

II.2 Microorganismos probióticos. Definición

El término “probiótico” deriva del griego *bios* al que se le añade el prefijo *pro-* (a favor de) y significa “a favor de la vida”. Se introdujo por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell donde, a diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. Luego de numerosos cambios y acepciones de la definición, en el año 2002, y luego de una reunión de expertos internacionales en la ciudad de Córdoba (Argentina) en Octubre de 2001, la FAO/WHO adoptó la definición de **probióticos** como “*microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud del hospedador*”. Esta definición implica que los probióticos deben estar vivos al menos en el momento de su administración, aunque no queda explícito si deben llegar vivos al intestino, y que deben inducir un beneficio fisiológico corroborado por estudios científicos. Las BAL, entre las que se encuentra el género *Lactobacillus*, han sido utilizadas para la conservación de alimentos mediante fermentación durante miles de años; pueden ejercer una función doble, actuando como agentes fermentadores de alimentos, pudiendo además generar efectos beneficiosos a la salud. Numerosas cepas de varios géneros de bacterias (y levaduras) han sido propuestas como probióticos. Sin embargo, los géneros más comúnmente utilizados para aislar cepas probióticas son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, por ser integrantes naturales de la microbiota y por ejercer efectos exclusivamente benéficos sobre la salud.

II.3 El género *Lactobacillus*

Los lactobacilos son microorganismos Gram positivos, no formadores de esporas, catalasa negativa (con algunas excepciones), con morfología de bacilos o

cocobacilos. Presentan un metabolismo fermentativo (homo o heterofermentantes), son microaerófilos y quimio-organotróficos. El género *Lactobacillus* pertenece al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae* y están muy relacionados con los géneros *Paralactobacillus* y *Pediococcus*. Es el género más numeroso y contiene 106 especies descritas hasta el momento (Vasiljevic y Shah, 2008).

II.3.1 Lactobacilos de origen intestinal y no intestinal

Las especies de *Lactobacillus* más comúnmente aisladas del intestino humano son *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus brevis* (Vasiljevic y Shah, 2008). Debido a su origen intestinal, numerosas cepas de estas especies son utilizadas por la industria como probióticos, por el criterio de especificidad de especies que sostiene que las mejores cepas para una especie son aquellas aisladas de individuos sanos de otros miembros de la misma especie. Sin embargo este criterio está en actual debate y revisión ya que existen numerosos trabajos que demuestran que una cepa exógena puede ser tan efectiva en la inducción de efectos benéficos como una cepa endógena (Dogi y Perdígón, 2006), siendo entonces la especificidad de cepas más relevante que la especificidad de especies.

Lactobacillus delbrueckii es una especie intensamente utilizada en la industria para la elaboración de productos fermentados. En particular, es utilizada para la elaboración de yogur (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) y quesos duros (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*) (Giraffa y col., 1998). Tannock (2003) y Wall y col. (2006) reportaron que *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* son microorganismos que no se encuentran frecuentemente en la microbiota intestinal debido a su baja capacidad de sobrevivir a las condiciones adversas del TGI. Sin embargo, existe evidencia de otros autores de que una importante cantidad de *L. delbrueckii* puede sobrevivir al tránsito gastrointestinal (Marteau y col., 1997; Lick y col., 2001; Mater y col., 2005; Elli y col., 2006) a pesar de no pertenecer ecológicamente a este nicho. Varios trabajos han informado, además, la capacidad de algunas cepas de estas especies de adherirse a células epiteliales intestinales (Guglielmotti y col., 2007). Aún a microorganismos que no sobreviven al tránsito por el

TGI, se les han atribuido efectos sobre la salud. Los efectos benéficos atribuidos a cultivos starters como *Lb. delbrueckii* o *Streptococcus thermophilus* estarían relacionados al suministro de enzimas importantes para la digestión de nutrientes como la β -galactosidasa (Gilliland, 1998), a su elevada capacidad proteolítica y liberación de péptidos funcionales bioactivos a partir de proteínas de la leche (Korhonen y Pihlanto, 2006; Hebert y col., 2008) o a efectos relacionados a restos de paredes celulares (Tsuruta y col., 2009). En la Tabla 12 se detallan las especies bacterianas más comúnmente utilizadas como probióticos.

Tabla 12. Especies bacterianas a partir de las cuales se han aislado cepas probióticas.

Lactobacilos	Bifidobacterias	Otras BAL	Otras bacterias
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>St. thermophilus</i>	<i>E. coli</i> (cepa Nissle)
<i>Lb. paracasei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	
<i>Lb. reuteri</i>	<i>B. longum</i>		
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>B. lactis</i>		
<i>Lb. plantarum</i>			
<i>Lb. johnsonii</i>			
<i>Lb. salivarius</i>			
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>			

II.4 Criterios de selección de cepas probióticas

Si bien el requisito final para que una cepa sea considerada probiótica es que se demuestre *in vivo* de que es capaz de ejercer un efecto benéfico sobre la salud del consumidor, existen ciertas características “deseables” al momento de caracterizar y seleccionar cepas con potencial probiótico. Varios criterios *in vitro* han sido utilizados para la selección de cepas probióticas, siendo los más empleados la supervivencia al tránsito por el TGI (bajos pH clorhídricos y elevadas concentraciones de sales biliares), la hidrofobicidad superficial, la capacidad de adhesión a líneas celulares o mucus y la actividad antimicrobiana entre otros. El cumplimiento de estos requisitos garantiza, a

priori, una mayor viabilidad en el tracto intestinal, y la mayor viabilidad está relacionada a una mayor magnitud del efecto probiótico buscado (Ouwehand y Salminen, 1998).

II.5 Sobrevida a las condiciones adversas del TGI

El tránsito de los microorganismos probióticos incluidos en alimentos a través del TGI está sujeto a factores de estrés en diferente magnitud y por tiempos variables. Para el screening de bacterias probióticas, numerosos trabajos realizan simulaciones *in vitro* de la tolerancia a la acidez gástrica (Fernández y col., 2003; Verdenelli y col., 2009), la sobrevida a la exposición a sales biliares o la capacidad de crecer en presencia de ellas. Muchos menos estudios se han realizado utilizando muestras de jugo gástrico y bilis humana. Menos atención aún se ha dado al origen de la bilis (bovina, porcina, humana) para los estudios *in vitro*, debido a la conocida diferente capacidad inhibitoria que tienen entre sí (Margolles y col., 2009).

II.6 Capacidad de adhesión /colonización transitoria del TGI

Algunos de los efectos benéficos de los microorganismos probióticos sobre la salud del consumidor están relacionados a la capacidad de los mismos de adherirse a la mucosa intestinal. La adhesión es un pre requisito para colonizar el intestino, estimular el sistema inmune y para ejercer actividades antagonistas contra microorganismos enteropatógenos a través de la exclusión competitiva. Aunque en la actualidad se conoce que la colonización del intestino es solamente transitoria y no permanente (Gardiner y col., 1999, Ohashi y col., 2004) ni siquiera es posible una colonización permanente en neonatos donde la falta de una microbiota instalada y madura podría hacer pensar en la posibilidad de una intervención con probióticos para lograr una colonización permanente (Gueimonde y col., 2006a). La mucosa intestinal está cubierta de una capa de diferentes tipos de células epiteliales (células epiteliales, células caliciformes, células M) las cuales son diferentes en las distintas regiones del TGI. Además de las células secretoras y absorbivas, una parte importante del sistema inmune se localiza en esta región y se conoce colectivamente como GALT (gut-associated lymphoid tissue). El epitelio intestinal se encuentra cubierto casi por completo por una capa de mucus protectora compuesta principalmente de mucina y glicoproteínas. El

genoma de algunas cepas probióticas revela la presencia de varias moléculas capaces de adherirse a los diferentes componentes de la mucosa intestinal y capaces de intercambiar señales con el sistema inmune asociado. Los estudios de adhesión se han realizado, en su mayoría, con líneas celulares obtenidas de adenocarcinomas de colon humano como las líneas celulares Caco-2 (ATCC HTB-37) y HT-29 (ATCC HTB-38) capaces de producir mucina (Margolles y col., 2009) y en menor medida con cultivos *ex vivo* de células epiteliales (Vinderola y col., 2005). Gueimonde y col. (2006b) encontraron buena correlación entre un modelo de mucus humano y la adhesión a células Caco-2 empleando 3 cepas de *Lactobacillus*. Ambos métodos resultaron adecuados para realizar estudios de adhesión *in vitro*. Un método menos explotado es el empleo de bacterias marcadas con sustancias fluorescentes que permite observar la distribución espacial de células bacterianas adheridas e internalizadas en la mucosa intestinal (Vinderola y col., 2004).

II.7 Actividad antimicrobiana

En el complejo ecosistema gastrointestinal, los probióticos han desarrollado mecanismos para competir y sobrevivir frente a otros microorganismos. En general, la actividad antagónica se produce a través de la competencia por nutrientes y por espacio físico, pero también a través de la producción de sustancias antimicrobianas tales como ácidos orgánicos, etanol, H₂O₂ y componentes tipo-bacteriocina. No obstante, queda por dilucidar cuan metabólicamente activos están los probióticos durante el tránsito gastrointestinal para que realmente puedan sintetizar y excretar los compuestos antimicrobianos. Oozeer y col. (2004) demostraron que *Lb. casei* DN-114 001, incorporada a una leche fermentada y que inicialmente presentaba muy baja actividad metabólica, fue capaz de sintetizar proteínas *de novo* luego del tránsito a través del tracto digestivo de ratones colonizados con microbiota humana. Bron y col. (2004a) identificaron 72 genes de *Lb. plantarum* cuya expresión resultó inducida durante el tránsito a través del TGI de ratones.

II.8 Factores de estrés en el TGI

Para sobrevivir al tránsito a través del TGI humano, los microorganismos probióticos deben tolerar varios factores adversos, entre ellos variaciones en el pH del

estómago, sales biliares, lisozima, péptidos antimicrobianos secretados en el intestino y el peristaltismo que atenta contra la permanencia de las células en tránsito (Begley y col., 2005).

Luego de la masticación, la primera barrera que deben superar las bacterias es el pH ácido del estómago cuyo valor es cercano a 1,5-2 durante un tiempo promedio de aproximadamente 90 minutos, dependiendo de la consistencia del alimento. En el duodeno, el pH se eleva a 6 - 6,5 pero se produce la liberación de sales biliares desde la vesícula biliar alcanzando concentraciones de 1,5 – 2% (p/v) durante la primer hora de digestión y luego la misma desciende a 0,3% (p/v) o menos. El período de residencia en el intestino delgado, hasta vaciar el 50% del contenido, varía entre 2,5 y 3 hs y el tránsito a través del colon puede llevar hasta 40 hs. En el colon el pH es casi neutro (6,5 – 7,0) y la concentración de sales biliares es baja (Margolles y col., 2009).

II.8.1 Sales biliares

Debido a que el hígado secreta alrededor de 1 litro de bilis al tracto intestinal cada día, la exposición a las sales biliares representa un desafío importante para la viabilidad de los probióticos en tránsito. La bilis es una secreción digestiva verde-amarillenta compuesta principalmente de ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y el pigmento biliverdina. La principal función de la bilis es la de actuar como detergente biológico permitiendo la emulsificación y solubilización de los lípidos. También actúa como un medio de excreción permitiendo la eliminación de sustancias que no se pueden eliminar por vía urinaria por ser insolubles o estar unidas a proteínas (Begley y col., 2005).

Los ácidos biliares primarios (ácido cólico y quenodesoxicólico), que se sintetizan en el hígado a partir del colesterol, pueden ser modificados por enzimas bacterianas presentes en el intestino y formar ácidos biliares secundarios (ácido desoxicólico y litocólico). Antes de ser secretados, los ácidos biliares se conjugan con los aminoácidos glicina o taurina. A estos conjugados se los llama comúnmente sales biliares debido a que a pH fisiológico se encuentran completamente ionizados. En la Tabla 13 se muestran los principales ácidos biliares humanos.

Tabla 13. Principales ácidos biliares humanos.

Ácido biliar
Ácidos biliares conjugados
Ácido glicocólico
Ácido taurocólico
Ácido glicoenodesoxicólico
Ácido tauroenodesoxicólico
Ácido glicodesoxicólico
Ácido taurodesoxicólico
Ácido glicolitocólico
Ácido taurolitocólico
Ácidos biliares primarios
Ácido cólico
Ácido quenodesoxicólico
Ácidos biliares secundarios
Ácido desoxicólico
Ácido litocólico

La capacidad de los ácidos biliares de actuar como detergentes les permite interactuar con los lípidos de membrana de las bacterias y le confiere a la bilis propiedades antimicrobianas. Estudios realizados en mutantes sensibles a bilis demostraron que la mayoría de los *loci* afectados estaban directa o indirectamente relacionados al mantenimiento de la integridad de la membrana celular. Mediante estudios de microscopía electrónica se observó que las células expuestas a bilis eran más delgadas y “vacías” (Leverrier y col., 2003) y ensayos enzimáticos confirmaron la salida de material intracelular indicando que la bilis altera la integridad/permeabilidad de la membrana (Fujisawa y Mori, 1996).

Varios factores determinan el efecto de la bilis sobre las membranas. En primer lugar, la concentración de bilis es de gran importancia. Las sales biliares en altas concentraciones pueden disolver rápidamente los lípidos y disociar proteínas integrales de membrana (Heuman y col., 1996) causando pérdida del material intracelular y, por lo tanto, la muerte celular. Bajas concentraciones de sales biliares, sin embargo, alteran la integridad de la membrana, la actividad de enzimas e incrementan el flujo transmembrana de cationes divalentes (Fujisawa y Mori, 1996; Heuman y col., 1996).

Por otro lado, se observó que bajas concentraciones de bilis alteran las propiedades fisicoquímicas de las superficies celulares como la hidrofobicidad y el potencial zeta (Gómez-Zavaglia y col., 2002).

Otro factor importante es la composición de la bilis. Como los ácidos biliares conjugados son ácidos fuertes, a pH fisiológico generalmente están completamente ionizados y no entran a la célula si no es por un sistema de transporte. Los ácidos biliares no conjugados, en cambio, puede atravesar pasivamente la bicapa lipídica mediante movimientos de tipo flip-flop (término utilizado para designar el movimiento de vaivén que tiene una proteína transmembrana en el interior de la bicapa de fosfolípidos) e ingresar a la célula. Los ácidos biliares con 2 grupos hidroxí ingresan más rápidamente que los que contienen 3 grupos hidroxí. La bilis bovina, que contiene sales biliares trihidroxiconjugadas, es menos inhibitoria que la bilis porcina que contiene sales biliares dihidroxiconjugadas (Begley y col., 2005). Si bien la mayoría de los estudios realizados *in vitro* para investigar la tolerancia de los microorganismos a las sales biliares se realizan con bilis bovina (Oh y col., 2000, Collado y Sanz, 2007; Lee y col., 2008b), la bilis porcina es más parecida a la bilis humana con respecto a las proporciones de sales biliares/colesterol, fosfolípidos/colesterol y glicina/taurina. La bilis porcina contiene, además, mayores niveles de sales biliares conjugadas con glicina que la bilis bovina, las cuales son más tóxicas para lactobacilos (Ryan y col., 2008).

Otro factor que juega un papel importante en la resistencia a la bilis es la arquitectura y composición de la membrana. Además de los daños ocasionados sobre la membrana celular, se ha visto que los ácidos biliares pueden generar daños a nivel de ADN y ARN y causar estrés oxidativo a través de la formación de radicales libres (Begley y col., 2005).

II.9 Adaptación de microorganismos a factores de estrés

La modificación genética de microorganismos o su adaptación natural a factores de estrés por presión selectiva son dos alternativas que se pueden utilizar para obtener derivados resistentes de una cepa a un factor de estrés que puede ser letal. Si bien existen cepas de bifidobacterias y lactobacilos genéticamente modificadas, su utilización en alimentos no está permitida. La adaptación es una herramienta natural, valiosa y sin restricciones que ha permitido obtener cepas “mejoradas” en relación al

parámetro al cual se la adaptó. Como se mencionó anteriormente, luego de la ingesta oral, las bacterias lácticas y probióticas deben sobrevivir al paso a través del TGI y alcanzar el intestino para ejercer sus efectos benéficos. El pH ácido del estómago y las altas concentraciones de sales biliares en el intestino delgado son las principales barreras biológicas que deben superar estos microorganismos. Someter a las células microbianas a una condición de estrés leve puede hacer que las mismas adquieran resistencia frente a la exposición posterior de niveles letales de dicho factor de estrés. Además, la pre-adaptación de las células a una determinada condición de estrés puede generar resistencia hacia otros factores de estrés (Sanders y Huis in't Veld, 1999), lo que se denomina adaptación cruzada. Esto puede ser importante para los microorganismos presentes en ambientes en los cuales pueden estar expuestos a una combinación de factores, como es el TGI humano. Margolles y col. (2003) obtuvieron cepas de *Bifidobacterium* con resistencia incrementada hacia la sal biliar colato de sodio mediante exposición a concentraciones gradualmente crecientes de dicho compuesto. El fenotipo resistente se mantuvo estable y la adquisición de resistencia produjo algunos cambios fisiológicos que mejoraron la supervivencia de la cepa adaptada en el ambiente intestinal (De los Reyes-Gavilán y col., 2005). De manera similar, Collado y Sanz (2006) desarrollaron un método para la selección directa de cepas de *Bifidobacterium* resistentes a ácido mediante la exposición prolongada de heces humanas a condiciones de estrés. Las cepas obtenidas resultaron resistentes a las condiciones de acidez gástrica (pH 2) y, además, mostraron buena tolerancia a altas concentraciones de sales biliares y NaCl. Este fenómeno de resistencia cruzada entre pH bajos y sales biliares fue descrito previamente por Noriega y col. (2004) para cepas adaptadas a bilis. En la literatura se describen varias cepas de lactobacilos y bifidobacterias con tolerancia mejorada a distintos factores de estrés, lo cual mejora su viabilidad frente a diversas condiciones tecnológicas y del TGI (Margolles y col., 2009). Sin embargo, la mayoría de las cepas empleadas habían sido aisladas del ambiente intestinal, por lo cual eran adaptadas a niveles mayores de un factor de estrés común para estas cepas. Esta parte del trabajo consistió en obtener derivados resistentes a bilis a partir de cepas de lactobacilos de origen no intestinal pertenecientes a la colección del INLAIN.

Es pertinente aclarar que debemos considerar que la **respuesta** comprende todos aquellos cambios transitorios en la expresión génica y en la síntesis de proteínas que se