

## ESTUDIO DE LA SOBREVIVENCIA Y CAPACIDAD PROTEOLÍTICA DE *Lactobacillus rhamnosus* GG EN UN QUESO SEMIMADURO ENRIQUECIDO CON AGUAMIEL

Gutiérrez-Rodríguez, J. <sup>a</sup>; Rodríguez-Serrano G. M.<sup>b</sup>; Franco-Fernández, M. J. <sup>c</sup>; González-Olivares L.G.<sup>a</sup> Añorve-Morga, J.<sup>a</sup>; Castañeda-Ovando, A.<sup>a</sup>, Contreras-López, E.<sup>a</sup>; Jaimez-Ordaz; J.<sup>a</sup>;

<sup>a</sup>Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Mineral de la Reforma, Hgo., C.P. 42184, México

<sup>b</sup>Departamento de Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina, México D.F. 09340, México. CP 09340, México, D.F.

<sup>c</sup>Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Rancho Universitario Av. Universidad Km. 1 Ex-Hda. de Aquetzalpa AP 32, Tulancingo, Hgo. México  
Autor de correspondencia: [lggonzalez@uaeh.edu.mx](mailto:lggonzalez@uaeh.edu.mx)

### RESUMEN

En los últimos años ha habido un creciente interés por los alimentos funcionales, tales como aquellos adicionados con probióticos y prebióticos, conocidos como alimentos simbióticos. La importancia de este tipo de alimentos radica principalmente, en la promoción de los beneficios en la salud del ser humano. En este estudio se determinó la sobrevivencia del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG en un queso simbiótico tipo manchego adicionado con aguamiel, como prebiótico. El queso se maduró a una temperatura de 14°C y durante esta etapa se evaluaron los cambios de pH y el grado de proteólisis a través del análisis de grupos amino libres mediante el método de ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS). Los resultados fueron comparados con los obtenidos en un queso elaborado sin la adición del prebiótico. Al final del estudio, en el queso simbiótico la viabilidad del probiótico aumentó dos ciclos logarítmicos (de 6,73 a 8.72 log UFC). La concentración de grupos amino libres fue mayor en el queso simbiótico (8.63 mg/L) y el pH aumentó en ambos quesos (P=0.05), el simbiótico y el control. Esto último pudo deberse a que este aumento está influenciado por la producción de aminas primarias.

### ABSTRACT:

In recent years, interest about functional foods has been increased, such as those with added probiotics. The importance of this kind of food is over the granting of benefits in human health. In this study the survival of the probiotic microorganism *Lactobacillus rhamnosus* GG was determined in a symbiotic Manchego type cheese with added prebiotic. It was ripened at 14°C. The pH changes and proteolysis degree were measured during ripening. The last one was determined through analysis of free amino groups by trinitrobenzenesulfonic acid method (TNBS). The results were compared with those obtained in a cheese made without the addition of prebiotic. At the end of the study, symbiotic cheese viability increased two logarithmic cycles (6.73 log CFU to 8.72), the concentration of free amino groups was higher in cheese symbiotic (8.63mg / L) and the pH was increased in both (P = 0.05), the symbiotic and control cheese. The pH increasing could be because it was influenced by the production of primary amines.

### Palabras clave:

Probiótico, prebiótico, péptidos bioactivos

### Keyword:

Probiotic, prebiotic, bioactive peptides

**Área:** Microbiología y biotecnología

### INTRODUCCIÓN

Durante la última década, los alimentos adicionados con probióticos han adquirido importancia debido a que se ha demostrado que promueven beneficios a la salud del ser humano. Estos beneficios van desde la activación del sistema inmunológico hasta mecanismos que contrarrestan las diarreas asociadas a antibióticos (Morelli, 2004), entre otros beneficios. Un

probiótico es un microorganismo vivo que mejora de forma activa la salud de los consumidores, perfeccionando el balance de la microflora del intestino al ser ingeridos vivos y en cantidades suficientes, que van  $10^6$  a  $10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC/mL) (Sanders, 1999). Las bacterias más estudiadas como probióticos son los lactobacilos y las bifidobacterias.

Por otro lado, los prebióticos son alimentos no digeribles que afectan de forma benéfica al ser humano, ya que su consumo estimula de forma selectiva, el crecimiento o la actividad de un número limitado de bacterias del colon, principalmente las denominadas probióticas (Shah, 2001).

Un alimento que contiene tanto un probiótico como un prebiótico se ha definido como simbiótico (Sanders, 1999). Los alimentos simbióticos están promueven la supervivencia de las bacterias probióticas. Este término debe reservarse exclusivamente para los productos en los que se ha comprobado científicamente la simbiosis, es decir en los cuales los prebióticos favorecen selectivamente el crecimiento de los probióticos (Ashwell, 2005).

Entre los cultivos iniciadores para la maduración de un queso, se encuentran bacterias lácticas que pueden tener características probióticas. Sin embargo, en el caso particular del uso de bacterias lácticas probióticas, muchas de estas no sobreviven debido al estrés que se genera por la presencia de sales y por las temperaturas de almacenamiento, entre otros factores. Por ello, para asegurar que la cantidad de bacterias lácticas probióticas sea la adecuada en el momento del consumo, se han elaborado quesos inoculados con altas concentraciones de microorganismos (entre  $10^9$  a  $10^{12}$  UFC/mL), con modificaciones en los procesos de fabricación de tal manera que se favorezca su supervivencia (Farnworth, 2008).

Uno de los principales factores que afectan la viabilidad de bacterias ácido lácticas probióticas, es la presencia de oxígeno. Esto es debido a que en su mayoría se trata de bacterias anaerobias facultativas. Es por ello que debido a la baja movilidad del oxígeno en quesos, estos son matrices que favorecen la supervivencia de bacterias ácido lácticas probióticas. Además, la adición de un prebiótico permitiría estimular su crecimiento selectivo (Gonzalez-Olivares y col., 2014).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto que produce un prebiótico en el crecimiento y supervivencia de un probiótico, durante la maduración de un queso tipo manchego.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Elaboración de queso manchego con prebiótico**

El queso se elaboró en el Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICA) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo a partir de leche de vaca pasteurizada y estandarizada a un 3.6% de contenido de grasa. La leche se calentó a una temperatura de  $36^{\circ}\text{C}$  para agregarle el 1% de inóculo (*Lactobacillus rhamnosus* GG) y el 2% de prebiótico (aguamiel). La premaduración se realizó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de 40 minutos. Se agregó 1 mL de cuajo (CUAMEX). Se dejó cuajar durante 40 minutos y se cortó la cuajada. Se agitó sin calor durante 40 minutos y se procedió a desuerar.

Se prensó en una prensa tipo Retamoso (5 kg/kg queso) durante 24 horas y se envasó al vacío para después almacenarlo a 14°C. Se realizó un queso control sin prebiótico del mismo modo.

### **Preparación de las muestras**

Se realizaron 3 lotes de queso; dos con el probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* GG) y prebiótico (aguamiel) y uno solo con el probiótico. Se tomaron muestras los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35 para los análisis posteriores. El queso se maduró a 14°C a una humedad relativa de 80% y se empacó al vacío.

**Análisis de la concentración de carbohidratos en el aguamiel** El aguamiel se pasteurizó en autoclave a 90°C por 15 minutos. La concentración de carbohidratos fue determinada por HPLC (Lab Alliance, Tokyo, Japón). Se usó una columna RCM-monosacáridos de 300 x 7.8 mm (Phenomenex, Torrance CA) y un detector Light Scattering (PolymerLaboratories, Amherst, MA). El medio de elución fue agua pre-desgasificada (a 75°C) a un flujo de 0.3 mL/min. La corrida se llevó a cabo a una temperatura constante de 75°C y el detector se mantuvo a una temperatura de nebulización de 110°C.

### **Determinación de la viabilidad**

La viabilidad de los microorganismos se determinó mediante siembra en placa. A 10 g de muestra, se le agregaron 90 mL de agua de peptona al 1% (estéril) a temperatura ambiente. Se mezcló con licuadora hasta que se obtuvo una suspensión completa y homogénea. Se prepararon las diluciones a partir de 1 mL de la suspensión homogénea, en tubos con 9 mL de agua peptonada al 1%, y hasta una dilución final de  $1 \times 10^{-6}$ . Se sembró 0.1 mL de cada dilución en agar MRS (Man Rogossa y Sharpe) ajustado a pH de 5.2 con ácido acético 0.1N, las placas se incubaron a 37°C por 24 horas en condiciones anaerobias. Posteriormente se realizó el recuento en placa.

### **Determinación de pH en las muestras de queso**

De cada lote de queso que se elaboró, se tomaron 10 g, se homogenizaron en una licuadora marca Oster a velocidad alta durante un minuto con 50 mL de agua desionizada, para posteriormente medir el pH con un potenciómetro.

### **Determinación de grupos amino libres por el método de Ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS)**

La actividad proteolítica se determinó con la reacción con el ácido 2, 4, 6-trinitrobencensulfónico (TNBS). Se preparó un extracto de la siguiente manera: se tomó una muestra de 20 g de queso y se le agregaron 50 mL de agua desionizada, se homogenizó en licuadora marca Oster a velocidad alta durante 3 minutos, la muestra se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C, posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se filtró por papel Whatman No. 4, con vacío. Una vez filtrado, el sobrenadante se volvió a centrifugar a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido (extracto) se recuperó y se utilizó para realizar la determinación de grupos amino libres: en tubos de ensayo forrados con papel aluminio, se agregaron 0.5 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8.2 y 62.5  $\mu$ L del extracto de queso. En el caso del tubo blanco en lugar de muestra se le agregó agua desionizada. Se incorporaron 0.5 ml TNBS al 0.10% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8.2, y se agitó cada tubo en vortex. Se incubó la mezcla durante una hora a 50°C en la oscuridad. La reacción se paró

después de 60 min adicionando 2 ml de HCl 0.1N. Se leyó en espectrofotómetro a 340 nm de longitud de onda contra el blanco.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Análisis de la concentración de carbohidratos en el aguamiel

En la figura 1 se muestra el cromatograma obtenido de la caracterización de carbohidratos presentes en el aguamiel. La identificación de estos compuestos se realizó comparando los tiempos de retención contra los obtenidos de un estándar de carbohidratos.

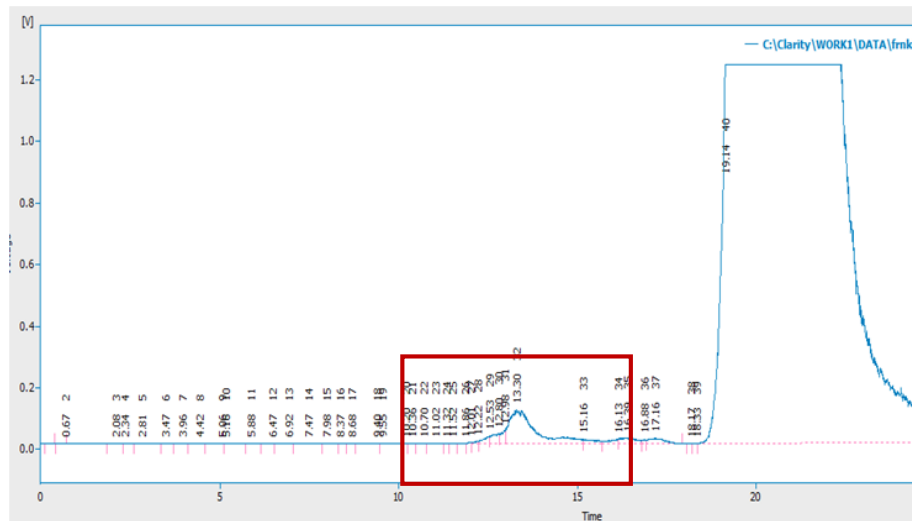


Fig. 1. Cromatograma del aguamiel para la determinación de carbohidratos por HPLC

Se observaron picos correspondientes a polisacáridos de más de dos unidades al minuto 14, los cuales presentaron una concentración baja. A los 18 minutos se observó la presencia de sacarosa, de mayor concentración entre los carbohidratos presentes en el aguamiel, lo cual concuerda con Martínez del Campo y col. (1999) quienes reportaron que la sacarosa es el carbohidrato más abundante en el aguamiel, aunque también en menor cantidad se encuentran la glucosa y la fructosa. La fracción encontrada a los 13.3 minutos, representa la presencia de polisacáridos de más de tres unidades, la cual puede corresponder a cadenas de fructooligosacáridos.

### Viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* GG durante la maduración

El queso fue inoculado con  $1 \times 10^9$  UFC/mL de probiótico. Durante la primera semana de maduración, en el queso inoculado con probiótico y prebiótico, se observó un incremento en la concentración de *Lactobacillus rhamnosus* GG, de dos ciclos logarítmicos (6.73 a 8.73 log UFC/mL). Por otro lado en el queso control (sin prebiótico), hubo un decremento en la cuenta viable correspondiente aun ciclo logarítmico (9.56 a 8.47 log UFC/mL). En ambos casos, la cuenta viable se mantuvo sin cambio significativo hasta el final de la maduración, (tabla I).

Tabla I. Viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* GG en queso tipo manchego con y sin adición de aguamiel durante un periodo de maduración de 5 semanas a una temperatura de 14 °C

Semanas		0	1	2	3	4	5
Queso con prebiótico (log UFC/mL)	con	6.73	8.73	8.45	8.53	8.70	8.72
Queso sin prebiótico (log UFC/mL)	sin	9.56	8.47	8	8.14	8	8

Se ha demostrado que el aguamiel promueve el crecimiento de las bacterias probióticas cuando es adicionado a alimentos lácteos fermentados (Ziemer y Gibson, 1998, Holzapfel y Schillinger, 2002). Esto se debe a que contiene fructooligosacaridos (FOS) los cuales le confieren características prebióticas (Rodríguez Huevo y col., 2007). Por otro lado, se ha demostrado que los quesos son mejores vehículos de probióticos, debido a factores como la disponibilidad de oxígeno y el pH del producto (Gardiner y col., 1998, Ross y col., 2002, Boylston y col., 2004, y Roy, 2005).

Adicionalmente, la muerte de probióticos en una matriz láctea, como un queso, es asociada principalmente a la falta de factores de crecimiento producidos por microorganismos iniciadores que estimulen su (Farnworth, 2008; Boylston y col., 2004).

**Evolución del pH durante la maduración**

Durante el proceso de maduración a 14 °C durante 5 semanas el pH del queso con prebiótico alcanzó un valor final de 5.9; mientras que en el queso sin prebiótico se observó un pH final de 5.7 (figura 2). El aumento de pH es originado por la liberación de compuestos con grupos amino durante la proteólisis, lo que influye indirectamente en la textura y el sabor del queso (Fox, 2003) al igual que la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, que son metabolitos secundarios generados durante la fermentación por bacterias lácticas (Corsetti et al. 1998).

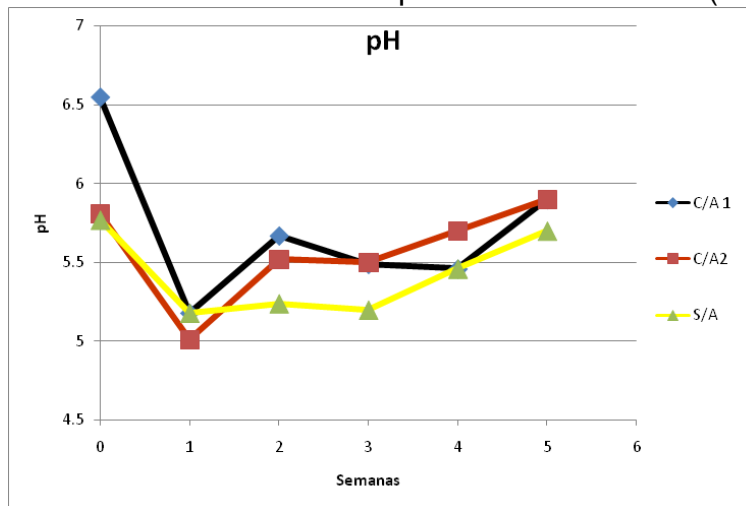


Figura 2. Cambios de pH durante la maduración del queso a 14 °C

Heller (2001) reportó que el descenso de pH disminuye la supervivencia bacteriana.

### Determinación de grupos amino libres

En la figura 3 se puede observar que en el tiempo cero hay generación de grupos amino libres en las dos muestras. Esto puede deberse a que en la leche siempre existe una cierta proporción de nitrógeno no protéico y por otro lado, la determinación se realizó después de pre-maduración con el probiótico y el prebiótico, que pudo haber dadolugar a la primera hidrólisis de proteínas. Adicionalmente, se observó una diferencia significativa entre la concentración de grupos amino libres de las dos muestras, desde tiempo cero y hasta la semana 5 de maduración. La concentración final de grupos amino libres en el queso con prebiótico fue de 8.63 mg/mL mientras que para el queso sin prebiótico fue de 7.00 mg/mL.

Esta diferencia en la concentración de grupos amino libres pudo deberse a la adición del aguamiel. Este además de contener sacarosa, tiene pequeñas concentraciones de polisacáridos que pudieran ser fructo-oligosacáridos, los cuales promueven el crecimiento del probiótico. Durante el crecimiento del microorganismo se activan las enzimas del sistema proteolítico con la consecuente liberación de grupos amino libres (Martínez del Campo, 1999).

Se ha observado que la producción de péptidos se ve influenciada por la presencia de aguamiel cuando se ha agregado a leches fermentadas (Martínez Ramírez, 2014). Este efecto no es claro cuando es agregado otro tipo de prebióticos como la inulina (Donkor, 2007).

Sousa y col (2001), Fox (2003) y McSweeney (2004) reportaron que los péptidos son transformados a otros más pequeños o incluso a aminoácidos libres por parte de las peptidasas, los cuales se van acumulando durante el proceso de maduración.

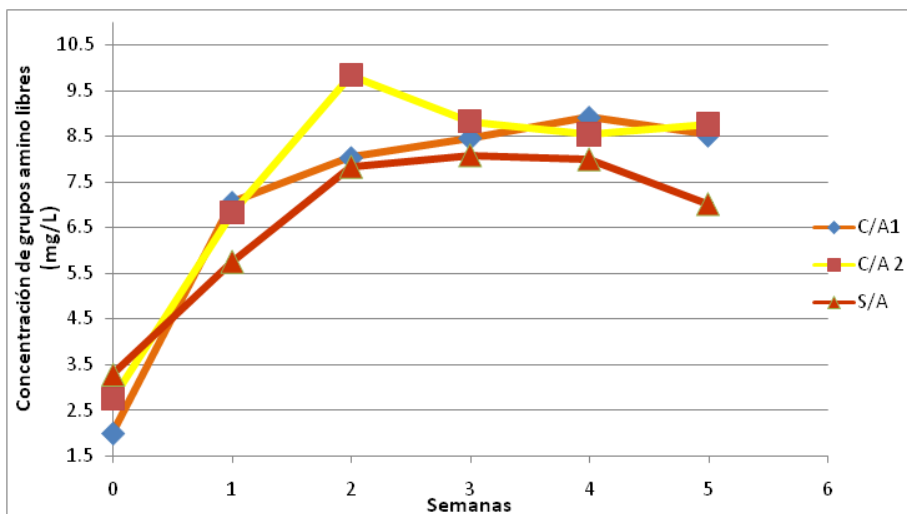


Figura 3. Grupos amino libres generados durante la maduración del simbiótico; a 14 °C

### CONCLUSIONES

A pesar de que La concentración aparente de fructooligosacáridos en el aguamiel utilizado es menor en comparación a otros pertenecientes a la misma región. Sin embargo, fue suficiente

para promover la sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus* GG y la producción de péptidos durante la maduración de un queso tipo manchego. Por otro lado, existe una relación directa entre los cambios de pH y la presencia de aminas primarias que se generan durante la maduración. Esto favorece la viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* GG.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ashwell M. Conceptos sobre Alimentos Funcionales. ILSI Europe Concise Monograph Series, ILSI Press 2005.
- Boylston T. D.; Vinderola C. G.; Ghoddusi H. B.; Reinheimer J. A. (2004) Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *Int. Dairy J.* 14: 375-387.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi J. & Damiani, P. (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology Biotechnology*, 50, 253-256.
- Donkor, O.N., Nilmini, S. L. I., Stolic, P., Vasiljevic, T., Shah, N. P., (2007). ACE- inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17, 1321-1331.
- Farnworth, E. (2008). *Handbook of Fermented Functional Foods*. Segunda Edición. CRC Press. Quebec, Canada. Pp.209-260.
- Fox, P. F. (2003). *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 1; Cheese - Biochemistry of cheese ripening (Eds.: Roginsky, H.; Fuquay, J.; Fox, P.) Academic Press, Reino Unido, pág. 320-326.
- Gardiner, G. E.; Ross, R. P.; Collins, J. K.; Fitzgerald, G.; Stanton, C. (1998). Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and environmental microbiology*, 64 (6), 2192-2199.
- González-Olivares, L. G., López-Cuellar, Z. L., Añorve-Morga, J., Franco-Fernández, M. J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., Jaimez-Ordaz, J., Rodríguez-Serrano, G. M. (2014). Viability and proteolytic capacity of *Lactobacillus bulgaricus* 2772 and *Lactobacillus rhamnosus* GG during cheese ripening. *Journal of Biosciences and Medicines*. (2), 7-12.
- Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Supplement of American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (2), 374S-379S.
- Holzappel, W. H.; Schillinger, U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35, 109-116.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Martínez del Campo-Padilla M.G. (1999). Determinación, cuantificación e hidrólisis de inulina en el aguamiel de agave pulquero "Agave Atrovirens". Tesis. Facultad de Química. UNAM. México D.F.
- Martínez Ramírez X. (2014). Estudio de la sobrevivencia de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus casei* Shirota, en una leche fermentada enriquecida con aguamiel y almacenada en refrigeración. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Química en alimentos, Pachuca, Hidalgo.
- Morelli, L. 2004. Taxonomía y fisiología de las bacterias acidolácticas. Efectos y funciones en nutrición. Instituto de Microbiología UCSC.
- McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F. (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1: General Aspects; Cap. 14.2: Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate:

introduction and overview (Ed.: Fox, P. F., McSweeney, P., Cogan, T., Guinee, T.). Academic Press, Estados Unidos, pág. 361-371.

Rodríguez-Huezo M.E., R. Durán-Lugo, L.A. Prado-Barragán, F. Cruz-Sosa, C. Lobato-Calleros, J. Alvarez-Ramírez, E.J. Vernon-Carter. (2007) Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying a storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Res. Int.* 40: 1299-1306.

Ross, R. P.; Fitzgerald, G.; Collins, K.; Stanton, C. (2002). Cheese delivering biocultures – probiotic cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 57 (2), 71-78.

Roy, D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Le Lait*, 85, 39-56.

Sanders, 1999. Probiotics. *Food Technology* 53 (11): 67-76.

Shah, N. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology* 55(11): 46-52

Ziemer, C. J.; Gibson, G. R. (1998). An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, 8, 473-479.