



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00161

Matrícula: 2143808095

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

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 11 del mes de marzo del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO  
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES  
DRA. ELIZABETH CONTRERAS LOPEZ

siendo los dos primeros asesores del alumno y lectora la tercera, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: JUAN FRANCISCO GUTIERREZ RODRIGUEZ

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar.*

Acto continuo, se comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JUAN FRANCISCO GUTIERREZ RODRIGUEZ

ALUMNO

REVISÓ  
*[Signature]*

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

*[Signature]*  
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

ASESORA

*[Signature]*  
DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO

ASESOR

*[Signature]*  
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES

LECTORA

*[Signature]*  
DRA. ELIZABETH CONTRERAS LOPEZ



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

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

Tesis que presenta

**L.Q.A. Juan Francisco Gutiérrez Rodríguez**

Para obtener el grado de

**Especialidad en Biotecnología**

**Directora de tesis**

Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano

**Asesores:**

Dr. Luis Guillermo González Olivares

**Lectora:**

Dra. Elizabeth Contreras López

México D.F., 2016



Casa abierta al tiempo



Este trabajo se realizó en conjunto con la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en el edificio de Química en Alimentos perteneciente al Área Académica de Química, en el Instituto de Ciencias Agropecuarias y la Universidad Autónoma Metropolitana

Parte de este trabajo se presentó en el XVII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos y 2do Congreso Internacional Sobre Innovación Y Tendencias en Procesamientos de Alimentos llevado a cabo en la ciudad de San Nicolás de los Garza Nuevo León en mayo del 2015.



## AGRADECIMIENTOS

Agradecer a Dios por darme la oportunidad de seguir estudiando gracias por darme a las personas más importantes de mi vida son mi tesoro y mi corazón, hablo de mi esposa Sandy y mi pequeño Moi los cuales son el motor de mi vida y mis ganas de superarme cada día. Gracias amor por todo tu apoyo amor y por estar siempre a mi lado TE AMO linda.

Gracias Dr. Memo por todo el apoyo que brindado para la realización de esta tesis. Gracias por su tiempo, consejos, por sus conocimientos y sobre todo gracias por confiar en mi sin conocerme.

A la Dra. Gabriela Rodríguez Serrano, gracias por todo su apoyo, tiempo, consejos y conocimientos otorgados en esta investigación. Gracias Dra. !!!

A la Dra. Eli por su tiempo y conocimientos, gracias porque siempre me apoyo en la realización de mi proyecto, gracias por sus consejos Dra.

Al maestro Jesús Franco por su tiempo y sus conocimientos, gracias por tener siempre la disposición para apoyarme siempre que lo necesite

*Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad  
y la energía atómica.....la voluntad. (Albert Einstein)*

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. ANTECEDENTES</b>	3
1.1 Generalidades de la leche	3
1.2 Generalidades del queso	4
1.3 Cultivos iniciadores en la maduración de un queso	5
1.4 Alimentos Funcionales	6
1.4.1 Quesos como sistemas simbióticos	7
1.5 Importancia de la proteólisis en quesos semi-madurados	9
1.6 Aguamiel	11
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	13
<b>3. HIPOTESIS</b>	14
<b>4. OBJETIVOS</b>	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos específicos	15
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	16
5.1 Obtención aguamiel	16
5.1.1 Análisis de la concentración de carbohidratos en el aguamiel	16
5.2 Preparación del cultivo madre	16
5.2.1 Elaboración de queso tipo manchego	17
5.2.2 Muestreo	18
5.2.3 Determinación de viabilidad	19
5.2.4 Determinación de carbohidratos solubles totales (Dubois)	19
5.2.5 Determinación de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)	20
5.2.6 Estudio del perfil proteolítico	21
5.2.6.1 Preparación de las muestras	21
5.2.6.2 Determinación de grupos amino libres por el método de ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS)	21

5.2.6.3 Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida(SDS-PAGE)	22
5.2.7 Prueba sensorial discriminativa (Prueba triangular)	24
5.2.7.1 Preparación y presentación de las muestras	24
5.2.8 Pruebas afectivas (Prueba de preferencia)	25
5.2.8.1 Preparación y presentación de las muestras	26
5.3 Análisis estadístico	26
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	27
6.1 Análisis de la concentración de carbohidratos en el aguamiel	27
6.2 Determinación de la viabilidad	28
6.3 Medición de pH durante la maduración del queso con prebiótico y sin prebiótico a 14 °C	29
6.4 Análisis de la concentración de azúcares totales y reductores en las muestras de queso adicionado con y sin prebiótico, madurado a 14 °C	31
6.5 Determinación de grupos amino libres por el método de ácido trinitrobencensulfónico (TNBS)	33
6.6 Estimación del peso molecular de los péptidos producidos por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	35
6.7 Prueba sensorial discriminativa (Prueba triangular)	40
6.8 Prueba sensorial afectiva (prueba de preferencia)	41
<b>7. CONCLUSIONES</b>	43
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	44
<b>9. REFERENCIAS</b>	45

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Composición general de la leche	3
Tabla 2. Viabilidad del probiótico ( <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG) en el queso tipo manchego adicionado con prebiótico a una temperatura de 14 °C de almacenamiento	28

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Reacción de azúcar ácido dinitrosalisílico	20
Figura 2. Ficha de cata utilizada en la prueba triangular	25
Figura 3. Ficha de cata utilizada en la prueba de preferencia	26
Figura 4. Determinación de carbohidratos por HPLC en el aguamiel	27
Figura 5. Cambios de pH durante la maduración del queso a 14 °C	30
Figura 6. Concentración de azúcares totales durante el proceso de Maduración	31
Figura 7. Concentración de azúcares reductores durante el proceso de maduración	32
Figura 8. Determinación de grupos amino libres	33
Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 14 °C	36
Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 14°C	36
Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 14 °C	37
Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 14 °C	38
Figura 13. Porcentaje de jueces que acertaron en la prueba triangular entre un queso simbiótico y uno probiótico	40
Figura 14. Porcentaje de la prueba de preferencia de queso simbiótico	41

## INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que mejoran de forma activa la salud de los consumidores, perfeccionando el balance de la microflora del intestino al ser ingeridos vivos y en cantidades suficientes, es decir, que deben alcanzar hasta  $10^6$  a  $10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC) (Sanders, 1999). Las bacterias más estudiadas como probióticos son los lactobacilos y las bifidobacterias. Durante la última década, los alimentos adicionados con probióticos han adquirido gran importancia debido a que se les han atribuido beneficios a la salud del ser humano. Estos beneficios van desde la activación del sistema inmunitario hasta mecanismos que contrarrestan las diarreas asociadas a antibióticos (Morelli, 2004).

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

Un alimento que contiene tanto al probiótico como al prebiótico se ha definido como simbiótico (Sanders, 1999). Los alimentos simbióticos están destinados a aumentar la supervivencia de las bacterias probióticas. Este término debe reservarse exclusivamente para los productos que poseen verificación científica de la simbiosis, es decir en los cuales los prebióticos favorecen selectivamente a los probióticos (Ashwell, 2005).

En este sentido, los quesos tienen la potencialidad de ser alimentos simbióticos. Los cultivos iniciadores para la maduración de un queso, generalmente son bacterias lácticas que pueden tener características probióticas. Sin embargo, muchos de estos microorganismos no sobreviven debido al estrés que se genera por la presencia de sales y por las temperaturas de almacenamiento. Por ello, para asegurar que la cantidad de probióticos sea la adecuada en el momento del consumo, se han elaborado quesos inoculados con altas concentraciones de

microorganismos, modificando los procesos de fabricación de tal manera que se favorezca su sobrevivencia (Farnworth, 2008).

Así que, los quesos suelen ser matrices más adecuadas para favorecer la sobrevivencia y el crecimiento de bacterias probióticas debido a la baja movilidad del oxígeno en el medio. Sin embargo, la adición de una fuente prebiótica genera las condiciones adecuadas para estimular este crecimiento selectivo (González-Olivares *et al.*, 2014).

En este trabajo el objetivo fue determinar la capacidad proteolítica y la sobrevivencia de un probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* GG) cuando se encuentra en interacción directa con un prebiótico (aguamiel) durante la maduración de un queso tipo manchego.

## 1. Antecedentes

### 1.1 Generalidades de la leche

La leche se define como el producto íntegro del ordeño completo e ininterrumpido de una hembra sana, bien alimentada y no fatigada; debe ser recogida higiénicamente y no debe contener calostro (Veisseyre, 1988).

Desde un punto de vista fisicoquímico, la leche es un sistema coloidal constituido por tres fases fisicoquímicas bien definidas: una fase dispersante acuosa y dos fases dispersas; la primera de la grasa butírica, la segunda de proteínas.

Este alimento ha acompañado al hombre desde hace miles de años. Actualmente la leche se puede obtener de animales de diferentes especies que se explotan para autoconsumo; entre ellas tenemos a la vaca, la cabra, la oveja, etc.

Algunos componentes de la leche están presentes en cantidad diferentes y por lo tanto pueden determinarse con mayor o menor facilidad. En la tabla numero1 se muestra la composición general de la leche en porcentaje. El componente mayoritario es el agua; y el segundo en importancia son los carbohidratos como la lactosa.

**Tabla 1. Composición general de la leche**

<b>Componentes mayoritarios</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Agua	86.9
Materia grasa	3.9
Proteínas y	3.2
Carbohidratos	5.1
Sustancias minerales	0.9

Fuente: Amiot, 1991

## 1.2 Generalidades del queso

El queso es el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, que resulta de la coagulación de la leche natural (entera), de la desnatada total o parcialmente, de la nata, del suero de mantequilla, o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, seguida del desuerado del coágulo obtenido. Este coágulo, llamado cuajada, está esencialmente constituido de un gel de caseína que retiene la materia grasa y una porción más o menos importante de la parte acuosa de la leche, el lactosuero y en el que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche. La cuajada puede ser consumida como tal bajo la categoría de queso fresco o sufrir una maduración que la llevará a una serie de transformaciones especialmente enzimáticas, que la hacen adquirir características organolépticas específicas, constituyendo el queso maduro (Chamorro y Losada, 2002).

Los pasos fundamentales para su elaboración incluyen la coagulación de la leche, el cortado del coágulo, la eliminación del suero, el salado, prensado y maduración (Badui, 2010).

Alrededor del mundo existen 1,000 variedades de quesos donde las diferencias de textura, sabor y aroma se deben a factores como (Mayer y Kirchner, 2010):

- El tipo de leche: vaca, cabra oveja, búfala, etc.
- Calidad de la leche: pasteurizada, cruda, etc.
- Relación de concentraciones grasa-proteína.
- Tipos de microorganismos y enzimas añadidos
- Velocidad e intensidad del desarrollo de la acidez
- Tipo y concentración de la enzima coagulante
- Grado y forma de deshidratación del gránulo
- Condiciones de maduración

Existe una gran variedad de quesos generalmente se identifican las siguientes clases: frescos no madurados, de pasta blanda, pasta firme, pasta dura y finalmente los procesados o fundidos.

Este último tipo de queso se caracteriza por ser de pasta prensada y llevar un proceso de maduración durante cierto tiempo. La cuajada se obtiene por coagulación enzimática. La acidificación de este tipo de queso se lleva a cabo en la cuajada, durante el cuajado y el inicio de la maduración. Este tipo de quesos pueden conservarse durante tiempos prolongados (Mayer y Kirchner, 2010).

### 1.3 Cultivos iniciadores en la maduración de un queso

La función principal de las bacterias lácticas (cultivos iniciadores) es la producción de ácido láctico a partir de la lactosa. El ácido láctico promueve la formación y el desuerado de la cuajada, además evita que crezcan en ella microorganismos patógenos debido a que disminuye el pH a 5.0-4.2 y le confiere sabor ácido.

Los cultivos iniciadores también dan lugar a las sustancias responsables del aroma y contribuyen a la maduración mediante la proteólisis (ruptura de proteínas) y la lipólisis (ruptura de las grasas).

El cultivo iniciador que se utiliza depende del tipo de queso que se va a elaborar. Si el queso es de pasta blanda se usan cultivos de acidificación rápida, como *Lactococcus lactis*, subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis*, subsp. *cremoris*. Para obtener quesos de pasta dura y firme, se utilizan cultivos con buena capacidad proteolítica y lenta producción de ácido, como es el caso de *Lactobacillus casei* y *Leuconostoc citrovorum*.

Para otras variedades de quesos se inoculan otros microorganismos como:

- **Mohos:** se adicionan en quesos madurados superficialmente (*Penicillium camemberti*) y en los de pasta azul (*Penicillium roqueforti*).

- **Bacterias propiónicas:** son productoras de ácido propiónico y CO<sub>2</sub>, son responsables de la formación de “ojos” en quesos como el Gruyere.

Por otro lado, se ha evaluado la sobrevivencia de bacterias probióticas con cultivos iniciadores durante la elaboración de quesos madurados y semimadurados como es el caso de queso Cheddar (Folkertsma *et al.*, 1996; Phillips *et al.*, 2006; Ong y Shah, 2009), queso Gouda (Gomes *et al.*, 1995), queso Festivo (Ryhanen *et al.*, 2001) y queso Pategrás Argentino (Bergamini *et al.*, 2009). Estos estudios han demostrado que los quesos tienen gran potencial de ser un transportador de bacterias probióticas al consumidor. El alto contenido de grasa, el pH, y la matriz sólida del queso, podrían proteger a la bacteria eficientemente durante el almacenamiento y su tránsito a través del tracto intestinal (Bergamini *et al.*, 2006).

Varios estudios han mostrado la baja supervivencia de los microorganismos probióticos durante la maduración del queso o sus efectos adversos en el sabor, pero la adición de los probióticos como complementos junto con un cultivo iniciador ha tenido éxito en la elaboración de algunos quesos madurados (Phillips *et al.*, 2006; Poveda, 2003; Lynch *et al.*, 1997). Además de la adición de los probióticos como cultivo secundario o complementario se han explorado diferentes alternativas para mejorar la supervivencia de los microorganismos probióticos, como es la microencapsulación y la aplicación de factores estimulantes de crecimiento (Farnworth, 2008).

La mayoría de las publicaciones referentes a la incorporación de bacterias probióticas en los quesos se han centrado sólo en su viabilidad durante la fabricación y almacenamiento y sólo unos pocos estudios han evaluado la viabilidad de los probióticos durante la maduración del queso.

#### **1.4 Alimentos Funcionales**

En años recientes se ha registrado un incremento en el cuidado que tienen los consumidores por la calidad final de un producto, esta es una suma de atributos, tanto intrínsecos (sabor y aroma, vida útil, textura, aporte nutricional,

seguridad, etc.) y extrínsecos (uso de pesticidas y organismos genéticamente modificados, el tipo de material de empaque, etc.) de los alimentos que ingieren. Esto debido, probablemente, al progreso de las grandes ciudades y al mayor acceso a la información de la que se dispone a través del internet. (Linnemann *et al.*, 2006)

El primer objetivo de comer es satisfacer las necesidades de nutrición de cada persona (Peri, 2006). Sin embargo, recientemente el interés de los consumidores se ha extendido a la búsqueda de beneficios extra sobre la salud, más allá del aporte básico nutricional de cada alimento. Estas características son las que definen a los denominados alimentos funcionales, que son aquellos productos que además de proveer un aporte nutricional, generan un beneficio en el consumidor, ya sea promoviendo el bienestar y la salud, o disminuyendo el riesgo de una enfermedad (Spence, 2006).

#### **1.4.1 Quesos como sistemas simbióticos**

En la industria alimentaria los alimentos que mayormente se han utilizado como vehículo de probióticos son las leches fermentadas. Sin embargo, el queso podría ser el mejor vehículo para estos microorganismos ya que contiene una mayor capacidad amortiguadora, mayor exclusión del oxígeno y mayor contenido graso, lo que favorecería la resistencia y supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento (Boza *et al.*, 2010).

Numerosos tipos de quesos presentan ventajas como soporte de las bacterias probióticas con respecto a las leches fermentadas, debido fundamentalmente a su composición. En primer lugar, el pH de los quesos, que se encuentra con frecuencia entre 4.8 y 5.6, es mayor que el de las leches fermentadas (3.7 a 4.3), lo que permite un medio más favorable y más estable para la supervivencia de probióticos, sobre todo de aquellas cepas con baja tolerancia ácida (Boylston *et al.*, 2004). Además, la matriz del queso y su contenido de materia grasa relativamente alto generan un ambiente protector frente a los factores extrínsecos que afectan el crecimiento microbiano (Gardiner *et al.*, 1998).

Las bacterias microaerófilas, encuentran un ambiente con bajas concentraciones de oxígeno al interior del queso, en parte debido al metabolismo de las bacterias (Boylston *et al.*, 2004, Roy, 2005). Por otro lado, los productos de la proteólisis que podemos encontrar durante la elaboración y maduración del queso son péptidos medianos y pequeños, que han sido estudiados como promotores del crecimiento de ciertos probióticos (Boylston *et al.*, 2004).

Con todas estas características, el queso ha sido propuesto como un alimento eficaz para proteger la viabilidad probiótica, no solo durante la elaboración y maduración del producto durante largos periodos, sino también durante el paso del tracto gastrointestinal (TGI) (Rosset *et al.*, 2002).

Gardiner *et al.*, (1998), emplearon una cepa de *Lactobacillus paracasei* como cultivo probiótico en queso Cheddar. Los autores encontraron un incremento en la población del probiótico de  $1.7 \times 10^5$  UFC/mL hasta  $2.9 \times 10^8$  UFC/mL durante los primeros 3 meses de maduración a 8°C, después de esto el recuento del probiótico se mantuvo estable.

Una ventaja que tiene los quesos contra las tradicionales leches fermentadas, es que este tipo de productos tienen periodos de vida útil más prolongados, los cuales pueden variar dependiendo del tipo de queso (fresco, blando, semiduro o duro) (Heller *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta esta característica, el desarrollo de quesos probióticos debe garantizar el mantenimiento de la viabilidad de la bacteriaprobiótica durante todo el período de maduración o vida útil del alimento (Ross *et al.*, 2002). Además, se tiene que considerar que la actividad bioquímica de los probióticos agregados al queso influya negativamente en la composición, *flavour*, textura y otras características sensoriales del producto típico (Boylston *et al.*, 2004).

Finalmente, los quesos frescos y los semi-madurados, podrían constituir una alternativa a la fabricación de quesos madurados con probióticos, ya que su contenido de sal y materia grasa pueden ser modulados con relativa facilidad. El desarrollo de quesos probióticos resulta una propuesta con grandes perspectivas,

sobre todo en los países en los que el consumo de leches fermentadas es poco popular o bien para el consumo por personas intolerantes a la lactosa (Helleret *al.*, 2003).

### **1.5 Importancia de la proteólisis en quesos semi-madurados**

La proteólisis es el fenómeno bioquímico más importante que tiene lugar durante la maduración de las diferentes variedades de queso, ya que no solo tiene implicaciones en el sabor, sino también en su aspecto y textura (Law y Haandrikman, 1997).

Mientras que la coagulación de la leche se da por la acción de la enzima quimosina que actúa sobre la  $\kappa$ -caseína, la hidrólisis de las proteínas durante el proceso de maduración depende de la actividad de varias enzimas proteolíticas y peptidásicas de origen diverso. Dentro de estas se encuentran las péptidasas que provienen de las bacterias ácido lácticas incorporadas para la acidificación de la leche y maduración del queso; las proteasas naturales de la leche, como la plasmina y la catepsina D; las exoenzimas producidas por bacterias psicrótrofas durante el almacenamiento de la leche en refrigeración y las enzimas de las bacterias lácticas contaminantes.

La proteólisis que tiene lugar en la maduración del queso, implica en primer lugar la conversión de las caseínas en péptidos de gran tamaño. Estos péptidos después son hidrolizados en productos de peso molecular más pequeños. La proteólisis primaria en el queso ha sido definida como los cambios en las caseínas  $\alpha$ -s,  $\beta$  y  $\kappa$ , que pueden detectarse por electroforesis en gel. Los productos de la proteólisis secundaria son péptidos y aminoácidos solubles en la fase acuosa del queso (Early, 2000).

Se ha reportado que en las primeras etapas del proceso de maduración, la caseína  $\alpha$ -s<sub>1</sub> se rompe por la acción del cuajo en el enlace 24/25. Posteriormente, esta fracción también se hidroliza en varios péptidos de 6 restos de aminoácidos. La proporción de caseína  $\alpha$ -s<sub>1</sub> que se degrada tiene una influencia determinante sobre la textura del queso. La cuajada fresca es el “esqueleto” de la matriz

protéica del queso y determina sus propiedades estructurales; conforme ésta red protéica se va degradando, se van modificando las características reológicas del queso (Early, 2000).

Las proteasas y las peptidasas de los cultivos iniciadores intervienen en la fase secundaria de la proteólisis, liberando péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos, que contribuyen al aroma genérico del queso. Las enzimas van siendo liberadas en el interior de la cuajada conforme las células mueren y se lisan durante la maduración (Alais,1998).

Sí la proteólisis primaria es excesiva, aparecen aromas y sabores extraños, como el amargor. Los péptidos amargos contienen una gran proporción de aminoácidos hidrofóbicos como leucina, prolina y fenilalanina.

La degradación de la matriz proteica, y la formación de nuevos grupos amino y carboxilo (ionizados al pH del queso) determinan la interacción proteína-agua e influyen en la textura del queso maduro. Asimismo, el aumento de pH originado por la liberación de amoníaco durante la proteólisis influye indirectamente en la textura. Por otro lado, la producción de péptidos cortos y aminoácidos libres, algunos de los cuales presentan sabor característico, son importantes en el *flavor* del producto, participando sobre todo en el sabor de fondo del queso (Bergamini, 2006).

En los últimos años ha habido mucho interés en la identificación de los péptidos producidos por la proteólisis en los quesos, y su relación con la acción de proteasas específicas de las bacterias lácticas. Varios estudios han reflejado la presencia de péptidos con actividades biológicas en quesos (Gouldsworthy *et al.*, 1996; Ryhanen *et al.*,2001; Pritchard *et al.*,2010). Entre los diferentes tipos de péptidos bioactivos se encuentran los antitrombóticos, inmunoestimuladores, opioides, antimicrobianos y los antihipertensivos (Saito *et al.*,2000; Gómez-Ruiz *et al.*,2004; Ong y Shah, 2008; Gómez-Ruiz *et al.*,2002).

Los péptidos antihipertensivos o péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) han sido ampliamente estudiados debido a la búsqueda de

alternativas que ayuden a disminuir los numerosos casos de hipertensión arterial, la cual es considerada una de las enfermedades crónicas más serias. Estos estudios muestran que la actividad inhibitoria de la ECA a lo largo de la maduración de los quesos se incrementa, porque se ha demostrado que existe una relación con el grado de proteólisis. Ryhanen *et al.*, (2001) demostraron que la actividad inhibitoria de la ECA se incrementó durante la maduración de un queso Festivo y disminuyó cuando la proteólisis excedió un cierto nivel. Gómez-Ruiz *et al.*,(2002) estudiaron los péptidos con actividad inhibitoria de la ECA en queso Manchego y encontraron que la actividad disminuyó en los primeros 4 meses y hubo una actividad máxima a los 8 meses y con una nueva disminución a los 12 meses. González-Olivares *et al.*,(2014), determinaron que la capacidad proteolítica se ve aumentada cuando se tiene un microorganismo probiótico, en combinación con una bacteria no probiótica, en un queso madurado por 4 semanas.

## 1.6 Aguamiel

A lo largo de la historia en México el agave ha tenido usos alimentarios, religiosos, textiles e incluso en la construcción. Su utilidad como alimento ha permitido elaborar una variada gama de bebidas alcohólicas como el mezcal, el sotol, bacanora, pulque y tequila. Del agave también se extrae el aguamiel, el cual es obtenido de lo que se conoce comúnmente como “piñas” que se pueden utilizar frescas o cocidas y de éste líquido se pueden obtener polisacáridos, fructanos, jarabe de alto contenido de fructosa, biocombustibles y compuestos de Maillard (Narváez *et al.*,2009)

El aguamiel es incoloro, dulce y de sabor agradable, además de contener agua contiene glucosa, sacarosa, fructosa (26.5%, 8.8% y 32.4% respectivamente p/p en base a materia seca) además de gomas, proteínas, minerales, vitaminas y microorganismos benéficos como *Kluyveromyces marxianus* entre otros. La inulina alcanza el 11% de peso seco (Tovar *et al.*,2011). Recientemente se ha demostrado que posee fructooligosacáridos (FOS) presentando interesantes características prebióticas (Rodríguez *et al.*, 2007).

En el aguamiel, los principales polímeros son los FOS, cuya estructura y peso molecular depende de la especie de agave. En México existen diversas especies de agaves, los cuales han desarrollado algunas adaptaciones morfológicas y fisiológicas para sobrevivir, una de estas adaptaciones fisiológicas es el uso del metabolismo ácido, donde el principal producto son los fructanos o fructooligosacáridos, que son de naturaleza glucosídica, de interés benéfico a la salud como prebiótico y fibra soluble, así como sus propiedades funcionales. Es por ello que el aprovechamiento integral del aguamiel, tiene por si solo un valor intrínseco que le confiere las características esenciales para su uso como fuente de carbono en medios de cultivo de bacterias lácticas, tanto para su conservación en el caso de probióticos, como para la inducción de producción de enzimas y metabolitos secundarios (Rodríguez *et al.*, 2007).

## 2. Justificación

El estilo de vida que hoy en día llevan las personas y el consumo excesivo de antibióticos, son algunos de los factores que han hecho que la demanda de alimentos funcionales se incremente. Dentro de estos alimentos funcionales se encuentran los alimentos llamados simbióticos, los cuales están elaborados con una mezcla de probióticos y prebióticos.

En estos últimos años los probióticos han cobrado una gran importancia, ya que su consumo tiene efectos positivos para la salud cuando logran colonizar el tracto gastrointestinal. Es por esta razón, que la industria alimentaria busca procesos para que los microorganismos probióticos no pierdan viabilidad tanto en la producción como al momento de la digestión y logren llegar en la concentración recomendada para la colonización del sistema digestivo ( $1 \times 10^6$ ).

Para que los probióticos logren sobrevivir a los procesos de elaboración se han empleado diversas técnicas tales como la incursión de sustancias prebióticas, que ayuden a su multiplicación y a mantener la viabilidad justo antes del consumo. Es por ello que el objetivo de este trabajo es estudiar la sobrevivencia y el perfil proteolítico de *Lactobacillus rhamnosus* GG durante la maduración de un queso a fin de determinar el efecto que ejerce el aguamiel, como prebiótico, sobre el microorganismo.

### **3. Hipótesis**

La viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* GG y la proteólisis, durante la maduración de un queso se ve inducida por la adición de aguamiel como fuente de carbono.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Estudiar el perfil proteolítico y sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus* GG durante la maduración de un queso para determinar el efecto que ejerce el aguamiel, como prebiótico, sobre el microorganismo probiótico.

### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de fructooligosacáridos de una muestra de aguamiel, por medio de HPLC.
- Determinar la concentración de azúcares totales y de reductores a través de análisis espectrofotométricos.
- Elaborar un queso inoculado con *Lactobacillus rhamnosus* GG y adicionado con aguamiel para madurarlo por 4 semanas.
- Determinar la viabilidad de la bacteria probiótica durante la etapa de maduración, por medio del recuento en placa.
- Estudiar el perfil de péptidos durante la maduración, por medio del análisis de grupos amino libres y electroforesis en gel de poliacríamida.
- Realizar una prueba sensorial afectiva para determinar el nivel de agrado del queso simbiótico madurado.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

La fase experimental se llevó a cabo en el edificio de Química en Alimentos perteneciente al Área Académica de Química, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, ubicada en las instalaciones del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería (ICBI).

### 5.1 Obtención del aguamiel

El aguamiel se obtuvo del raspado de tres magueyes de un campo de Tlapacoya, Hidalgo, perteneciente a un productor de pulque artesanal. El raspado se realizó a las 6 de la mañana, hora del primer raspado de maguey por parte del productor de pulque. Se almacenó en botellas de plástico asépticas de 4 L de capacidad. Para evitar la producción de alcohol debido a la fermentación de la flora nativa, se mantuvo en refrigeración durante su transporte.

#### 5.1.1 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 0.3mL/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.

### 5.2 Preparación del cultivo madre

Se trabajó con una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* GG de la colección de microorganismos del laboratorio de Biotecnología Alimentaria del departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa (UAM-I).

Para la preparación del cultivo madre, el microorganismo se propagó en caldo

MRS (Difco). Se tomó una asada de cultivo puro y se inoculó en un tubo de ensayo que contenía 10 mL del caldo MRS. *L. rhamnosus*GG se incubó a 37 °C por 24 hrs. Al final se realizó tinción de Gram para comprobar la pureza del inóculo.

*Lactobacillus rhamnosus* GG se propagó en tubos con 10 mL de leche descremada (Svelty, Nestlé) al 10 %. La leche se pasteurizó a 90 °C por 10 min. Se tomó una asada de los tubos de MRS (Difco) y se inoculó en la solución de leche descremada al 10 %. Las condiciones de incubación fueron las mismas que las utilizadas para el cultivo madre y se realizó tinción de Gram al final de la incubación. Debido a que se tenía que inocular  $1 \times 10^9$  UFC/mL se realizó la cuenta total de microorganismos. Se prepararon tubos de agua peptonada (Difco) y cajas con 15 mL de agar MRS (Difco). Todos los medios de cultivo se prepararon según instrucciones del fabricante. Para preparar las diluciones, se tomó 1 mL de los tubos de leche con cultivo propagado y se colocó en 9 mL con agua peptonada (Difco). De este tubo se hicieron diluciones sucesivas hasta  $1 \times 10^9$ . Se colocaron 0.1 mL de cada tubo en una caja de Petri, y se extendieron. Las cajas de Petri se incubaron de manera invertida, de acuerdo a las condiciones dadas en la primera propagación. Al final de la incubación se realizó la cuenta viable.

Finalmente, se prepararon 800 mL de una solución de leche (Svelty, Nestlé ®) al 10 % en dos matraces Erlenmeyer de 1 L, para *L. rhamnosus* GG. Los matraces para la leche se pasteurizaron a 90 °C por 10 min. Cada matraz se inoculó con  $1 \times 10^9$  UFC/mL del microorganismo correspondiente. Los matraces se incubaron en las mismas condiciones de tiempo y temperatura que en la propagación. Al final de la incubación se comprobó la pureza de los cultivos madre por tinción de Gram. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 4 °C, hasta su utilización.

### **5.2.1 Elaboración de queso tipo manchego**

Los quesos se elaboraron en el laboratorio de Lácteos del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp) perteneciente a la Universidad Autónoma del

Estado de Hidalgo.

Se adquirieron 50 L de leche pasteurizada de la empresa PROUNILAC, perteneciente a la UAEH. Se realizó el análisis fisicoquímico (grasa, proteína, temperatura, pH y conductividad) de la leche por medio de un analizador de leche (Lactoscan MCC). De acuerdo al análisis, la leche se estandarizó a un 3.6 % de grasa por medio de una descremadora (Elecrem 315L). Después de la estandarización se separaron 30 L de leche para inocular al 1 % con cultivo de *L. rhamnosus* GG y el 2% de prebiótico (aguamiel); de igual manera 20 L de leche se inocularon al 1 % únicamente con la bacteria probiótica (queso control). La leche se llevó a 36 °C antes de la adición de los respectivos cultivos. Para llevar a cabo la premaduración, se mantuvo la temperatura de 36 °C a 37 °C, durante aproximadamente 30 a 40 min hasta llegar a 18.5 °D. Cuando se alcanzó la acidez requerida se agregó 7.2 % (v/v) de cuajo (Fromase fuerza 1: 1 0000). Se dejó en reposo durante 1 h para permitir la floculación total de las caseínas. Al término de este tiempo se cortó la cuajada con liras de 1 cm. Se agitó constantemente sin calor durante 40 min para estimular la salida de suero y alcanzar 11.5 °D. Cuando se alcanzó la acidez de esta etapa, se desueró la cuajada y se depositó en moldes de 1 kg revestidos con tela de manta. Las unidades de queso se prensaron (peso promedio de 3 kg/cm<sup>2</sup>) durante 2 h y se voltearon para continuar el prensado en las mismas condiciones durante 24 h más. Al término del prensado los quesos se desmoldaron y se envasaron a vacío (MultivacC100) y se almacenaron durante cuatro semanas de la siguiente forma, 10 quesos inoculados con el probiótico y el prebiótico, y siete quesos inoculados solo con el probiótico. Los quesos se almacenar en una cámara de maduración a 14°C.

### 5.2.2 Muestreo

Se tomaron muestras de queso (en condiciones asépticas) los días 0,7, 14, 21, 28 y 35 en condiciones estériles y cada análisis se realizó por duplicado. Para la determinación de cuenta viable se tomaron 10 g de queso y se colocaron en

bolsas estériles. Para cuantificar los grupos amino libre y el estudio del perfil proteolítico se tomaron 20 g de queso y se colocaron en frascos de muestreo. Al final de cada muestreo los quesos se envasaron de nuevo a vacío (condiciones asépticas) y se regresaron a las condiciones de almacenado.

### 5.2.3 Determinación de viabilidad

Se adicionaron a la muestra a temperatura ambiente, 9 mL de agua peptona estéril (Difco) al 1%. Se homogenizó durante 3 min hasta que se obtuvo una suspensión completa y homogénea. Se diluyó 1 mL de la mezcla homogénea en un tubo con 9 mL de agua peptonada y se realizaron las diluciones subsecuentes hasta una dilución final de  $1 \times 10^{-6}$ . Se tomaron 100  $\mu$ L de cada dilución y se depositaron en cajas de Petri con agar MRS (Difco) ajustado a un pH 5.20 con ácido acético 0.1 N, para que solo creciera *Lactobacillus rhamnosus* GG. Se incubaron las cajas a 37 °C, en condiciones anaerobias durante 72 h. Se realizó el recuento en placa para cada prueba y se realizaron los cálculos correspondientes.

### 5.2.4 Determinación de carbohidratos solubles totales (Dubois)

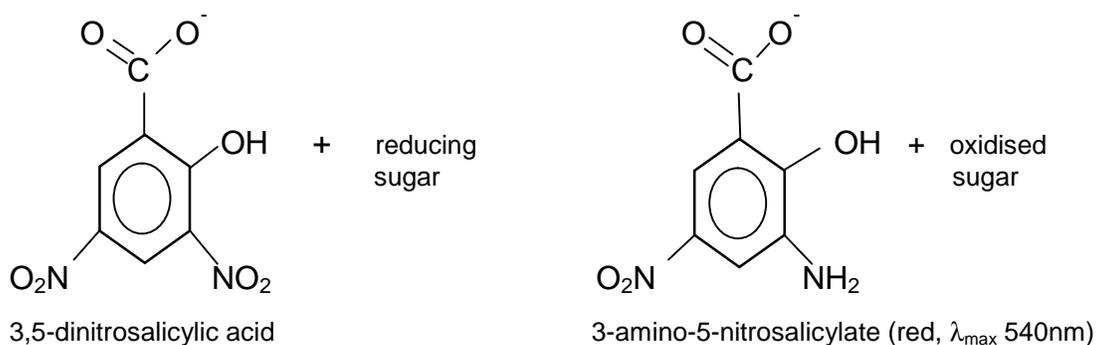
Todos los azúcares se deshidratan con ácido sulfúrico concentrado formando furfurales o alguno de sus derivados, a los que a su vez se condensan con fenoles presentes en la mezcla de reacción para dar compuestos de color naranja amarillento cuya intensidad se mide espectrofotométricamente.

1. Se construyó una curva estándar de fructosa a partir de solución de 100  $\mu$ g/ml concentración. Se pesaron 100 mg de azúcar y se disolvieron en agua destilada aforando posteriormente, a un volumen de 1000 ml. Las concentraciones de la curva patrón fueron de 0 a 100  $\mu$ g/ml con intervalos de 20  $\mu$ g/ml.
2. A cada uno de los tubos con las soluciones estándar se les adicionó 1.0 ml de solución de fenol al 5% (p/v). Se mezclaron los tubos y se dejaron reposar por 10 min.

3. Inmediatamente después se le agregaron cuidadosamente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Los tubos se mezclaron perfectamente y se dejaron reposar por 10 min.
4. Se midió la absorbancia a 490 nm. A partir de esta curva se interpolaron las absorbancias determinadas en las muestras y se determinó la concentración de azúcar tomando en cuenta el factor de dilución.

### 5.2.5 Determinación de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)

Se realizó el análisis de la concentración de azúcares reductores, por el método DNS para la muestra de aguamiel. Un método en el cual por disolución alcalina el azúcar se hidroliza produciendo un compuesto que reduce a un grupo nitro del DNS, para dar el producto monoamino correspondiente. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



**Figura 1. Reacción de azúcar ácido dinitrosalisílico. (Fuente: Casablanca, et al., 2009)**

1. Se construyó una curva patrón a partir de la solución patrón de glucosa a una concentración de 1.0 g/L.
2. Se prepararon 10 tubos con diferentes concentraciones. A cada uno de los tubos, se le adicionó 1mL del reactivo DNS y se agitaron con vórtex.

3. Se pusieron en un baño María durante 15 minutos, se dejaron enfriar y se agregaron 8mL de agua destilada. La curva se realizó por triplicado

Utilizando como blanco una solución de agua con el reactivo DNS, se determinó la absorbancia de cada tubo a 540 nm

### **5.2.6 Estudio del perfil proteolítico**

Para caracterizar el perfil proteolítico del queso durante la maduración se realizaron dos estudios diferentes. El primer estudio fue la determinación de grupos amino libres con la finalidad de conocer la concentración de los péptidos producidos por la técnica de TNBS. El segundo estudio consistió en la separación de péptidos por peso molecular por medio de la electroforesis en gel de poliacrilamida.

#### **5.2.6.1 Preparación de las muestras**

Para realizar los análisis del perfil proteolítico, las muestras se prepararon de la siguiente manera:

- a) Se agregaron 50 mL de agua desionizada a cada muestra y se homogenizaron en licuadora marca Oster a velocidad alta, durante un minuto.
- b) Se colocaron 10 mL de la muestra homogenizada en tubos de centrifuga. Se colocaron en una centrifuga (HERMLE Labnet) a 5,000 rpm durante 5 min a 4°C. Posteriormente se filtraron en papel Whatrnan no. 4 a vacío y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 5,000 rpm, durante 10 min a 4 °C.
- c) Los sobrenadantes se almacenaron en tubos de ensayo a -18 °C, hasta su utilización.

#### **5.2.6.2 Determinación de grupos amino libres por el método del ácido Trinitrobencensulfónico (TNBS)**

La actividad proteolítica se midió con el ácido 2,4,6–trinitrobencensulfónico TNBS, para lo cual se tomó una muestra de 20 g de queso y se le agregaron 50 ml

de agua desionizada, se mezcló durante 3 minutos, la muestra se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se filtraron con papel filtro a vacío y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C.

Se agregó 0.5 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8.2 en tubos de ensayo forrados con papel aluminio y 62.5 ml. En el caso del tubo blanco en lugar de muestra se le agregó agua desionizada. Se incorporó 0.5 ml TNBS al 0.10% en amortiguadora de fosfatos 0.21 M pH 8.2, y se agitó cada tubo en vortex. Se incubo la mezcla durante 1 hr a 50°C en la oscuridad. La reacción se paró después de 60 min adicionando 2 ml de HCl 0.1N. Se leyó en un espectrofotometro a 340 nm de longitud de onda contra el blanco.

### **5.2.6.3 Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Para observar el perfil de péptidos durante el almacenamiento, se realizó la separación por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se tomaron 40 µL de las muestras centrifugadas y se colocaron en tubos Eppendorf. A cada tubo Eppendorf se le añadieron 20 µL de buffer de colorante y 3 µL de -mercaptoetanol. Los tubos se calentaron a 100°C a baño maría durante 5 minutos. La preparación del estándar se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por BIORAD®. En un tubo Eppendorf se colocaron 4 µL de estándar amplio espectro de BIO-RAD, 20 µL de buffer Tris-HCl pH 6.8, 20µL de buffer colorante, 20 µL de agua desionizada y 3 µL de -mercapto-etanol. El estándar se calentó a 100°C abañó María durante 5 minutos. Posteriormente se continuó con el siguiente protocolo para la preparación de los geles de electroforesis y la separación de los péptidos:

1. En un matraz kitazato, se colocó un volumen total de 9 mL de una solución base de acrilamida al 30%, 160 µL de SDS al 1% y 4.5 mL de buffer 8.8Tris-HCl, para preparar un gel de separación de 15% de T. Dicha solución se desgasificó durante 15 minutos con agitación suave. Se agregaron al finalizar la agitación, 50 µL de persulfatode sodio al 10% y 5µL

de TEMED. Se vació la mezcla de manera inmediata hasta llenar 3/5 partes de la altura total de los cristales, correspondiente a 4.5 cm. Se agregaron 2 mL de agua desionizada para asentar los geles durante el proceso de polimerización. Se dejó polimerizar la solución durante 2 horas y 30 minutos.

2. Al finalizar la polimerización del gel de separación, se preparó el gel de concentración. Se agregaron 0.53 mL de la misma solución base de acrilamida al 30%, 80  $\mu$ L de SDS al 10% y 3.47 mL buffer Tris-HCl pH 6.8. La solución se desgasificó por 15 minutos en las mismas condiciones de la solución del gel de separación. Al final de la desgasificación, se adicionaron 25  $\mu$ L de persulfato en buffer Tris-HCl pH 6.8 y 5  $\mu$ L de TEMED. La solución se vació inmediatamente sobre el gel de separación. Se colocaron los peines para formar los carriles. Se dejó polimerizar durante 2 horas.
3. Una vez polimerizados ambos geles, se instaló el equipo de electroforesis (mini-PROTEAN III tetra system) en baño de hielo para realizar la separación.
4. En cada carril de los geles se inyectaron 15 a 20  $\mu$ L de las muestras preparadas previamente, dejando un espacio entre estas y el carril donde se inyectó el estándar de peso molecular conocido.
5. Se llenó la cámara del equipo de electroforesis con buffer de separación Tris-Glicina-SDS, pH 8.3.
6. Las muestras se corrieron durante 90 minutos aproximadamente, a 200 V hasta que el frente de migración de las bandas llegó casi al final del gel de separación.
7. Una vez concluida la separación, se fijaron los péptidos con una solución de ácido acético al 7.5% (%v/v) durante 45 minutos con agitación suave.
8. Los geles se sumergieron en una solución de tinte con azul de Coomassie G250 durante 10 horas, para después desteñir el gel con una solución de ácido acético:etanol (7:10) durante 4 horas.
9. Se analizaron los geles con el programa imageJ.

10. Para calcular el peso molecular de los péptidos, se utilizó el patrón Broad-Range(BioRad).

### **5.2.7 Prueba sensorial discriminativa (Prueba triangular)**

La evaluación sensorial fue realizada por un panel conformado por 30 jueces semientrenados de ambos sexos.

La evaluación sensorial de las formulaciones de queso se llevó a cabo en el laboratorio de análisis sensorial situado en el edificio de Química en Alimentos de la UAEH.

Para la elaboración de ésta prueba se presentaron al panel tres muestras al azar, de manera que recibieran indistintamente juegos conteniendo dos recipientes de la muestra A con prebiótico, y una de la muestra B sin prebiótico, mientras que otros recibían dos recipientes de la muestra B y uno de la A. Se solicitó a los jueces marcar la muestra que era diferente de las otras dos (juicio forzado).

#### **5.2.7.1 Preparación y presentación de las muestras**

Todas las muestras analizadas se codificaron con tres dígitos elegidos al azar. Se sirvieron en vasos desechables con capacidad de 50 mL. Las muestras se mantuvieron en refrigeración y se sirvieron a 5 °C.

La ficha de cata que se utilizó para esta prueba se muestra en la figura 2:

Muestra: Queso tipo manchego		
Fecha: _____	Edad: _____	
Nombre: _____		
A continuación se le presentan tres muestras. Examínelas de izquierda a derecha. Rodee con un círculo la clave de la muestra que considere distinta. Es indispensable que señale una de las tres		
Clave	Clave	Clave
132	481	398
Comentarios		
_____		
_____		
_____		

Figura 2. Ficha de cata utilizada en la prueba triangular

La interpretación de resultados se llevó a cabo mediante la consulta de la tabla “interpretación de resultados de la prueba triangular al nivel del 1% ( $p \leq 0.01$ )” (Anzaldúa-Morales, 1994).

### 5.2.8 Pruebas afectivas (Prueba de preferencia)

La evaluación sensorial fue realizada por un panel conformado por 60 consumidores, principalmente mujeres de entre 30 y 60 años. La evaluación sensorial de las formulaciones de queso se llevó a cabo en tiendas departamentales, escuelas y en las instalaciones de la UAEH.

Para esta prueba se le proporcionó a los jueces dos muestras de queso; una del adicionado con el prebiótico (aguamiel) y otra con un queso comercial manchego (denominación de origen), se les pidió que marcaran cual de las dos muestras preferían.

### 5.2.8.1 Preparación y presentación de las muestras

Todas las muestras analizadas se codificaron con tres dígitos elegidos al azar. Se sirvieron en vasos desechables con capacidad de 50 ml. Las muestras se mantuvieron en refrigeración y se sirvieron a 5 °C.

La ficha de cata que se utilizó para esta prueba se muestra en la figura 3:

<b>Prueba de preferencia</b>
Producto: _____ Fecha: _____
Pruebe las dos muestras que se le presentan a continuación.
Primero pruebe la muestra marcada con 234 y después la muestra 875
INDIQUE CUAL DE LAS DOS MUESTRAS PREFIERE USTED
PREFIERO LA MUESTRA: _____
Comentarios:
_____
_____
Muchas gracias

Figura 3. Ficha de cata utilizada en la prueba de preferencia

La interpretación de resultados se llevó a cabo mediante la consulta de la tabla “significancia para pruebas de dos muestras al nivel del 1% ( $p \leq 0.01$ )” (Anzaldúa-Morales, 1994).

### 5.3 Análisis estadístico

Los resultados experimentales de sobrevivencia y cuantificación de grupos amino libres de los quesos con probiótico y prebiótico, y de los quesos solo con probiótico; fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA), se hizo la comparación de medias por el método de Tuckey’s con un nivel de significancia de 0.05. El programa utilizado para el análisis fue NCSS-2007.

## 6. Resultados y discusiones

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

En la figura 4 se muestra el cromatograma obtenido durante la determinación de carbohidratos presentes en el aguamiel. La identificación de estos compuestos se realizó comparando los tiempos de retención obtenidos con los tiempos de retención de un estándar de carbohidratos.



**Figura 4. Determinación de carbohidratos por HPLC en el aguamiel**

Se observaron picos correspondientes a polisacáridos de más de dos unidades al minuto 14, los cuales presentaron la menor concentración. A los 18 minutos se observó la presencia de sacarosa. Este pico fue el de mayor concentración de todos los carbohidratos separados.

Por otro lado, Campos (2001) mencionó que la sacarosa es el carbohidrato más abundante en el aguamiel y en menor cantidad se encuentran la glucosa y la fructosa. Adicionalmente se sabe que el aguamiel es rico en carbohidratos como la inulina, sacarosa y fructosa además de contener pequeñas cantidades de aminoácidos y vitaminas (Moreno, 2008). Por otro lado, el aguamiel contiene una

cantidad considerable de polisacáridos de más de dos unidades por lo que puede ser considerado como un prebiótico (Rodríguez *et al.*, 2007).

## 6.2 Determinación de la viabilidad

La concentración inicial del probiótico inoculado en el queso fue de  $1 \times 10^9$  UFC/g. En el queso donde se inoculó el probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* GG) y el prebiótico (aguamiel), se observó un crecimiento en la primera semana de maduración; mientras que en el queso sin prebiótico la cuenta viable decreció en este mismo tiempo.

En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos durante las cinco semanas de maduración del queso adicionado con prebiótico y del queso control (sin prebiótico) almacenados a 14 °C y una humedad relativa del 80%. Bajo estas condiciones se observó un aumento de dos ciclos logarítmicos en la cuenta viable final para el queso con prebiótico, desde 6.73 log UFC hasta 8.72 log UFC/g (aumento de dos ciclos logarítmicos); mientras que en el queso control (sin prebiótico) se observó una disminución en la concentración final del probiótico que fue de 9.56 log UFC al inicio de la prueba hasta 8.00 log UFC/g. Esto representó una disminución de un ciclo logarítmico.

Tiempo (Semanas)	Log UFC/g muestra					
	0	1	2	3	4	5
Con prebiótico	6.73	8.73	8.45	8.53	8.70	8.72
Sin prebiótico	9.56	8.47	8.00	8.14	8.00	8.00

**Tabla 2. Viabilidad del probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* GG) en el queso tipo manchego adicionado con prebiótico a una temperatura de 14 °C de almacenamiento**

Se sabe que las causas que provocan la muerte de los probióticos en una matriz láctea como el queso, se asocian a la falta de cultivos iniciadores que estimulen el crecimiento de estos probióticos (Farnworth, 2008). Así también los oligosacáridos son importantes promotores del crecimiento de las bifidobacterias, ya que pueden

incrementar el desarrollo de las mismas en el producto, actuando como prebiótico (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

En el año de 2011 Karimiy colaboradores, demostraron que la dosis mínima requerida, para observar un efecto benéfico en el consumo de probióticos en el producto, es de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g. Esto quiere decir que los valores obtenidos de concentración final de *L. rhamnosus* GG, en ambos quesos, son superiores a lo reportado por estos autores.

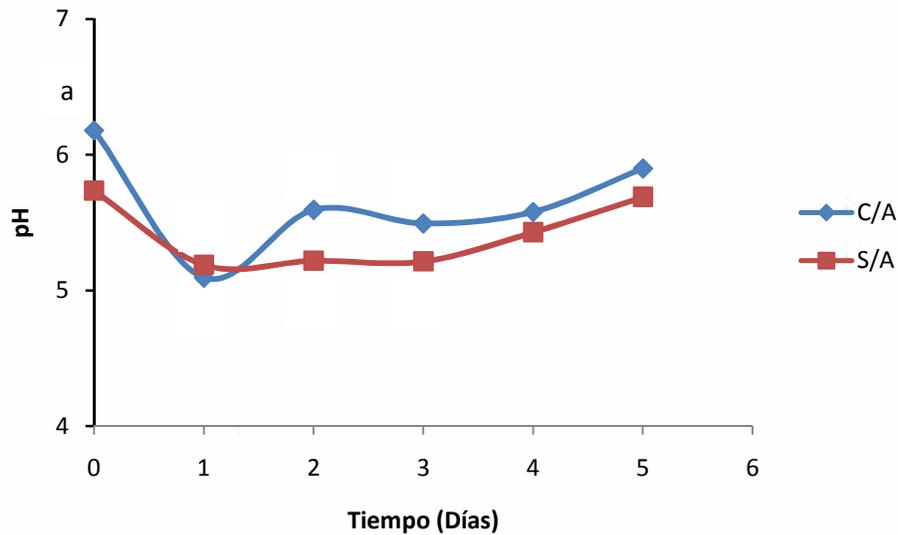
Sin embargo, para incrementar la viabilidad de los probióticos en matrices como quesos madurado, se hace uso de la microencapsulación para aumentar la resistencia de los microorganismos a las condiciones adversas del medio ambiente (Champagne *et al.*, 2011). Otra manera de aumentar dicha viabilidad es agregando factores estimulantes de crecimiento, la adición de diferentes cultivos mixtos y la maduración de quesos empacados al vacío (Farnworth, 2008).

La adición de sustancias promotoras del crecimiento pueden ser los prebióticos. La adición de este tipo de compuestos constituye una estrategia para aumentar el desarrollo y supervivencia de las bacterias probióticas en los productos a los que son incorporadas, sobre todo debido a las dificultades de crecimiento de algunas de ellas en leche (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

En varios estudios se ha observado que el descenso en la viabilidad de probióticos depende de la cepa que se utilice y puede variar hasta en 3 ciclos (Sadaghdare *et al.*, 2012; Rybka y Kailasapathy, 1995).

### **6.3 Medición de pH durante la maduración del queso con prebiótico y sin prebiótico a 14 °C**

Durante el proceso de maduración a 14 °C durante 5ª semana el pH del queso con prebiótico alcanzo un pH final de 5.9; mientras que en el queso sin prebiótico se observó un pH final de 5.7 (figura 5).



**Figura 5. Cambios de pH durante la maduración del queso a 14 °C: C/A (con aguamiel) y S/A (sin aguamiel)**

El aumento de pH es originado por la liberación nuevos grupos amino durante la proteólisis influyendo indirectamente en la textura del queso (Fox, 2003). Además, se ha encontrado que el descenso de pH es desfavorable para la supervivencia bacteriana, aun en presencia de una suficiente cantidad de azúcares fermentables (Heller, 2001). En este mismo sentido, la acidificación del medio es un factor que influye directamente en la viabilidad de probióticos, donde un medio ácido (pH entre 2 y 3), se mantienen viables los probióticos al final de la maduración (Vinderola *et al.*, 2000)

Kaplan y Hutkins (2000) realizaron estudios enriqueciendo sistemas de fermentación con FOS. En estos estudios se utilizaron indicadores de pH, para determinar su influencia en el crecimiento celular. Estos autores observaron que 18 de 29 cepas estudiadas, además de sobrevivir, fueron capaces de producir ácidos orgánicos a partir de los FOS adicionados. Sin embargo, la capacidad de utilizar FOS depende de la cepa y se sabe que el género lactobacilli, en su gran mayoría, es capaz de utilizar dicha fuente de carbono (Muñoz *et al.*, 2012).

#### 6.4 Análisis de la concentración de azúcares totales y reductores en las muestras de queso adicionado con y sin prebiótico, madurado a 14 °C

La determinación de la concentración de azúcares totales y reductores, para las muestras de queso con prebiótico y sin prebiótico durante la maduración del queso, a 14 °C, se realizó por el método de azúcares reductores (DNS) y determinación de carbohidratos solubles totales (Dubois) y se muestran en las figuras 6 y 7.

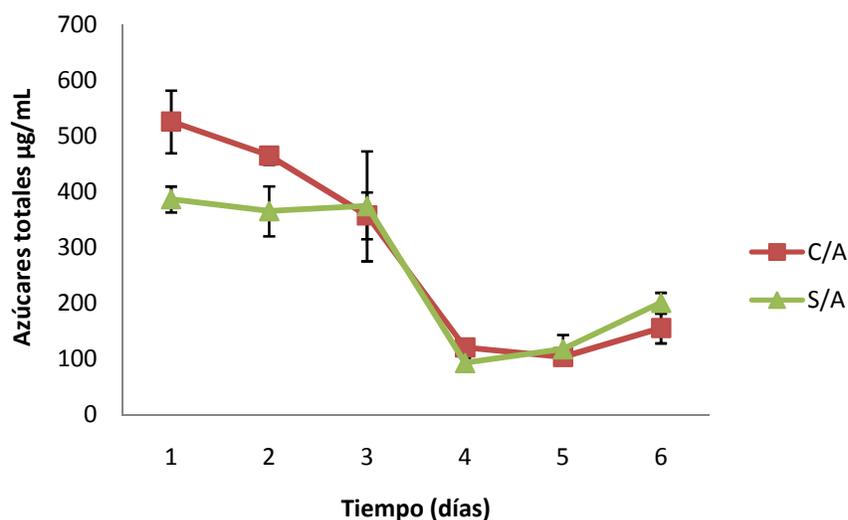
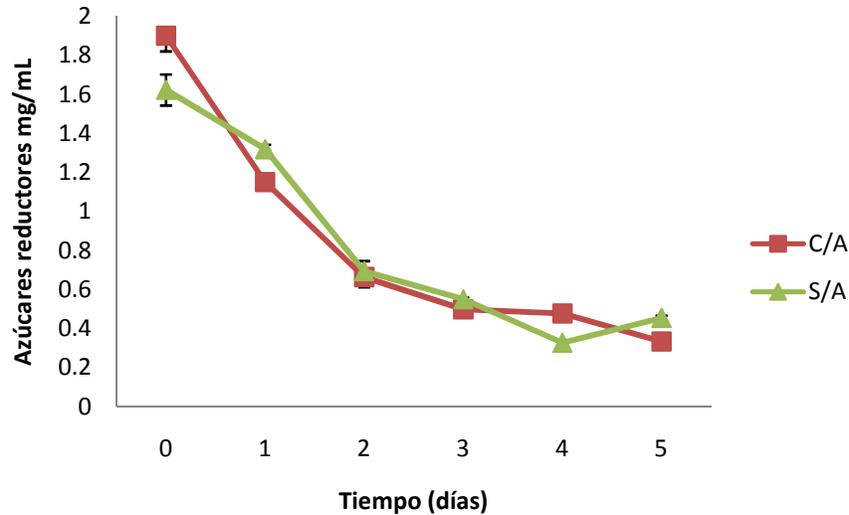


Figura 6. Concentración de azúcares totales durante el proceso de maduración: C/A (con aguamiel) y S/A (sin aguamiel)



**Figura 7. Concentración de azúcares reductores durante el proceso de maduración: C/A (con aguamiel) y S/A (sin aguamiel)**

Al principio de la maduración de los quesos, el que contenía prebiótico poseía una mayor cantidad de azúcares tanto totales como reductores, esto debido a la adición del aguamiel. En la semanas 2 esta cantidad de azúcares fue disminuyendo en las dos muestras de queso, debido a la fermentación provocada por *L. rhamnosus* GG. Se sabe que *Lactobacillus rhamnosus* GG utiliza usualmente fructosa como fuente de carbono pero también puede fermentar carbohidratos complejos (Shah y Lankaputra, 2003).

Se esperaría que la concentración de azúcares reductores aumentara por el fraccionamiento de los polisacáridos; sin embargo, esto no se reflejó en los análisis realizados. Al haber una concentración alta de azúcares reductores (incluida la lactosa) el microorganismo degrada primeramente este tipo de carbohidratos. Por otro lado la disminución en la concentración de azúcares totales no fue equivalente a la disminución de azúcares reductores, lo que quiere decir que; al mismo tiempo que se consumieron monosacáridos se consumieron también polisacáridos.

Al final del proceso de maduración las dos muestras de queso mantuvieron una cierta concentración de azúcares tanto reductores como totales. Ostlie *et al.*, (2003) mencionan en un estudio de crecimiento y actividad metabólica de probióticos en leche, que *L. rhamnosus* GG fue incapaz de fermentar la lactosa y necesitó fructosa para crecer.

### 6.5 Determinación de grupos amino libres por el método de ácido trinitrobencensulfónico(TNBS)

La determinación de la concentración de grupos amino libres, para las muestras de queso con prebiótico y sin prebiótico durante la maduración del queso, a 14 °C, se realizó por el método de TNBS (Figura 8).

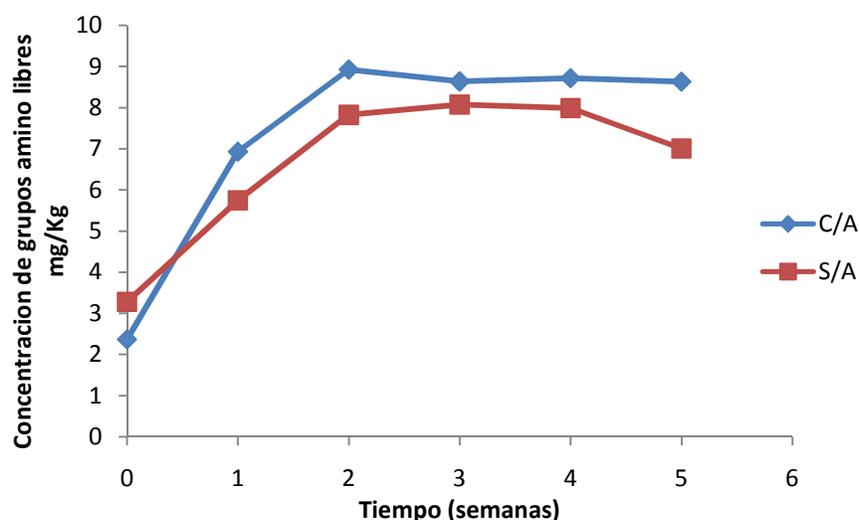


Figura 8. Determinación de grupos amino libres: C/A (con aguamiel) y S/A (sin aguamiel)

En el tiempo cero hay una generación de grupos amino libres para las dos muestras de queso analizadas, esto se debe a la adición del probiótico y del prebiótico antes de la coagulación (proceso de pre-maduración), donde a partir de esto empezó la proteólisis. Se observó una diferencia entre la cantidad de grupos amino libres del día cero al día 35 en cada una de las muestras analizadas, teniendo una concentración final para el queso con prebiótico de 8.63 mg/mL y

para el queso sin prebiótico de 7.00 mg/mL. Esta diferencia de grupos amino libres se debe a que el prebiótico (aguamiel) contiene en su composición una gran cantidad de carbohidratos, entre ellos sacarosa y fructooligosacáridos (FOG'S), que promueven la reproducción del probiótico. Además estos compuestos provocan la generación de enzimas proteolíticas (proteinasas y peptidasas) que a su vez provocan la liberación de fracciones peptídicas (Martinez del Campo, 1999).

Dichas fracciones peptídicas son transformadas a péptidos más pequeños o incluso a aminoácidos libres por parte de las peptidasas del fermento primario (Sousa *et al.*, 2001; Fox, 2003 y McSweeney, 2004). De hecho, algunas cepas de lactobacilos utilizados como fermentos adjuntos modifican el perfil de aminoácidos libres (Di Cagno *et al.*, 2006). Esta modificación de perfil aminoacídico es mas notorio cuando hay ausencia de un fermento primario (Hynes *et al.*, 2003).

La degradación de aminoácidos libres y péptidos pequeños es debido al sistema proteinasa-peptidasa del *L.rhamnosus* GG. Esta degradación proteica es lo que sustenta el crecimiento de la bacteria, ya que la cantidad de aminoácidos libres que se encuentra principalmente en la leche es insuficiente para que el microorganismo pueda crecer óptimamente (Juillard *et al.*, 1996).

La importancia de las bacterias lácticas en la hidrólisis de caseína y péptidos ha sido estudiada en ensayos donde quesos acidificados químicamente eran comparados con quesos testigo con fermento. Los resultados obtenidos han evidenciado que las bacterias lácticas ejercen gran influencia en la proteólisis secundaria, ya que producen mayormente compuestos nitrogenados pequeños (Hynes *et al.*, 2003).

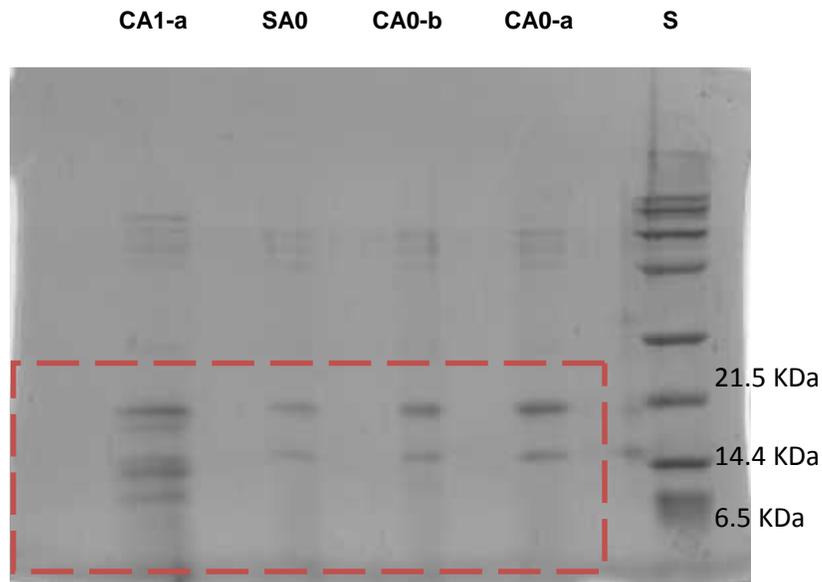
La producción de péptidos durante la fermentación se ve favorecida por diferentes factores. Dentro de estos factores la fuente de carbono juega un papel preponderante en la actividad proteolítica (Gobbetti *et al.*, 2004). Muchas fuentes de carbono utilizadas en estudios con probióticos son carbohidratos fermentables no digeribles con un número variable de residuos de monosacáridos (a partir de dos). Algunos ejemplos son la lactulosa, galacto y fructooligosacáridos, y almidón

resistente. Se ha visto que dichos prebióticos influyen en la sobrevivencia y metabolismo de las bacterias probióticas (Saarela *et al.*,2000).

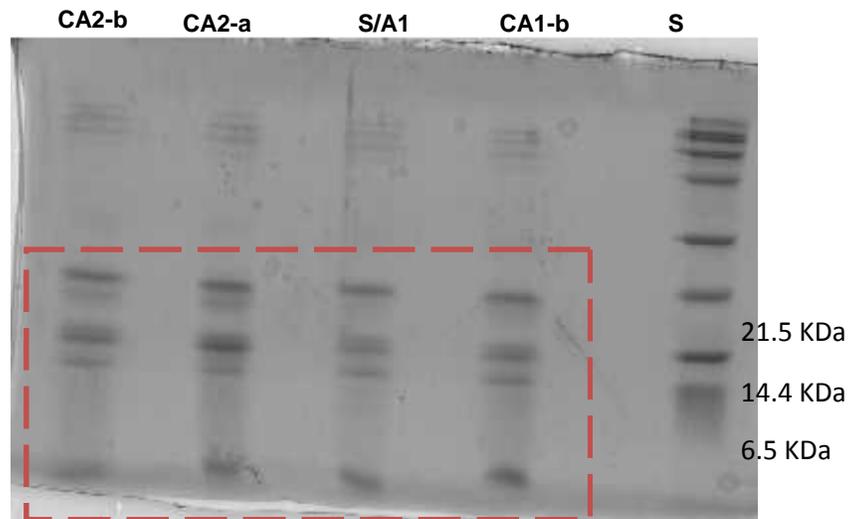
### **6.6 Estimación del peso molecular de los péptidos producidos por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La proteólisis en el queso se define como los cambios en  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -caseínas y péptidos, los cuales pueden ser detectados por electroforesis-PAGE (Pavia *et al.*, 2000). En las figuras 9, 10, 11 y 12 se presentan las imágenes de los geles de electroforesis de las muestras de queso inoculados con *Lactobacillus rhamnosus* GG y con prebiótico (CA) monitoreados desde el tiempo cero (CA0) y durante las cinco semanas siguientes (CA1, CA2, CA3, CA4 y CA5) con sus respectivas repeticiones (a y b). Además se observan los perfiles de los quesos sin prebiótico (SA) igualmente desde la semana cero hasta la quinta semana (SA0, SA1, SA2, SA3, SA4 y SA5). La maduración se realizó a una temperatura de 14 °C.

En las figuras 9, 10 y 11 se puede observar la formación de péptidos debido a la actividad proteolítica en el queso, tanto en las muestras inoculadas con prebiótico y sin este. Se encontraron bandas que correspondían a péptidos menores a 14.4 kDa y bandas menores a los 6.5 kDa que se observaron durante todo el tiempo de maduración. Al mismo tiempo se encontró, que la concentración de estos péptidos generados por la acción del sistema proteolítico va en aumento hasta la quinta semana.



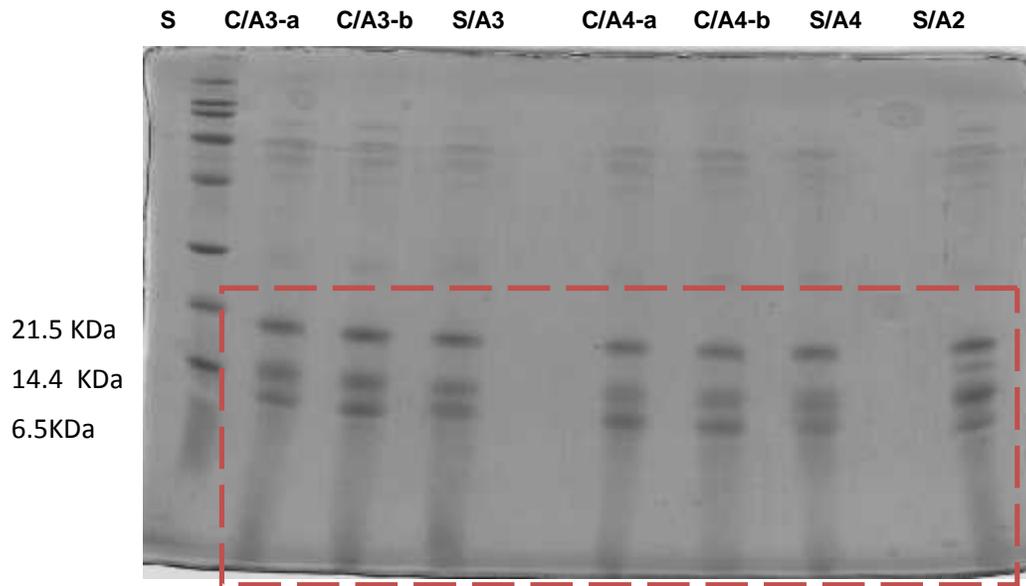
**Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 14 °C**  
**Muestra; Muestra; C/A: con aguamiel S/A: sin aguamiel**



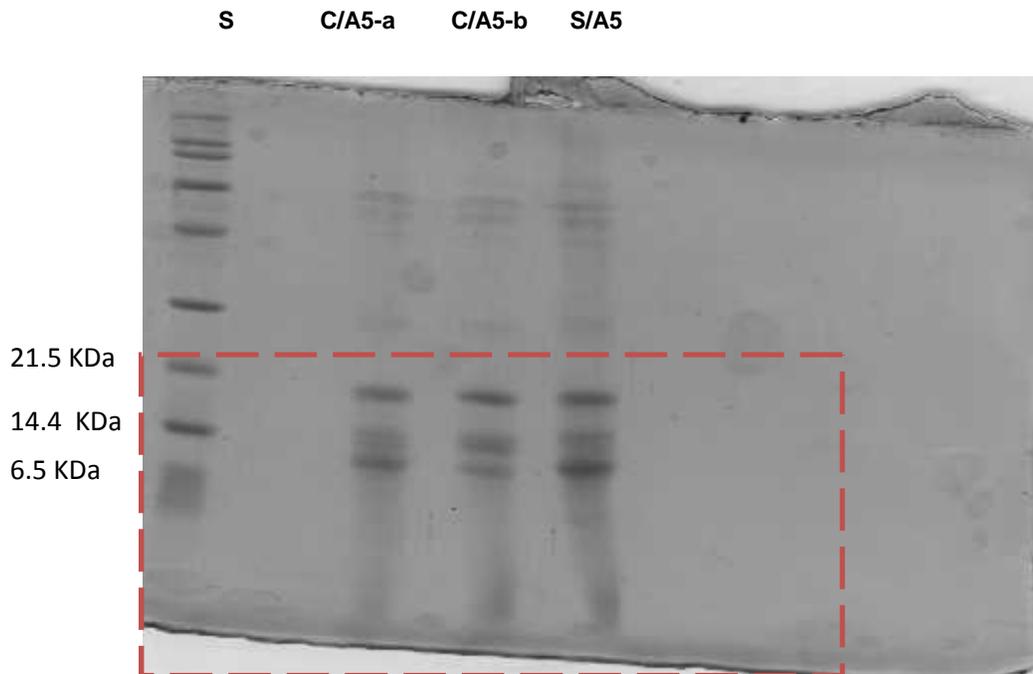
**Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 14°C**  
**Muestra; C/A: con aguamiel S/A: sin aguamiel**

Durante la proteólisis, las proteínas correspondientes a 21.5 KDa (peso correspondiente a inhibidor de tripsina) se observan al inicio de la maduración de queso. Sin embargo, las fracciones de peso molecular cercanas a 14.4 y 6.5 KDa aumentaron su concentración aparente durante el tiempo de almacenamiento en el queso que fue inoculado con prebiótico. También se observó que las fracciones menores a 6.5 kDa tuvieron un incremento de concentración a partir de la semana

2 (Fig. 10 y Fig. 11). Estas fracciones son de gran interés, ya que los péptidos reportados como bioactivos, en su mayoría, tienen peso moleculares menores a éste (Meisel, 2005; Visser, 1992; Dionysius y Milne1997).



**Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 14 °C**  
**Muestra; C/A: con aguamiel S/A: sin aguamiel**



**Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida durante la maduración del queso a 14 °C**  
**Muestra; C/A: con aguamiel S/A: sin aguamiel**

De acuerdo al análisis se observó una acumulación de péptidos de bajo peso molecular. También podemos observar bandas de alta intensidad, que eran apenas evidente en los primeros días de maduración y que se hicieron más evidentes especialmente después de la maduración del queso con prebiótico y sin prebiótico. Entre estas bandas, algunas pueden corresponder péptidos de alto peso molecular que fueron degradadas a pequeños péptidos y aminoácidos por la acción de las proteasas y peptidasas (Feeney *et al.*, 2002). Estas bandas se presentaron desde la primera semana de maduración y se conservaron en semanas subsecuentes sobre todo en el queso que contenía prebiótico (figuras 9, 10 y 11).

Hubo proteínas correspondientes a pesos moleculares menores a las caseínas (Figura 10 y 11) que se generaron en la mitad del proceso de maduración (Semana 3) y que se presentaron hasta el final de dicho proceso. La presencia de estas proteínas supone el fraccionamiento de proteínas de alto peso molecular. De igual manera, péptidos de entre 8.8 y 9.5 kDa, se pudieron observar durante todo

el proceso de maduración, pero su concentración fue disminuyendo durante este tiempo.

La mayor producción de péptidos de bajo peso molecular se observó en los quesos agregados con aguamiel. Estos resultados han demostrado que la acumulación de péptidos de bajo peso molecular está relacionada con el tiempo de maduración y de la activación proteolítica que la presencia de un prebiótico, en este caso aguamiel, ejerce sobre el prebiótico (Kuhn *et al.*, 1993).

Aunque no solo la presencia de un prebiótico es el único factor que determina la actividad proteolítica, la temperatura también es un factor determinante sobre la hidrólisis de proteínas. Folkertsma *et al.*, (1996), encontraron que la velocidad de degradación de la  $\kappa$ -CN, se incrementa cuando los quesos se maduraron entre 8 y 16 °C durante 3 meses. También se recomienda temperaturas de maduración elevadas (15 °C) para acelerar la maduración de los quesos, manteniendo la calidad química (producción de aromas) y la viabilidad de los cultivos iniciadores (Folkertsma *et al.*, 1996).

Otro factor que influye en el proceso de proteólisis es el tiempo de maduración. Se sabe que si un queso es madurado por un tiempo superior a 9 meses, hay un grado de degradación mayor de algunas caseínas ( $\kappa$ - y  $\alpha$ -CN). Adicionalmente, la combinación de tiempos largos de maduración con temperaturas altas tiene un efecto directo en el aumento de la concentración de péptidos de diferentes pesos moleculares (Folkertsma *et al.*, 1996).

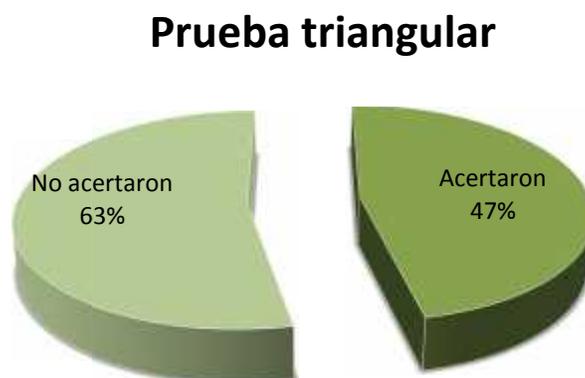
Por otro lado, la liberación de péptidos durante el proceso de almacenamiento, está asociada al sistema proteolítico de bacterias vivas y a enzimas liberadas después de lisis celular (Nighswonger *et al.*, 1996). El proceso de liberación de péptidos sigue un modelo propuesto por Gasson y de Vos (1994) el cual incluye un proceso de liberación en cascada que comienza con la hidrólisis primaria de las proteínas de la leche. En este proceso, se forman péptidos de alto peso molecular

que se hidrolizan para dar péptidos de peso molecular intermedio y a partir de estos, se logra la producción de péptidos de bajo peso molecular.

### 6.7 Prueba sensorial discriminativa (Prueba triangular)

Esta prueba se fundamenta en la norma española UNE 87-006-92; los resultados obtenidos de esta prueba son para identificar diferencias significativas entre las muestras de queso que se elaboraron. Para conocer si hay diferencia en las muestras de queso elaboradas con prebiótico y sin prebiótico (aguamiel), se realizó una prueba triangular a un panel conformado por 30 jueces semientrenados. Se pretendía conocer si había diferencias en el sabor y textura de las muestras de queso preparadas con prebiótico (queso simbiótico) y sin prebiótico (queso probiótico).

Para la interpretación de los resultados se sumaron las respuestas correctas y este dato se comparó con la tabla “Interpretación de resultados de la prueba triangular” (Anzaldúa-Morales, 1994). De los 30 jueces que evaluaron las muestras de queso sólo 11 lograron identificar la muestra de queso que era diferente ( $p > 0.01$ ). Esto nos indica que los dos productos no son diferentes para el nivel de significancia del 1%. Ya que se necesitaba un mínimo de 17 panelistas para identificar que muestra era diferente. En la figura 13 se muestran los porcentajes obtenidos de la prueba triangular.



**Figura 13. Porcentaje de jueces que acertaron en la prueba triangular entre un queso simbiótico y uno probiótico**

Boza y colaboradores (2010) señalan que muchas personas que dicen consumir quesos madurados en Costa Rica (que podría extrapolarse a países latinoamericanos en general) prefieren productos de un sabor no muy fuerte (8-22 días de maduración), pues la tendencia ha sido la de consumir el queso lo más fresco posible.

### 6.8 Prueba sensorial afectiva (prueba de preferencia)

Para conocer la preferencia mostrada por los jueces consumidores de las muestras de queso con prebiótico y la muestra comercial, se realizó una prueba de preferencia a un panel de 60 jueces no entrenados. Se pretendía conocer si el producto que se elaboró tendría aceptación en él por los consumidores potenciales.

Para la interpretación de los resultados se cuantificaron y este dato se comparó con la tabla “Significancia para pruebas de dos muestras” (Anzaldúa-Morales, 1994). De los 60 jueces que evaluaron las muestras de queso sólo 28 prefirieron la muestra de queso elaborada con prebiótico ( $p > 0.01$ ). Esto nos indica que no hubo preferencia significativa por parte de los jueces entre las dos muestras con un nivel de significancia del 1%. Ya que se necesitaba un mínimo de 41 panelistas para que hubiera una preferencia significativa. En la figura 14 se muestran los porcentajes obtenidos de la prueba de preferencia

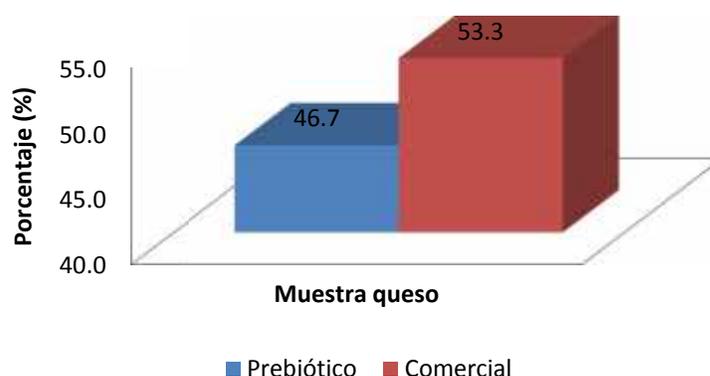


Figura 14. Porcentaje de la prueba de preferencia de queso simbiótico

Las características sensoriales de los alimentos constituyen un importante factor en la aceptabilidad del consumidor, ya que aún en alimentos más saludables, el sabor y aroma son cualidades que determinan la aceptación del consumidor (Simmering y Blaut, 2001, Stanton *et al.*, 2001).

Azambuja, *et al.* (2013), y por Zamora-Vega *et al.* (2013), realizaron pruebas de preferencia a quesos frescos con la adición de un probiótico y un prebiótico, en donde lograron observar que la adición de estos dos elementos no tuvo un efecto en el sabor, color y olor del queso pero si en el atributo de textura. En este caso del queso con el prebiótico (aguamiel), los jueces observaron diferencias en el sabor, color olor y textura en comparación con el queso comercial. Esto se debe a que durante el proceso de la maduración, la proteólisis influye en el desarrollo de textura y *flavour*, debido a la producción de péptidos cortos y aminoácidos libres, algunos de los cuales presentan sabor característico, y que sobre todo en el sabor de fondo del queso. (McSweeney, 1997)

## 7. CONCLUSIONES

La adición de un aguamiel a la matriz del queso promueve la sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus* GG hasta dos ciclos logarítmicos durante la maduración de un queso por 5 semanas.

*Lactobacillus rhamnosus* GG utiliza indistintamente azúcares reductores y cadenas más largas de azúcares fermentables, como fuente de carbono durante la maduración de un queso tipo manchego

El aguamiel tiene influencia directa en la actividad proteolítica de *Lactobacillus rhamnosus* GG durante la maduración del queso. Este microorganismo genera mayor concentración de grupos amino libres cuando se encuentra en interacción con aguamiel.

El fraccionamiento de proteínas en un queso adicionado con el prebiótico es mayor que en quesos sin el. *Lactobacillus rhamnosus* GG genera péptidos de bajo peso molecular durante todo el proceso de maduración y estos se encuentran en mayor proporción cuando la fuente de carbono son carbohidratos provenientes de aguamiel.

Las diferencias sensoriales entre un queso adicionado con prebiótico y uno sin él, son solamente a nivel de textura. El sabor y el aroma no tienen diferencia significativa en una prueba sensorial discriminativa.

## **8. PERSPECTIVAS**

Evaluar otros mecanismos de adición de prebiótico al queso con la finalidad de incluir una mayor cantidad de azúcares del aguamiel al producto y poder observar si es la concentración de aguamiel la que ejerce el efecto de viabilidad del probiótico.

Evaluar el perfil de ácidos grasos de cadena corta que se generan durante la maduración del queso inoculado con prebiótico y conocer los beneficios de generar este tipo de compuestos.

Realizar una prueba de grado de satisfacción para conocer cuál es agrado del producto elaborado así como un perfil de sabor para el producto, con un panel de jueces entrenados.

## 9. Referencias

- Alais C. (1998) Ciencia de la leche. (12ª edición). México: CECOSA.
- Amiot J. (1991) Ciencia y tecnología de la leche. Zaragoza, España: ACRIBIA.
- Anzaldúa-Morales, A. (1994). La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica., Zaragoza España: Acribia
- Ashwell, M.(2004). Conceptos sobre los alimentos funcionales, Bélgica: ILSI Press.
- Azambuja, N. C., Zacarchenco, P. B., Fleuri, L. F., Andrade, J. C., Moreno, I., Van Dender, A. G. F., & Gallina, D. A. (2013). Characterization of fresh cheese with addition of probiotics and prebiotics. *Journal of Life Sciences*, 7(2), 189-195.
- Badui, S. (2010) Química de los alimentos. (5ª edición) México: Pearson
- Bergamini, C. V., Hynes, E. R., Palma, S.B., Sabbag, N. G. y Zalazar, C. A. (2009). Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *International Dairy Journal*., 19: 467–475.
- Bergamini C. V., Hynes E. R., Zalazar C. A. (2006) Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 16: 856-866.
- Boylston T. D.; Vinderola C. G.; Ghoddusi H. B.; Reinheimer J. A. (2004) Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 14: 375-387.
- Boza E., Morales I., Henderson M. (2010) Desarrollo de un queso maduro con adición del cultivo probiótico *lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* lc-01. *Revista Chilena de Nutrición*, 37 (2):215-223.

- Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Flemming, K. y Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 149 (3) 185–193.
- Chamorro, M. y Losada, M. (2002). El análisis sensorial de los quesos: Tecnología de los alimentos. Madrid, España: Mundi-Prensa Libros, S.A.
- Campos, R., Mora, R. y Hernández, H. (2001). Obtención de un probiótico Bifidobacterias utilizando como base aguamiel.
- Casablanca, E., Ríos, N., Teresa A, M., & Terrazas, E. (2009). Optimización de las condiciones de cultivo anaeróbico termófilo para aumentar la producción enzimática de xilanasas con cepas bacterianas encapsuladas y libres. *Biofarbo*, 17, 51.
- Di Cagno, R.; Quinto, M.; Corsetti, A. (2006). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *International Dairy Journal*, 16 (2), 119-130.
- Dionysius, D. A. y Milne, J. M. (1997). Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *Journal of Dairy Science*, 80 (4), 667-664.
- Early R. (2000) Tecnología de los productos lácteos. Zaragoza, España: Acribia.
- Farnworth, E. (2008). Handbook of Fermented Functional Foods. (2ª Edición). Quebec, Canada: CRC Press.
- Feeney, E. P., Guinee, T. P., & Fox, P. F. (2002). Effect of pH and calcium concentration on proteolysis in Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 85, 1646-1654.

- Folkertsma, B., Fox, P. y McSweeney, P. (1996). Accelerated ripening of Cheddar Cheese at elevated temperatures. *International Dairy Journal*, 6(11-12)1117-1134.
- Fox, P. (2003). Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 1; Cheese - Biochemistry of cheese ripening (Eds.: Roginsky, H.; Fuquay, J.; Fox, P.) Reino Unido: Academic Press
- Gardiner G. E.; Ross R. P.; Collins J. K.; Fitzgerald G. Stanton C. (1998). Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracaseis* strains. *Appl. Environ. Microbiol*, 64 (6): 2192-2199.
- Gasson, M. J. & Vos, W. M. de., 1994, Cap.4 : The proteolytic system of lactic acid bacteria, Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Professional an Imprint of Chapman y Hall: Gasson
- Gobbetti, M., Minervini, F. & Rizzello, C., (2004) Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2), 173-188.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F. X., Klaver, F. A. M. y Grande, H. J. (1995). Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. Strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain ki in cheese product. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 49, 71-95.
- Gomes, A. M. P.; Malcata, F. X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 139-157.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M. y Recio I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12(8), 697-706

- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M. y Recio, I. (2004). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal*, 14(12), 1075–1080.
- 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.
- Gouldsworthy, A. M., Leaver, J., & Banks, J. M. (1996). Application of a mass spectrometry sequencing technique for identifying peptides present in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 6(8), 781-790.
- 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.
- Heller K. J., Bockelmann W., Schrezenmeir J., de Vrese M. (2003) Handbook of fermented functional foods; Cap. 8: Cheese and its potential as a probiotic food (Ed.: Farnworth, E. R.). Estados Unidos: CRC Press.
- Hynes, E. R.; Bergamini, C. V.; Suárez, V. B.; Zalazar, C. A. (2003). Proteolysis on ReggianoArgentino cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 86, 3831-3840.
- Juillard, V. Furlan, S. Foucaud, C. y Richard, J. (1996). Mixed cultures of proteinase-positive and proteinase-negative strains of *Lactococcuslactis* in milk. *Journal of Dairy Science*, 79(6), 964-970.
- Kaplan, H. y Hutkins, R. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental microbiolog*, 66, 2682-2684.

- Karimi, R., Mortazavian, A. M. y Da Cruz, A. G. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science and Technology*, 91, 283–308.
- Kuhn, M., Raida, M., Adermann, K., Schulz-Knappe, P., Gerzer, R., Heim, J. & Forssmann, W. (1993). The circulating bioactive form of human guanylin is a high molecular weight peptide (10.3 KDa). *Febs Letters*, 318(2), 205-209.
- Law J., Haandrikman A. (1997) Review Article. "Proteolytic Enzymes of Lactic Acid Bacteria". *International Dairy Journal*, 7, 1-11
- Linnemann, A. R.; Benner, M.; Verkerk, R.; van Boekel, M. A. J. S. (2006). Consumer-driven food product development. *Trends in Food Science & Technology*. 17, 184–190
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11, 1-17.
- Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M. y Drinan, F. D. (1997). Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in cheddar cheese with a controlled microflora. *Le Lait*, 77(4), 441-459.
- Martínez del Campo, G. (1999). Determinación, cuantificación e hidrólisis de inulina en el aguamiel de Agave pulquero (*Agave atrovirens*). (Disertación doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Ciudad de México, México.
- Mayer, M. y Kirchner, S. (2010). Elaboración de productos lácteos. (3a edición) México: Trillas
- Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1905-1919
- Mendiola, R. C., Escobedo, R. M., & Sánchez, H. H. (s/f). Obtención de un probiótico de bifidobacterias utilizando como base aguamiel

- Morelli, L. (2004). Taxonomía y fisiología de las bacterias acidolácticas. Efectos y funciones en nutrición. Instituto de Microbiología UCSC.
- Moreno, V. (2008). Prebióticos en las fórmulas para lactantes ¿Podemos modificar la respuesta inmune? *Anales de pediatría (Barcelona)*, 68(3), 286-294
- McSweeney, P. L. H. (1997). The flavour of milk and dairy products: III. Cheese: taste. *International Journal of Dairy Technology*, 50(4), 123-128.
- 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.). Estados Unidos: Academic Press
- Muñoz, M., Mosquera, A., Almeciga-Díaz, C. J., Meléndez, A. P., & Sánchez, O. F. (2012). Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from ensiled corn and molasses. *Anaerobe*, 18(3), 321-330
- Narvaez Z. & Sánchez L. (2009). Agaves as raw material: Recent Technologies and Applications. *Recent Patents On Biotechnology*, 3(3), 185-191.
- Nighswonger, B.D., Brashears, M. M. & Gilliland, S. E. (1996). Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*. 79, 212-219.
- Ong, L. y Shah, N. P. (2008). Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *LWT - Food Science and Technology*, 41(9), 1555-1566.
- Ong, L. y Shah, N. P. (2009). Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. *LWT - Food Science and Technology*, 42(7), 1260–1268.

- Ostlie, H. M.; Helland, M. H.; Narvhus, J. A. (2003). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 17-27.
- Pavia, M., Trujillo, A. J., Guamis, B. y Ferragut, V. (2000). Proteolysis in Manchego-Type Cheese Salted by Brine Vacuum Impregnation. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1441-1447.
- Peri, C. (2006). The universe of food quality. *Food Quality and Preference*, 17, 3-8.
- Phillips, M., Kailasapathy, K. y Tran, L. (2006). Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, sp., *Bifidobacterium* sp., *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 276–280.
- Pritchard, S. R., Phillips, M. y Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43, 1545–1548.
- Poveda, J. M., Sousa, M., Cabezas, L. y McSweeney, P. L. H. (2003). Preliminary observations on proteolysis in Manchego cheese made with a defined-strain starter culture and adjunct starter (*Lactobacillus plantarum*) or a commercial starter. *International Dairy Journal*. 13, 169–178.
- Rodríguez-Huezo, M. E., Durán-Lugo, R., Prado-Barragán, L. A., Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2007). Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Research International*, 40(10), 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.

- Rybka, S. & Kailasapathy, K. (1995). The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yogurts. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 50, 52 - 56.
- Ryhänen, E. L., Pihlanto-Leppälä, A., & Pahkala, E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal*, 11(4), 441-447.
- Roy, D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Le Lait*, 85, 39-56.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. & Mattila-Sandholm, M., (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197-215.
- Sadaghdar, Y., Mortazavian, M. & Reza, M, E. (2012). Survival and activity of 5 Probiotic Lactobacilli strains in 2 types of Flavored Fermented Milk. *Food Science and Biotechnology*, 21(1), 151-157.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. y Itoh, T. (2000). Isolation and Structural Analysis of Antihypertensive Peptides That Exist Naturally in Gouda Cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1434-1440
- Sanders, M. E. (1999). Probiotics. *Food technology*, 53(11), 67-77.
- Shah, N. (2001). Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*, 55(11), 46-52
- Shah, N. P.; Lankaputra, W. E. V. (2003). Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 1; Bifidobacterium spp. - Morphology and Physiology (Eds.: Rogisnski, H.; Fuquay, J.; Fox, P.). Reino Unido: Academic Press
- Simmering, R., & Blaut, M. (2001). Pro- and prebiotics—the tasty guardian angels?. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(1), 19-28.

- Spence, J. T. (2006). Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S4-S6.
- Sousa, M. Ardö, Y. McSweeney, P. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327-345.
- Stanton, C.; Gardiner, G.; Meehan, H.; Collins, K.; Fitzgerald, G.; Lynch, P. B.; Ross, R. P. (2001). Market potential for probiotics. Supplement of *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 476S-483.
- Tovar, R. C. L., Perales-Segovia, C., Nava, C. A., Valera-Montero, L. L., Gómez-Leyva, J. F., Guevara-Lara, F., Hernández-Duque, L. M. J. & Silos-Espino, H. (2011). Effect of aguamiel (*agave sap*) on hematic biometry in rabbits and its antioxidant activity determination. *Italian Journal of Animal Science*, 10(2), 106-110.
- Vinderola, C. Bailo, N. y Renheimer, J.A. (2000). Survival of probiotic microflora in argentinian yogurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33, 97-102.
- Visser, S. (1992). Symposium: Proteolytic Enzymes and Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, 76, 329-350.
- Veisseyre, R. (1988). Lactología técnica: *Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. (2ª edición) Zaragoza, España: ACRIBIA
- Zamora-Vega, R., Montañez-Soto, J. L., Venegas-González, J., Bernardino-Nicanor, A., Cruz, L. G., & Martínez-Flores, H. E. (2013). Development and characterization of a symbiotic cheese added with *Saccharomyces boulardii* and inulin. *African Journal of Microbiology Research*, 7(23), 2828-2834.

