

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“Elaboración y caracterización de quesos
simbióticos con ácido lactobiónico y
Lactobacillus plantarum CECT 9567”**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

CORINA PUERTAS PÉREZ

JULIO, 2019



Agradecimientos

Agradecer la oportunidad que me ha sido brindada de poder llevar a cabo este trabajo a Manuel Rendueles así como su atención durante el máster.

A Sara Sáez, por su ayuda día tras día en el laboratorio, su confianza en mí y en el presente trabajo, su infinita paciencia y su ilusión hacia el trabajo realizado. Gracias por lo que me has enseñado.

Y por supuesto agradezco a mis padres todo lo que hacen por mí ya que sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Siempre os agradeceré vuestros ánimos, optimismo y paciencia conmigo todos estos años. Por último, pero no menos importante, gracias Marco por enseñarme que el éxito es la suma de pequeños esfuerzos repetidos día tras día.

Gracias por tanto.

ÍNDICE

Resumen	3
Abstract	4
Listado de figuras	5
Listado de tablas	5
Introducción	6
Consideraciones teóricas y prácticas	10
1. Productos lácteos: el queso	11
1.1. Definición y aspectos generales	11
1.2. Proceso de elaboración del queso	12
2. Alimentos funcionales	15
2.1. Probióticos	16
2.2. Prebióticos	18
2.2.1. Ácido lactobiónico	20
2.3. Simbióticos	21
3. <i>Films</i> o recubrimientos alimentarios	22
4. Técnicas de análisis y control de los productos elaborados	24
4.1. Texturometría	24
4.2. Pruebas de digestión <i>in vitro</i>	26
4.3. Microscopía de fluorescencia	27
Materiales y métodos	29
1. Microorganismo probiótico y condiciones de cultivo	30
2. Elaboración de queso	30
3. Preparación de las soluciones formadoras de <i>film</i> y sistema de muestreo	31
4. Caracterización de los quesos simbióticos	33
4.1. Propiedades mecánicas: textura	33
4.2. Pruebas de digestibilidad	34
4.3. Análisis morfológico	35
Resultados	36
1. Crecimiento y viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 9567 en los <i>films</i>	37
2. Caracterización de los quesos elaborados	41

2.1. Caracterización textural de los quesos	41
2.2. Digestibilidad de los <i>films</i> simbióticos	44
2.3. Análisis morfológico	46
3. Investigaciones futuras y posibles mejoras	48
Conclusiones	49
Símbolos	51
Bibliografía	53

Resumen

La preocupación de la población por un mejor estado de salud ha llevado al desarrollo de alimentos funcionales, los cuales tienen ingredientes que promueven la salud más allá de los nutrientes tradicionales. Una manera para que los alimentos adquieran carácter funcional es gracias a la incorporación de microorganismos probióticos, los cuales deben ser viables en la matriz alimentaria y estar presentes en una concentración suficiente para desarrollar su efecto beneficioso. Además de la incorporación de probióticos, el uso de componentes prebióticos también permite desarrollar alimentos funcionales. Estos compuestos son ingredientes no digeribles que estimulan la microflora del tracto gastrointestinal (TGI). Sin embargo, es necesario que tanto probióticos como prebióticos lleguen al TGI. Por ello, surgen nuevas técnicas como el uso de *films* o recubrimientos comestibles que protegen los compuestos probióticos y prebióticos para que estos ejerzan su acción beneficiosa.

El objetivo principal del proyecto es el recubrimiento de quesos de cabra con *films* comestibles de alginato, para obtener un alimento funcional, con una cepa probiótica (*Lactobacillus plantarum* CECT 9567) y un compuesto prebiótico (ácido lactobiónico, LB). Se estudió la viabilidad del microorganismo probiótico a lo largo del tiempo teniendo en cuenta el efecto sinérgico que ejerce el prebiótico sobre él. También se estudiaron sus características texturales, su digestibilidad y la morfología mediante microscopía.

Se elaboraron quesos recubiertos *films* de alginato con diferentes composiciones: *films* probióticos con *L. plantarum*, *films* prebióticos con LB y *films* simbióticos con ambos componentes en diferentes concentraciones. El uso de LB permitió mejorar la viabilidad del probiótico, mostrando al final del periodo de almacenamiento valores aceptables para considerar el alimento como probiótico según el límite establecido. Tras la digestión *in vitro* de los *films* se observó que estos recubrimientos actúan como una matriz protectora del microorganismo probiótico, siendo capaz de sobrevivir a través de su paso por el TGI. Se consiguió por tanto elaborar un queso de cabra simbiótico e innovador, en el que, que en un futuro, podría ser mejorado para conseguir valores mayores de *L. plantarum* y presentar un mayor efecto sinérgico con el prebiótico.

Abstract

The population's concern for the best state of health has been the development of functional foods. These kind of food have ingredients that promote health beyond traditional nutrients. Food can become functional with the incorporation of probiotic microorganisms but they must be viable and have a minimum concentration in the food matrix to develop its beneficial effect. Using prebiotics is another way to develop functional food. Prebiotics are non-digestible compounds that stimulate the growth of the microflora of the gastrointestinal tract. To achieve these beneficial effects, both probiotics and prebiotics must reach the gastrointestinal tract in a properly way. In this context, new techniques arise such as the use of films or edible coatings that protect the probiotic and prebiotic so that they can exert their action.

The main objective of the project is the coating of goat cheeses with edible alginate films to obtain functional food. The probiotic strain used was *Lactobacillus plantarum* CECT 9567 and the prebiotic compound lactobionic acid. The viability of the probiotic microorganism was studied over time to know the synergistic effect exerted by the prebiotic on it. Their textural characteristics, digestibility and morphology, employing microscopy techniques, were also studied.

Alginate films coated cheeses with different compositions were generated: probiotic films with *L. plantarum*, prebiotic films with lactobionic acid and symbiotic films with both components and different concentrations. The use of lactobionic acid allowed to improve the viability of *L. plantarum*. There were acceptable probiotic values (according to the legal limit) at the end of the storage period. The coatings acted as protective matrix of probiotics after the in vitro digestion because the microorganisms was able to survive through the gastrointestinal tract. An innovative symbiotic goat cheese was developed. It could be improved in the future to achieve higher values of *L. plantarum* and with greater synergistic effect with the prebiotic.

Listado de figuras

Figura 1. Producción de lácteos (toneladas) en España	11
Figura 2. Diagrama de elaboración de queso	14
Figura 3. Ácido lactobiónico	20
Figura 4. Ensayo de penetración	25
Figura 5. Componentes del microscopio de fluorescencia	28
Figura 6. Quesos elaborados	31
Figura 7. Queso recubierto con <i>film</i>	32
Figura 8. Texturómetro TA.TX plus (Stable Micro Systems)	33
Figura 9. Sonda P/0,5S	33
Figura 10. Simulación del TGI para la evaluación de microorganismos viables..	35
Figura 11. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 9567	37
Figura 12. UFC totales en los <i>film</i> con <i>L. plantarum</i>	38
Figura 13. UFC/g en los <i>film</i> con <i>L. plantarum</i>	39
Figura 14. Firmeza de los quesos (g)	42
Figura 15. Pegajosidad de los quesos (g)	43
Figura 16. Viabilidad de <i>L. plantarum</i> tras la prueba de digestibilidad	45
Figura 17. Imágenes del tiempo 0 obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los <i>films</i>	46
Figura 18. Imágenes del tiempo 1 obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los <i>films</i>	47

Listado de tablas

Tabla 1. Especies más comunes de BAL usadas como probióticos	17
Tabla 2. Características de las soluciones formadoras de <i>film</i>	31
Tabla 3. Quesos con <i>L. plantarum</i>	38

INTRODUCCIÓN

Actualmente el concepto de nutrición ha evolucionado. El interés actual radica en la relación existente entre la alimentación y las enfermedades crónicas no transmisibles. Los consumidores, conscientes de esta relación buscan en el mercado aquellos productos que contribuyan a su salud y bienestar. Siguiendo esta tendencia, buscan y reciben abundante información sobre las propiedades saludables de los alimentos, en especial de aquellos alimentos que ejercen una acción beneficiosa sobre algunos procesos fisiológicos y/o reducen el riesgo de padecer una enfermedad. Estos alimentos que promueven la salud han sido denominados Alimentos Funcionales y las empresas que los producen presentan una rápida expansión mundial [1]. Los alimentos funcionales, además de aportar los nutrientes básicos al organismo como vitaminas, minerales, grasas, proteínas, etc. también desempeñan otro papel, ya que participan en la prevención y reducción de los factores de riesgo para ciertas enfermedades y también tienen capacidad para mejorar funciones fisiológicas de vital importancia [2].

El desarrollo de este tipo de alimentos está llevando a las empresas a aumentar su capital en I+D+i para focalizar su producción hacia este tipo de alimentos. Uno de los sectores en los que más se trabaja en este campo es la industria láctea ya que son varios los productos alimenticios que pueden obtenerse a través de la leche como yogures, quesos o bebidas lácteas fermentadas, entre otros. Los lácteos tienen buenas cualidades para convertirse en alimentos funcionales generando así productos que mejoran la digestibilidad de la lactosa, reducen la tensión arterial o contribuyen a los niveles de colesterol en sangre.

En las dos últimas décadas se ha producido un aumento importante del consumo de alimentos lácteos funcionales ya que tienen un gran atractivo comercial. Dentro de la gran variedad de productos que se pueden encontrar en el mercado, existen lácteos con carácter probiótico, prebiótico o simbiótico. El sistema general para proporcionar a los lácteos carácter probiótico es la incorporación de cepas las cuales pertenecen mayoritariamente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* [3]. El género *Lactobacillus* es uno de los más usados ya que es considerado como GRAS (*Generally Recognized as Safe*). También son varios los compuestos empleados como prebióticos. Diferentes carbohidratos no digeribles se usan como prebióticos, siendo muchos de ellos derivados de la lactosa. Entre estos derivados se encuentra el ácido lactobiónico (LB), producto obtenido de la oxidación de la lactosa con un gran potencial prebiótico. Además de tener propiedades saludables, el LB despierta un gran interés comercial [4].

El uso de LB en productos lácteos fermentados, como por ejemplo el queso, puede generar menores costes y tiempos de procesado.

El inconveniente de los microorganismos probióticos es la disminución en su viabilidad con el paso del tiempo o con el paso del alimento por el tracto gastrointestinal (TGI), por lo que el producto final no podría considerarse probiótico. Sin embargo, se están estudiando nuevas metodologías para favorecer la supervivencia de los microorganismos probióticos como es el uso de un prebiótico que sirva de nutriente a las cepas probióticas y el uso de técnicas modernas que protegen los microorganismos como los *films* o recubrimientos comestibles. Estos *films* además de poder ser vehículo de probióticos y prebióticos también evitan pérdidas de calidad de los productos manteniendo en ciertos casos su humedad y evitando el crecimiento de microorganismos indeseables. De hecho, se han aplicado y estudiado diferentes recubrimientos (alginato de sodio, proteínas de soja, quitosán) en varios tipos de queso como sistema de protección obteniendo resultados favorables [5]. La incorporación de probióticos y prebióticos en *films* y recubrimientos comestibles se ha propuesto como una tecnología emergente que ha generado gran cantidad de estudios en la última década. Estos *films* se consideran materiales bioactivos, promoviendo beneficios en la salud del consumidor. Además, se ha estudiado la mejora de la estabilidad de los alimentos recubiertos con *films* ya que los microorganismos probióticos incorporados pueden tener efectos competitivos contra microorganismos indeseados que pueden deteriorar el alimento [6]. Estos productos que presentan conjuntamente microorganismos probióticos con sustancias prebióticas reciben el nombre de productos simbióticos [7] y esto hace que tengan efectos sistemáticos sobre el metabolismo y sistema inmune del huésped. La selección simbiótica es una manera de mantener una buena sinergia y maximizar los efectos beneficiosos de los alimentos funcionales [2].

A partir de lo expuesto anteriormente, el presente trabajo persigue la preparación de quesos simbióticos que incorporen como probiótico la cepa *Lactobacillus plantarum* CECT 9567 y como prebiótico LB, contenidos ambos en *films* o recubrimientos comestibles por inmersión de los quesos en la solución formadora de *film*. El recubrimiento de los quesos con estos *films* tiene por objetivo ser vehículo del microorganismo probiótico y el compuesto prebiótico, y favoreciendo la llegada de ambos al TGI con el objetivo de lograr efectos beneficiosos para la salud del consumidor.

Por tanto, los objetivos del proyecto fin de máster son los siguientes:

- Elaborar quesos simbióticos que contengan ácido lactobiónico como compuesto prebiótico y *Lactobacillus plantarum* CECT 9567 como microorganismo probiótico empleando *films* alimentarios que sirvan como vehículo del probiótico y del prebiótico.
- Evaluar la protección que ofrece el *film* al microorganismo probiótico durante el periodo de almacenamiento observando su viabilidad y el efecto sinérgico existente entre el probiótico y el prebiótico.
- Caracterizar los quesos simbióticos elaborados, analizando los cambios en su textura, la viabilidad del probiótico durante la digestibilidad y morfología en el interior de los *films* alimentarios.

CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y PRÁCTICAS

1. Productos lácteos: el queso.

1.1. Definición y aspectos generales.

Según el *Codex Alimentarius* un producto lácteo es aquel producto obtenido mediante cualquier elaboración de la leche, que puede contener aditivos alimentarios y otros ingredientes funcionalmente necesarios para la elaboración [8]. El procesado de la leche da lugar a una gran variedad de productos como leche de consumo, leche en polvo, nata, mantequilla, queso, yogur, postres lácteos o helados [9]. Las gamas de productos varían significativamente de una región a otra y entre los países de la misma región, dependiendo de los hábitos alimenticios, las tecnologías de procesamiento de leche disponibles, la demanda del mercado y las circunstancias sociales y culturales.

En España, según la estadística láctea anual del 2017 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPAMA) la mayor parte de la leche producida es leche de vaca, con 7.027.700 toneladas (t), seguida de la leche de oveja (514.000 t) y cabra (491.400 t). De toda la leche producida, la mayor parte se destina a leche de consumo (3.538.000 t) y pequeñas partes a productos más elaborados como quesos (481.100 t) o mantequillas (49.600 t) (Figura 1). De toda la producción quesera, 190.600 t son de queso fresco y 290.500 t de quesos de pasta, tanto blanda como dura [10].

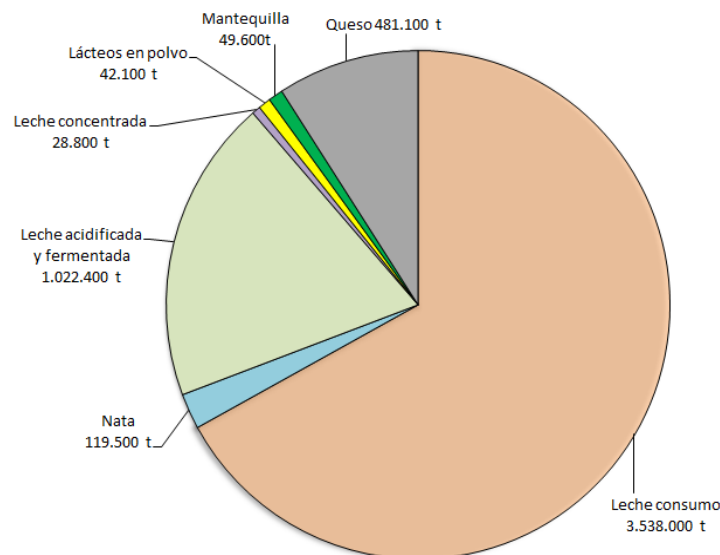


Figura 1. Producción de lácteos (toneladas) en España (MAPAMA 2017)

El queso es uno de los productos lácteos elaborados con unas cifras de producción importantes. Este producto se define como aquel producto fresco o madurado obtenido

por separación del suero después de la coagulación de la caseína (principal proteína en la leche) de leche, desnatada total o parcialmente, de la nata, del suero de mantequilla o de una gran mezcla de algunos o de todos estos productos [9].

La coagulación de la caseína puede ser enzimática o ácida. La coagulación de la leche puede estar favorecida por el uso de bacterias del ácido láctico (BAL) que acidifican el medio por su metabolismo. Tras la coagulación, el queso se moldea, se sala, se prensa y en algunos tipos de queso se siembran cultivos fúngicos o bacterianos. En algunos casos también se añaden colorantes, especias u otros alimentos y productos no lácteos. El producto final obtenido se puede consumir en fresco o con diferentes grados de maduración [9].

Se diferencian más de 2.000 tipos de queso en todo el mundo, con características diferentes y con procesos de elaboración más o menos diferenciados. Los diferentes quesos se pueden clasificar en función del tipo de leche con la que sean elaborados (leche de vaca, cabra u oveja), sus características finales (queso con sal, fundido, etc.), o según el tiempo de maduración al que son sometidos (quesos curados, semicurados, frescos) [9]. Además, en España 26 quesos son considerados productos con Denominación de Origen Protegida (DOP), estableciéndose así un cierto nivel de calidad en el producto elaborado. Algunos son por ejemplo el queso DOP Bejes-Tresviso (Cantabria), DOP Cabrales (Asturias), o DOP Torta del Casar (Extremadura).

Desde el punto de vista nutricional, el queso tiene gran valor alimenticio por su contenido en proteínas, grasa, calcio, fósforo y otras vitaminas [11]. El queso posee de forma concentrada la mayoría de los nutrientes de la leche, dependiendo el grado de concentración de estos en la cantidad de agua que tenga el producto final, pudiendo diferenciar así la composición nutricional de las diferentes variedades de queso, sobre todo entre quesos frescos y madurados.

1.2. Proceso de elaboración del queso.

El proceso general de elaboración de queso es sencillo y a pesar de que cada tipo de queso tiene un proceso de elaboración diferente, la mayoría de las etapas son iguales (Figura 2).

La leche, bien sea de vaca, cabra, oveja o una mezcla de estas; es la materia prima fundamental para elaborar queso. Se parte de leche natural, total o parcialmente desnatada, de nata de suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o todos estos productos. Una materia prima de buena calidad asegura un producto final de buena calidad. Es importante tener en cuenta los diversos factores fisicoquímicos y microbiológicos que pueden afectar al proceso de coagulación de la leche.

Los diferentes componentes de la leche juegan un papel crucial en el queso, afectando algunos de ellos de la siguiente manera:

- El agua favorece el crecimiento microbiano, afecta a la textura y al rendimiento.
- La grasa afecta a la textura, sabor, rendimiento y color.
- La lactosa afecta al desuerado, textura, sabor y maduración.
- La caseína afecta al rendimiento, sabor y olor.
- Los minerales participan en la coagulación, influyen en el desuerado y textura de la cuajada.

La transformación de la leche a queso generalmente comprende las siguientes etapas: tratamiento de la leche, coagulación, corte de la cuajada y desuerado, moldeo, prensado, salado y maduración. Antes de empezar la elaboración en sí del queso, la leche tiene que tratarse y prepararse para acondicionar sus características físicas, químicas y biológicas con procesos de filtrado y estandarización de la grasa, además de un posible proceso de pasterización en el caso de que el queso se vaya a consumir antes de los sesenta días siguientes a su elaboración [9].

A continuación, la leche pretratada se pasa a la cuba o tina de cuajado y es ahí donde se añaden, dependiendo del queso a elaborar, fermentos lácticos o cuajo, manteniendo una temperatura en torno a 35°C. Gracias a esta coagulación la leche se transforma de líquido a sólido o semisólido por la precipitación de la caseína, formándose un gel o cuajada. La cuajada obtenida se corta y como consecuencia el suero se elimina, obteniéndose pequeños granos de queso que a continuación serán moldeados para dar al queso la forma deseada; y además, de manera opcional, tras su moldeo, los quesos pueden prensarse diferenciando así quesos de pasta prensada o sin prensar.

Seguido, los quesos se salan con el objetivo de regular el proceso microbiano evitando la aparición de microorganismos indeseables, seguir contribuyendo al desuerado de la

cuajada, formar corteza en el queso y potenciar su sabor. Finalmente, en la etapa de maduración los quesos se mantienen en cámaras (también denominadas secaderos) en las que se controla la temperatura, humedad y aireación [12].

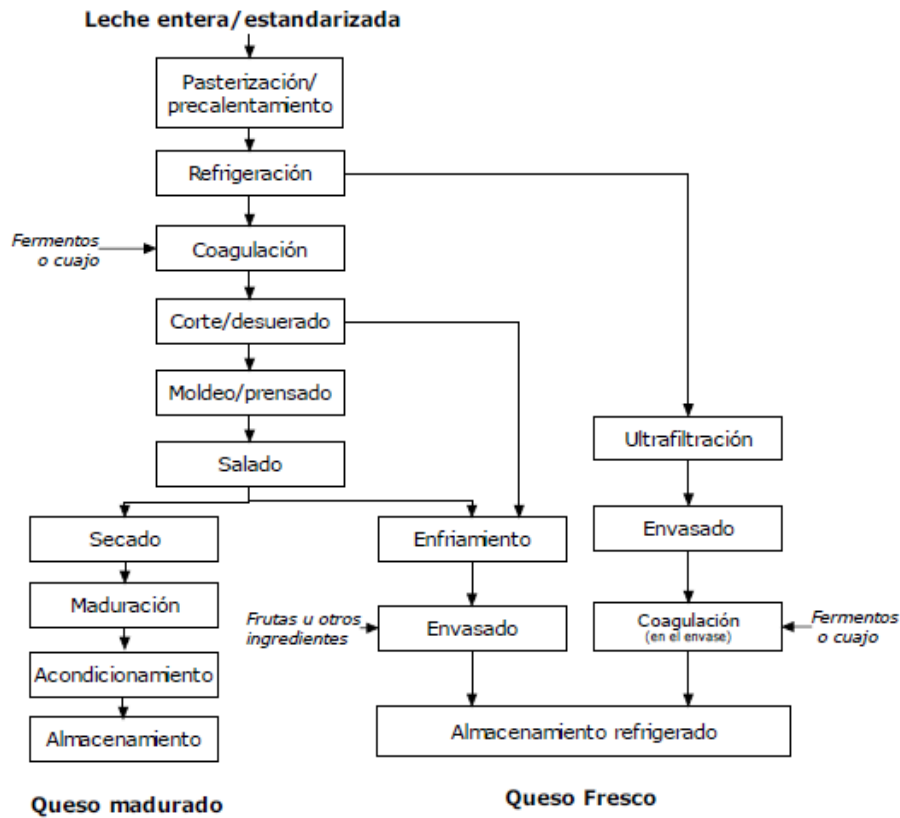


Figura 2. Diagrama de elaboración del queso [2].

A pesar de que lo más común es la elaboración de queso madurado, los quesos frescos ocupan un gran lugar en el mercado. Se obtienen principalmente por coagulación ácida y tienen una consistencia blanda además de un alto contenido en agua. No están sometidos a procesos de maduración, por lo que están listos para su consumo una vez acabado su proceso de fabricación. Tras el moldeo, prensado y salado se enfrían (proceso el cual da consistencia al queso), se envasan y se almacenan a temperatura de refrigeración. Actualmente la mayor parte de quesos frescos sufren un proceso previo de ultrafiltración que separa parte del suero antes del cuajado de la leche en el propio envase [9]. El queso fresco más común en España es el tipo Burgos mientras que en Europa son populares el queso Cottage y Mozzarella. [9] [13].

2. Alimentos funcionales.

Actualmente los consumidores buscan en el mercado productos que contribuyan a su salud y bienestar. Existe abundante información sobre las propiedades saludables de los alimentos, especialmente de aquellos alimentos que tienen una acción beneficiosa en algunos procesos fisiológicos y/o que reducen el riesgo de padecer una enfermedad. Estos alimentos son denominados alimentos funcionales [1].

Fue a mitad de los años 80 cuando se comenzó a usar el término “functional food” en Japón (conocidos en este país como *Food of Specific Health Use*; “FOSHU”). El concepto de alimento funcional se extendió rápidamente por todo el mundo, convirtiéndose en una gran fuente de negocio para muchas empresas del sector de la alimentación. En Estados Unidos desde 1990, la *Food and Drug Administration* (FDA) vigila el desarrollo de estos nuevos alimentos, creando un marco de seguridad alimentaria fiable. En Europa los alimentos funcionales también han despertado un gran interés desde su aparición en el mercado [14].

El nombre de alimento funcional se ha usado de forma amplia en los últimos años sin que exista una definición universalmente aceptada [14]. En general, los alimentos funcionales se definen como alimentos en los que algunos de sus componentes afectan a las funciones del organismo de manera específica y positiva, teniendo un efecto fisiológico o psicológico más allá de su valor nutritivo tradicional. El efecto que tienen puede contribuir a mantener la salud y el bienestar, disminuir el riesgo de enfermedad o ambas acciones [1]. Es importante destacar que los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos, por lo que no se consumirán en forma de pastilla, cápsula u otro formato similar. También se debe tener en cuenta que los alimentos funcionales deben demostrar sus efectos beneficiosos en cantidades que puedan ser normalmente consumidas en la dieta, por lo que deberían formar parte de un patrón normal de alimentación. Lo importante, en cualquier caso, es que el alimento posea algún efecto beneficioso definido sobre una función o varias funciones orgánicas [14].

Durante los últimos años, los alimentos funcionales han adquirido una importancia creciente con un impacto positivo tanto en la salud mundial como en el comercio internacional. Al mismo tiempo, los beneficios económicos de los alimentos funcionales crecen tanto en los países en desarrollo como en los industrializados. La producción de

alimentos funcionales está siendo reconocida como la industria de biotecnología de alimentos número uno, ya que las tendencias cambiantes en la demografía de la población y la mejora de la atención de salud dan lugar a unos clientes conscientes de la salud [15].

Dentro de los alimentos funcionales se encuentran ingredientes como vitaminas, minerales y también probióticos y prebióticos. Se encuentran en diversos productos como leches fermentadas, yogures o bebidas deportivas [15].

2.1. Probióticos.

El consumo de alimentos con carácter probiótico ha aumentado debido a las preocupaciones de los consumidores con respecto a las dietas saludables y el bienestar. Actualmente la FAO define los probióticos como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud al huésped" [16].

Los efectos probióticos son específicos de cada cepa, por lo que es necesario conocer el género y la especie de los microorganismos para obtener los efectos deseados en el huésped. Las principales características de las cepas probióticas en su relación con el huésped son la resistencia al ácido gástrico y biliar, la adherencia al moco o las células epiteliales humanas, la actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas y la capacidad de reducir la adhesión de patógenos a las superficies y la actividad hidrolasa de sales biliares [16]. Los géneros más usados como probióticos son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pero no dejan de emplearse otros géneros como *Enterococcus*, *Streptococcus* o *Saccharomyces* (Tabla 1).

Los mecanismos por los cuales los probióticos pueden beneficiar al ser humano son diversos, incluyendo la producción de sustancias antimicrobianas, fortalecimiento de la barrera intestinal, la modulación de la respuesta inmune y la actividad antagonista frente al crecimiento de microorganismos patógenos ya sea por la producción de agentes antimicrobianos o por la competencia por los sitios de unión, los nutrientes y los factores de crecimiento [16]. Algunos de los efectos beneficiosos que han sido estudiados de las bacterias del ácido láctico (BAL) son la reducción y prevención de la

diarrea, la mejora del equilibrio microbiano intestinal, el alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa y la actividad antitumoral [1]. Como se observa, la mayor parte de los efectos se relacionan con TGI, por lo que es necesario que el probiótico tenga la capacidad de sobrevivir en su paso a través TGI superior y siendo capaces de crecer en el intestino (resistiendo la acción de los ácidos y la bilis). Además, los probióticos se consideran seguros para el consumo humano, ya que producen sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas y tienen la capacidad de adherirse a las líneas celulares del intestino y colonizarlo [17]. Una opción interesante es utilizar una matriz alimentaria que los proteja y favorezca su supervivencia, como es el caso de los *films* o recubrimientos comestibles.

Tabla 1. Especies más comunes de BAL usadas como probióticos.

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
<i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i> <i>L. delbrueckii ssp</i> <i>(bulgaricus)</i> <i>L. cellobiosus</i> <i>L. lactis</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i>	<i>B. bifidum</i> <i>B. animalis</i> <i>B. longum</i> <i>B. thermophilum</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>S. cremoris</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. diacetylactis</i>

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe reunir las siguientes características [15]:

- Estar aislado de la misma especie que las que se encuentran en el ser humano.
- Tener efectos beneficiosos demostrables en el huésped.
- Carecer de carácter patógeno y tener la categoría GRAS.
- Sobrevivir el paso por el TGI.

Para que se reconozca que un alimento contiene carácter probiótico la concentración de microorganismos debe ser de $10^6 - 10^8$ UFC/g o UFC/mL [18] . Además, una cepa probiótica debe soportar el proceso de fabricación sin la pérdida de viabilidad o efecto negativo sobre las propiedades sensoriales del producto alimenticio. La cepa y las

propiedades reivindicadas deben mantener la estabilidad en el producto alimenticio durante el procesamiento y también durante el almacenamiento posterior [15].

Los probióticos se han incorporado en varios productos alimenticios y suplementos, la mayoría de los cuales son productos lácteos como quesos, helados o yogures [16]; pero también en algunos productos vegetales fermentados como aceitunas, chucrut, soja y cereales; en algunas carnes o pescados fermentados y salchichas; en bebidas alcohólicas, como vino, cerveza, sidra y otras; y en el gran grupo de los liofilizados, sea como medicamentos o como suplementos nutricionales [19]. Como ejemplos, se han estudiado recientemente el uso de *Streptococcus thermophilus* TA040 en yogures o *Lactobacillus casei* Zhang en queso fresco [11].

El género *Lactobacillus* se emplea ampliamente como probiótico. Una de las cepas más importantes dentro este género es *Lactobacillus plantarum*, BAL mesófila, no patógena, versátil, y que es aislada frecuentemente de productos alimenticios y se usa para la producción de alimentos fermentados como queso, kéfir, chucrut, productos cárnicos fermentados o bebidas [20]. Además, *Lactobacillus plantarum* se considera GRAS y se puede emplear en diversas aplicaciones. Hasta la fecha, existe evidencia de su uso como probiótico en la prevención de la diarrea, reducción del colesterol y reducción de los síntomas del Síndrome del Intestino Irritable (SII). *L. plantarum* cuenta con un valor añadido, ya que ciertas cepas tienen capacidad de producir plantaricinas (bacteriocinas), las cuales ofrecen un amplio rango de aplicaciones en el campo alimentario [18].

2.2. Prebióticos.

En 1995 Gibson y Roberfroid definieron por primera vez un prebiótico como ingredientes de los alimentos no digeribles que afectan de manera beneficiosa al consumidor ya que estimulan de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad de una o varias bacterias del colon [15]. Actualmente la definición más aceptada es la emitida por la FAO en 2007 donde se describen los prebióticos como “componentes alimenticios no digeribles asociados a la modulación de la microbiota del consumidor teniendo esto beneficios en su salud”.

Los prebióticos son por lo general hidratos de carbono de cadena corta que se fermentan a lo largo del TGI y estimulan así el crecimiento de bacterias beneficiosas. Estos compuestos, entre otros, mantienen y desarrollan la microbiota intestinal lo cual facilita mecanismos de defensa de los individuos [21]. Alguno de los compuestos más comunes considerados como prebióticos son inulina, fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS). Los poli y oligosacáridos están disponibles en la dieta habitual de cualquier consumidor ya que se encuentran principalmente en vegetales. En la leche también podemos encontrar algunos oligosacáridos con actividad prebióticas. Los prebióticos que más se suelen usar para el desarrollo de alimentos funcionales son fructanos (oligosacáridos de inulina y FOS) y GOS [22].

Es necesario establecer criterios que permitan clasificar un ingrediente alimentario como prebiótico. Para ello un prebiótico debe ser químicamente estable a los tratamientos durante el procesado de alimentos, y a ciertas condiciones como temperaturas elevadas, ambientes ácidos o a las condiciones que se dan en la reacción de Maillard; resistir la acidez gástrica y la hidrólisis enzimática así como absorberse en el intestino; ser fermentado por la microbiota intestinal, principalmente por los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*; y estimular de forma selectiva el crecimiento y/o actividad de las bacterias intestinales asociadas con la salud y bienestar [13] [14].

La función de los prebióticos se debe a su indigestión por enzimas pancreáticas e intestinales debido a su naturaleza química, llegando al colon prácticamente intactos. La microflora del colon tiene la capacidad de realizar hidrólisis digestivas complejas, descomponiendo los carbohidratos complejos y otras proteínas que no se hidrolizan ni absorben en el tracto digestivo superior [22]. Por tanto, cualquier alimento no digerido que llegue al colon (carbohidratos no digeridos, péptidos y proteínas, algunos lípidos, etc.) se considera fuente de prebióticos.

Son varios los efectos beneficiosos observados de los prebióticos sobre la salud humana. Entre ellos destacan: la prevención de gastroenteritis, la disminución de la inflamación en procesos de enfermedad inflamatoria intestinal (EII), inducción de apoptosis de células malignas disminuyendo el riesgo de cáncer de colon, etc. [8].

2.2.1. Ácido lactobiónico.

Actualmente, se utilizan diferentes carbohidratos no digeribles como prebióticos, muchos de ellos derivados de la lactosa. Este grupo incluye LB, el cual es un producto de la oxidación de la lactosa potencialmente prebiótico. Además de sus propiedades sobre la salud del consumidor, hay un gran interés comercial y en el ámbito alimentario por sus propiedades. La introducción de LB en los procesos de fabricación de productos lácteos fermentados conduciría a menores tiempos de procesado y ahorro de costes [4]. Además de sus aplicaciones tecnológicas, el LB se puede considerar un producto prebiótico como ingrediente de alimentos funcionales ya que resiste la acción de las enzimas digestivas, pasando al colon prácticamente intacto pudiéndose así fermentar por las bacterias intestinales y tener efectos prebióticos potenciales [23].

El LB (4-O-β-D-galactopiranosil-D-glucónico) pertenece a la familia aldobiónica de los ácidos, y es un polihidroxi ácido compuesto por una molécula de galactosa y una molécula de ácido glucónico las cuales se unen por un enlace similar al éter (Figura 3) y se caracteriza por contener numerosos grupos hidroxilo. Desde el punto de vista nutricional, puede considerarse un edulcorante bajo en calorías ya que proporciona solo 2 kcal/g. Es una sustancia versátil la cual tiene aplicaciones en el campo de la cosmética, farmacia y alimentación además de un gran potencial terapéutico por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, su carácter no tóxico y sus propiedades quelantes, anfífilas y antioxidantes. [24] [23]

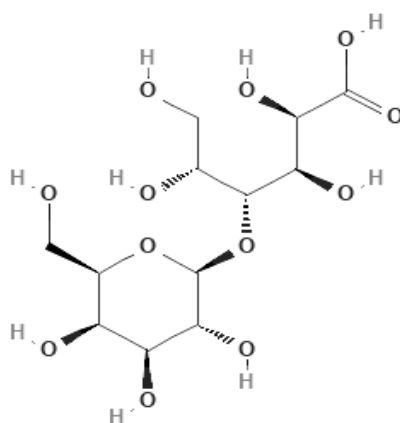


Figura 3. Ácido lactobiónico [25].

Se obtiene oxidando el grupo aldehído de la molécula de glucosa que compone la lactosa mediante procesos como oxidaciones catalíticas, biocatalíticas o electroquímicas. Su costo de producción es elevado, razón por la cual se investiga cada vez más la síntesis biológica de este ácido que puede ser posible con una eficiencia muy alta y sin necesidad de purificación de enzimas ni tratamiento de residuos altamente contaminantes producidos por los catalizadores químicos [26][24]. La producción biológica de LB es una alternativa sostenible, desarrollándose un proceso eficiente con *Pseudomona taetrolens* como microorganismo productor el cual actúa sobre el suero de queso residual, aprovechando un residuo para obtener un ácido con un alto valor añadido [4].

Son diversas las aplicaciones del LB en el ámbito alimentario. Se han observado sus efectos como antioxidante, estabilizante, agente gelificante y acidificante, potenciador del sabor o como agente capaz de retener agua [23]. Su sal, el lactobionato de calcio, se ha usado en bebidas no lácteas, bebidas a base de leche y quesos ya que se ha observado que la presencia de este ácido en dichos alimentos puede estimular el calcio intestinal promoviendo así la salud del consumidor. Podría por tanto considerarse como un agente importante en la prevención y/o tratamiento de deficiencias de calcio [27]. Su uso en la industria láctea permite mejorar los rendimientos de producción, al disminuir los tiempos de procesado y ahorrar así costes de fabricación ya que se puede inducir la coagulación en la fabricación de queso sin necesidad de emplear cultivos iniciadores y/o cuajo, lo que reduce costos al no tener que usar dichos ingredientes [28].

2.3. Simbióticos.

Actualmente surgen nuevas tendencias en el desarrollo de alimentos funcionales al incorporar más de un ingrediente bioactivo en un alimento para promover más efectos beneficiosos para la salud. Estos productos los cuales contienen dos o más componentes bioactivos se conocen como alimentos simbióticos.

En el contexto de los prebióticos y probióticos, un simbiótico tiene efectos beneficiosos sobre el huésped al mejorar la supervivencia e implantación de microorganismos en el TGI mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o activación del metabolismo de uno o varios microorganismos beneficiosos. El término

simbiótico alude al sinergismo, es decir, productos en los que los compuestos prebióticos favorecen selectivamente los organismos probióticos. El fundamento para el uso de simbióticos se basa en la mejora de la supervivencia que se ha observado en bacterias probióticas a través del TGI superior [2].

Son varios los productos simbióticos que se están desarrollando. Por ejemplo, una de las últimas tendencias es añadir simultáneamente prebióticos y probióticos al queso fresco, llamándolo “queso simbiótico”. En queso *Fiordilatte* (de origen italiano) se incorporó como probiótico *Lactobacillus rhamnosus* y fructooligosacáridos e inulina como agentes prebióticos [7]. También se han generado otros derivados lácteos simbióticos como helados en los cuales se observa que la adición de inulina mejora la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* [29].

3. Films o recubrimientos alimentarios.

Para que los probióticos y prebióticos desempeñen el papel previsto en la salud humana, es esencial que tanto la viabilidad como la actividad metabólica se mantengan durante todo el procesamiento de los alimentos y la cadena de suministro, así como en el TGI. Debido a la sensibilidad que presentan tanto los probióticos como ciertos prebióticos a condiciones comunes de procesamiento como calor, ambiente ácido, elevada presión osmótica, etc.; resulta necesario generar una barrera fisicoquímica que permita a los microorganismos y compuestos prebióticos mantenerse estables. Una posible solución es la incorporación de los probióticos y prebióticos en *films* o recubrimientos comestibles, los cuales son una delgada capa de material comestible que se adhiere a la superficie de un alimento, lo que proporciona una barrera contra la humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas, lípidos y otros solutos. Esta tecnología puede favorecer su estabilidad y viabilidad para permanecer fisiológicamente activos en el momento de consumo, condición necesaria para considerar a un alimento probiótico y aportar efectos beneficiosos al consumidor [30] [16] [31].

Los *films* y recubrimientos comestibles no reemplazan al embalaje externo del alimento, pero ayudan a proteger los alimentos, ya que reducen las tasas de transferencia de humedad y gas entre los alimentos y el ambiente, contribuyendo a mejorar la estabilidad de los alimentos. Es un enfoque novedoso dentro del concepto de

alimentos funcionales, que propone que cualquier alimento pueda proporcionar un beneficio para la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contiene y que pueda considerarse funcional.

De acuerdo con las propiedades del compuesto que se va a introducir en el *film* el material de los recubrimientos puede basarse en proteínas (soja, colágeno o gelatina), polisacáridos (derivados de celulosa, almidones, alginato, quitosano) y lípidos (ésteres de glicerol o ceras) que pueden usarse solos o combinándose. Para la formación de los *films* también se incluyen plastificantes como glicerol o polietilenglicol, que actúan como agentes hidrofílicos que mejoran las propiedades de los recubrimientos [32].

Una de las funciones principales los *films* y/o recubrimientos es contener probióticos o prebióticos permitiendo que estos productos sean viables en el TGI. El uso de estos *films* no solo favorece la viabilidad de los probióticos en el ser humano, sino que también permiten reducir o evitar el uso de agentes conservantes en alimentos en el caso de incorporar BAL ya que estas son capaces de inhibir el crecimiento de diversos microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos, a través de la producción de diferentes sustancias [33]. Todas las ventajas que aportan estos recubrimientos son especialmente relevantes en el desarrollo de nuevas aplicaciones industriales. Actualmente esta tecnología se ha utilizado para la elaboración de algunos alimentos funcionales como probióticos y prebióticos, así como el desarrollo de alimentos simbióticos.

Dentro del campo de los probióticos se han desarrollado *films* comestibles de alginato con carácter probiótico en manzana y papaya recién cortadas, mostrándose valores de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 superiores a 10^6 UFC/g, demostrando un mantenimiento de la viabilidad del microorganismo gracias al uso del recubrimiento [34].

Los *films* pueden emplearse también para desarrollar alimentos simbióticos. El empleo de *films* de metilcelulosa con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* CIDCA 333 y *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 como probióticos y fructooligosacáridos (FOS) como prebióticos, permiten una mayor estabilidad de los microorganismos durante periodos más largos a humedades mayores [35]. Otros autores llevaron a cabo la formación de *films* con gelatina que contenían *Lactobacillus rhamnosus* GG y cuatro compuestos con carácter prebiótico: inulina, polidextrosa,

glucooligosacáridos (GOS) y dextrina, generándose una estructura en el *film* más uniforme gracias al efecto de los probióticos, el cual estaba protegido gracias a la presencia fundamentalmente de inulina [36]. El uso de recubrimientos de alginato de sodio los cuales contienen *Lactobacillus rhamnosus* GG en pan también han permitido observar un aumento de la viabilidad del microorganismo tras 4-7 días de almacenamiento y una menor pérdida de la viabilidad de la cepa probiótica tras un ensayo de digestibilidad *in vitro* [37]. El alginato de sodio es uno de los materiales más empleados para la formación de *films* usándose también en queso *Fiordilatte* simbiótico el cual contiene *Lactobacillus rhamnosus* y FOS, manteniendo la viabilidad del microorganismo en 10^7 UFC/g y produciéndose gracias a la adición de probióticos y prebióticos un efecto antimicrobiano contra *Pseudomonas* spp. y enterobacterias, lo cual mejoró el sabor final del producto y prolongó su vida útil [38].

4. Técnicas de análisis y control de los productos elaborados.

En el trabajo desarrollado se prepararon quesos con recubrimientos con LB y *L. plantarum* CECT 9567 con el objetivo de desarrollar un nuevo alimento simbiótico funcional. Para la caracterización de estos nuevos alimentos y la viabilidad de los microorganismos, se emplearon diferentes métodos de análisis.

4.1. Texturometría.

Las características más importantes de los alimentos vienen determinadas por las propiedades que son captadas por los sentidos, es decir, por sus propiedades organolépticas. Dentro de estas propiedades se encuentran el color, sabor, olor, aroma, gusto y la textura. El análisis de la textura es un parámetro muy importante en los alimentos, ya que desde el punto de vista del consumidor es esencial en la percepción de los productos alimentarios. La manera más común de analizar la textura es mediante paneles de cata pero también existe el análisis instrumental mediante el uso de texturómetros.

La textura se puede definir como la manifestación sensorial y funcional de las propiedades estructurales, mecánicas y superficiales de los alimentos detectados a través de los sentidos de la visión, la audición, el tacto y la cinestésica. Además la textura es una propiedad con naturaleza multiparamétrica porque son varios los sentidos y receptores que permiten percibir de manera adecuada la textura, razón por la cual es necesario definir las propiedades texturales [39].

El equipo empleado para la caracterización de la textura del queso es el texturómetro como por ejemplo el TA.TX plus (Stable Micro Systems) utilizado en este trabajo el cual somete la muestra a un esfuerzo entre dos placas, una móvil y otra fija, de manera que es capaz de medir el tiempo, la fuerza y la distancia. A partir de esos parámetros se puede evaluar tanto cuantitativa como cualitativamente las propiedades texturales (firmeza, cohesividad, adhesividad, untabilidad, etc.). El analizador está formado por una base y un brazo móvil que es el encargado de transmitir la fuerza a la muestra. Cuenta con diferentes sondas y accesorios las cuales se eligen en función de los productos a analizar y del parámetro que se quiera conocer.

Tras realizar los diferentes ensayos es importante interpretar las curvas de esfuerzo y su relación con las propiedades y parámetros mecánicos. Uno de los ensayos que se puede realizar con este equipo, son ensayos de penetración (Figura 4) en los cuales la sonda entra en el interior del alimento con el objetivo de analizar la firmeza y la pegajosidad.

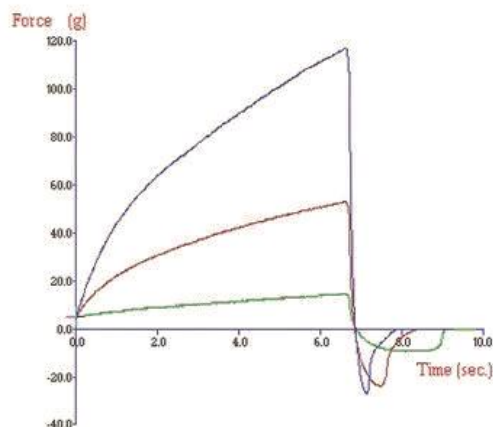


Figura 4. Ensayo de penetración.

4.2. Pruebas de digestión *in vitro*.

Las bacterias probióticas necesitan sobrevivir durante el proceso de fabricación y en el TGI superior para ejercer efectos beneficiosos en la salud de los consumidores. Su capacidad de supervivencia puede atribuirse a su tolerancia a ácidos y bilis [40]. Para evaluar su supervivencia es fundamental la realización de pruebas de digestión *in vitro* las cuales simulan los procesos de digestión y las condiciones fisiológicas *in vivo* teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas, pH, tiempo de digestión, o sal entre otros factores. Se han usado modelos estáticos de la digestión humana para abordar la digestibilidad y bioaccesibilidad (cantidad de un compuesto que se libera de la matriz y queda disponible para su absorción intestinal) de fármacos y alimentos [41].

La mayoría de estos ensayos se realizan mediante modelos de digestión *in vitro* estáticos, en los que se simula la digestión en el estómago e intestino delgado en pasos consecutivos. En cada paso el sustrato es incubado durante un tiempo específico con los jugos gástricos estomacal e intestinal. El uso de estas técnicas permite pruebas de alto rendimiento, pero con poco rango de aplicabilidad y además estos métodos no tienen en cuenta las complejas interacciones entre los alimentos y el cuerpo, considerándose uno de los principales inconvenientes [41].

Estos ensayos suelen incluir fase oral, gástrica e intestinal. Resulta fundamental picar los alimentos que serán sometidos a una prueba de digestión, así como mezclados con saliva artificial que permita una leve digestión del alimento antes del paso gástrico. Durante la fase gástrica el alimento se mezcla con el jugo gástrico el cual contiene enzimas, como pepsina, lipasa gástrica o amilasa, y ácido clorhídrico. Los métodos de digestión *in vitro* estáticos utilizan una mezcla gástrica diluida y bien homogeneizada y con un correcto ajuste de pH para que las enzimas actúen de manera correcta a sus pH óptimos. En general el pH gástrico se mantiene en torno a 2-3. Finalmente, en la fase intestinal el quimo pasa gradualmente al duodeno donde se neutraliza con bicarbonato y se mezcla con bilis y jugo pancreático [42].

Diversos estudios han evaluado el comportamiento de microorganismos probióticos a través del tracto gastrointestinal, mostrando que aproximadamente un 10 – 30% sobreviven. Su viabilidad depende del tipo de probiótico, de su estado de crecimiento

(siendo más susceptibles en fase logarítmica que en estacionaria) y de la protección que tengan gracias a la aplicación de técnicas como *films* o microencapsulación [40].

4.3. Microscopía de fluorescencia.

La fluorescencia es un fenómeno físico por el cual ciertas moléculas (fluorocromos) emiten luminiscencia tras ser excitadas previamente por un haz de luz de una determinada longitud de onda. En base a esto, la microscopía de fluorescencia es una herramienta de gran utilidad científica para la visualización y estudio de la localización celular de estructuras biológicas que han sido previamente etiquetadas con fluorocromos. Las moléculas marcadas con fluoróforos brillan y son fácilmente distinguibles de las señales de fondo. Esta propiedad óptica hace que sea sencillo obtener imágenes de las moléculas marcadas con alto contraste [42] [43].

Existe gran variedad de fluorocromos diferentes y todos ellos vienen definidos por un espectro de excitación y otro de emisión característicos. El espectro de excitación muestra la intensidad de la emisión fluorescente a diferentes longitudes de excitación, mientras que el espectro de emisión muestra la intensidad de la fluorescencia de emisión a diferentes longitudes de onda cuando se excita con la longitud máxima [44].

El microscopio usado en fluorescencia incorpora una lámpara especial que actúa emitiendo una luz excitadora de los fluoróforos con los que se tiñen las muestras a observar y posee además un filtro especial que permite el paso de la luz emitida por el fluoróforo. Existen dos tipos fundamentales de microscopios en fluorescencia: microscopio de fluorescencia convencional y el microscopio confocal espectral. Ambos tipos de microscopios presentan elementos básicos que permiten la detección de las señales de fluorescencia: fuente de excitación, filtro de excitación, espejo dicróico, filtro de emisión, objetivos, prisma y sistemas detectores (Figura 5) [44].

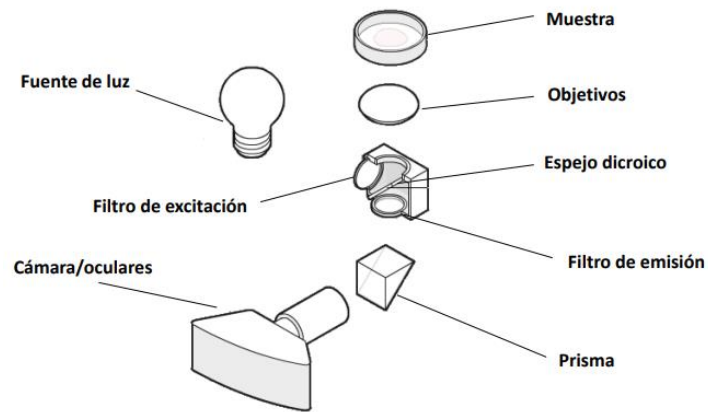


Figura 5. Componentes del microscopio de fluorescencia [44].

Son diversas las aplicaciones de este tipo de microscopía. Permite la visualización de partes celulares (membrana plasmática, núcleo, vacuolas, etc.), el estudio de procesos celulares (división celular, muerte celular, cambios en el potencial de membrana, endocitosis y exocitosis), la localización de moléculas específicas (proteínas, lípidos, etc.), la diferenciación de partículas pequeñas o el estudio de la interacción entre moléculas *in vivo* [44].

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismo probiótico y condiciones de cultivo.

Como microorganismo probiótico se empleó la cepa *Lactobacillus Plantarum* CECT 9567. Para la recuperación de la cepa se resuspendió el liófilo en medio MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, Sigma-Aldrich, Alemania) hasta conseguir una rehidratación completa. Tras incubarlo durante 24 horas a 37°C se realizó una siembra por estría para conseguir colonias aisladas. Una vez se recuperó la cepa se realizó un stock de la misma para usos posteriores (glicerol 40% v/v mantenida a -20°C).

Para conocer la relación entre la densidad óptica ($DO^{600\text{ nm}}$) y las UFC/mL en el cultivo se realizó una curva de crecimiento. Los matraces de MRS líquido (Sigma-Aldrich) tenían una proporción 1:5 v/v de oxígeno debido al carácter aerobio del microorganismo. Los matraces se incubaron a 37°C y 200 rpm. Se tomaron muestras en diferentes tiempos y se sembraron diluciones seriadas (1:10). Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas.

2. Elaboración de queso.

Para la elaboración de los quesos se empleó leche cruda de cabra de la variedad Murciano-Granadina procedente de una granja local en San Martín del Rey Aurelio (Asturias, España). La leche se pasteurizó mediante el proceso LTLT (*low temperature long time*) a 65°C durante 30 minutos. Este suave proceso de pasteurización permite que sobrevivan algunas BAL por lo que no fue necesario usar un cultivo iniciador. Posteriormente la leche fue almacenada en refrigeración (4°C) hasta su uso. Para la elaboración de los quesos la leche fue calentada a 34°C, temperatura a la cual se añadió el cuajo (Chy-Max® CHR-Hansen, Dinamarca), previamente disuelto en agua, en concentración de 0,0225 g/L. Tras 40 minutos se obtiene la cuajada, que fue cortada varias veces para favorecer la sinéresis hasta obtener el tamaño adecuado de grano. Cada queso se elaboró con 30 g de cuajada que fue prensada manualmente hasta obtener la textura apropiada (Figura 6).



Figura 6. Quesos elaborados.

3. Preparación de las soluciones formadoras de *film* y sistema de muestreo.

Los quesos elaborados se dejaron reposar una hora a 4°C y a continuación se recubrieron con la solución formadora de *film*. Se elaboran un total de 42 quesos, distribuidos de la siguiente manera:

Tabla 2. Características de las soluciones formadoras de *film*.

Queso	Alginato y glicerol	LB	<i>L. plantarum</i>
Control negativo	No	-	-
Control negativo	Si	-	-
Queso prebiótico 1	Si	2%	-
Queso prebiótico 2	Si	4%	-
Queso probiótico	Si	-	10 ⁹ UFC/ml
Queso simbiótico 1	Si	2%	10 ⁹ UFC/ml
Queso simbiótico 2	Si	4%	10 ⁹ UFC/ml

Para la solución formadora de *film* se disolvieron 20g/L de alginato de sodio (Sigma-Aldrich) en agua destilada. La disolución se calentó a 70°C y se mantuvo en agitación a 700 rpm hasta obtener un color claro y homogéneo. A continuación, se añadió glicerol en una concentración de 15 g/L y la disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente. El LB (Sigma-Aldrich) se añadió a la solución final en una concentración de 20 g/L y 40 g/L, respectivamente, y se homogeneizó en la disolución con una agitación de 500 rpm a temperatura ambiente. El probiótico se añadió en la solución formadora de *film* en

una concentración de 10^9 UFC/mL, habiéndose obtenido previamente la curva de crecimiento de *L. plantarum* CECT 9567 para conocer la relación entre DO y UFC/mL.

Una vez obtenidas las soluciones formadoras de *film* se sumergieron los quesos durante 2 minutos. Se dejaron reposar 1 minuto a temperatura ambiente, eliminando el exceso de solución formadora de *film*. Para endurecer el *film* los quesos fueron sumergidos 2 minutos en disolución de CaCl_2 (Merk KGaA, Darmstadt, Alemania) 5% p/v. Finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos (Figura 7) y a continuación fueron almacenados a 4°C .

La evolución del queso simbiótico se siguió durante 15 días, tomándose muestra en el tiempo 0, y los días 1, 3, 6, 10 y 15. El muestreo se realizó de la siguiente manera. Se tomó el *film* de cada uno de los diferentes quesos y se lavó con agua destilada estéril con el objetivo de eliminar otras BAL presentes de manera natural en el queso. Los *films* se introdujeron en una bolsa de Stomacher™ (Seward, Reino Unido) con 1 mL de agua destilada y se calentaron durante 30 minutos a 40°C para deshacer el film lo máximo posible. Para estudiar la evolución del crecimiento microbiano se sembraron diluciones seriadas (1:10) en medio MRS (Sigma-Aldrich) y las placas se incubaron durante 48 horas en la estufa a 30°C .



Figura 7. Queso recubierto con *film*.

4. Caracterización de los quesos simbióticos.

4.1. Propiedades mecánicas: textura.

La textura de los quesos elaborados se analizó empleando el texturómetro TA.XTplus Texture Analyzer (Stable Systems, Godalming, Surrey, Reino Unido) (Figura 8). Los quesos fueron analizados mediante un ensayo de penetración con una velocidad de 2 mm/s y una penetración de 15 mm, habiéndose calibrado previamente a 30 mm la altura de la sonda. Este ensayo permite conocer los parámetros de firmeza (resistencia a la deformación) y pegajosidad (resistencia a la modificación de la estructura) de las muestras. Se empleó una sonda esférica P/0,5S (Figura 9) y una célula de carga de 5 kg. Se empleó el programa *Cheese Triangle* y el software *Exponent* para analizar los resultados obtenidos.



Figura 8. Texturómetro TA.TX plus (Stable Micro Systems)



Figura 9. Sonda P/0,5 S.

4.2. Pruebas de digestibilidad.

La prueba de digestibilidad se realizó sobre los quesos probióticos y los quesos simbióticos 1 y 2 (Tabla 2). Además, como control positivo, se emplearon dos concentraciones diferentes de probiótico (10^4 y 10^9 UFC/ml) que no estaban protegidas por ningún tipo de recubrimiento o *film*. El jugo gástrico estomacal (JGE) se preparó con KCl 0,517 g/L, KH_2PO_4 0,123 g/L, NaHCO_3 2,106 g/L y NaCl 2,75 g/L; mientras que el jugo gástrico intestinal (JGI) se preparó con KCl 0,509 g/L, KH_2PO_4 0,110 g/L, NaHCO_3 11,68 g/L y NaCl 2,24 g/L.

La digestibilidad se llevó a cabo con el *film* que recubría cada uno de los quesos, tomándose una cantidad de *film* equivalente a una superficie de 20 cm^2 . En el caso de los microorganismos sin *film* se tomó un volumen de medio de cultivo equivalente a 10^4 y 10^9 UFC/mL. El ensayo se desarrolla en tres etapas (Figura 10). En la primera etapa, todas las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en 20 mL de agua destilada. La segunda etapa se corresponde con la simulación estomacal en la que se añadieron 18,4 mL de JGE, 1,6 mL de pepsina porcina 25.000 U mL^{-1} (elaborada con el stock de JGE), $5 \mu\text{L}$ de CaCl_2 0,3 M, se ajustó el pH a 3,0 con HCl 1 M y se dejó 90 minutos a 37°C con una agitación (50-100 rpm). La tercera etapa se corresponde con la fase intestinal. Sobre las muestras con la fase estomacal se añadieron 12,5 mL de JGI, 5 mL de pancreatina 800 U mL^{-1} (elaborada con el stock de JGI), 2,5 mL de bilis fresca, $40 \mu\text{L}$ de CaCl_2 , se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 1M y se mantiene 120 minutos a 37°C y 50 rpm. En cada una de las etapas se tomó muestra para comprobar la viabilidad del probiótico sembrando en placas de MRS diluciones seriadas 1:10, que se mantuvieron en la estufa a 30°C durante 48 horas.

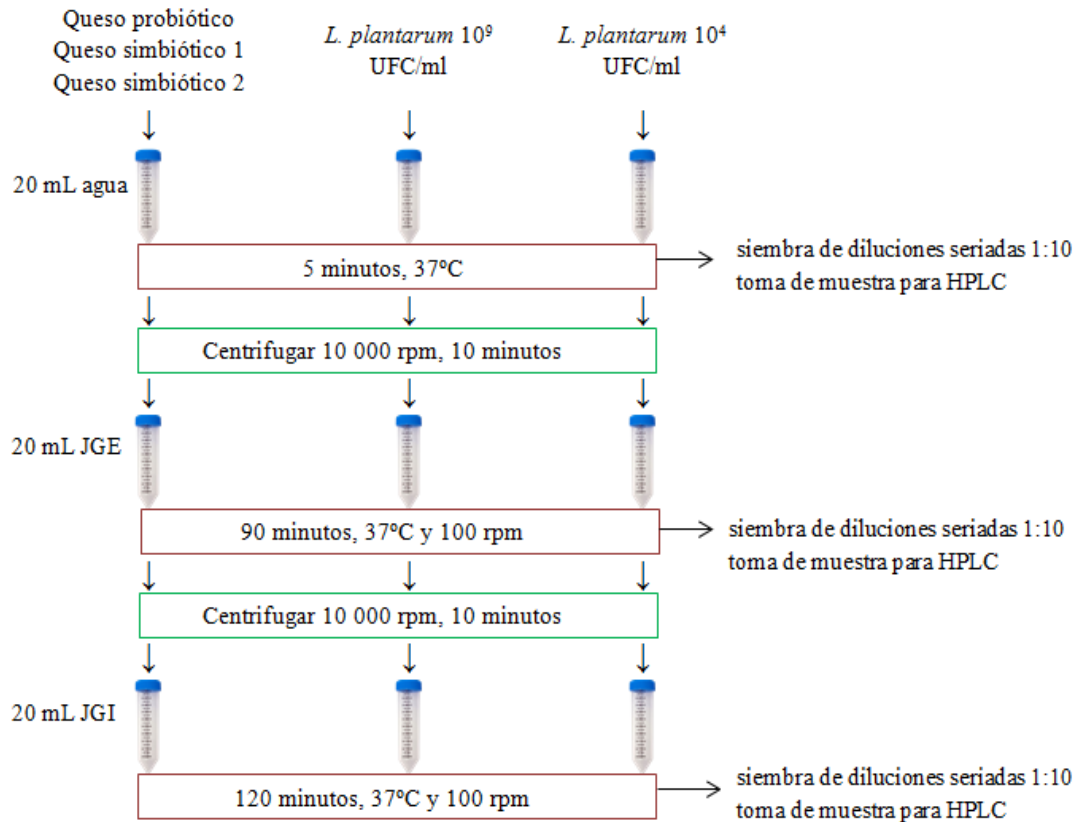


Figura 10. Simulación del TGI para la evaluación de microorganismos viables.

4.3. Análisis morfológico.

Las bacterias fueron observadas en el interior del *film* empleando la técnica de microscopía de fluorescencia. Para ello, se tomó un fragmento del *film* que recubría el queso probiótico, los quesos simbióticos 1 y 2, así como un queso control, recubierto exclusivamente con la solución formadora de *film*. Estos fragmentos fueron lavados con agua destilada dos veces y a continuación se incubaron en una disolución que contenía naranja de acridina (Sigma-Aldrich) al 0,1% disuelta en un tampón fosfato 67 mM pH 6,0 durante 1 minuto. Por último, se incubaron durante 30 segundos en una solución de CaCl₂ 100 mM. Los *films* fueron secados, se montaron en un portaobjetos y fueron sellados. El microscopio empleado fue el microscopio láser confocal espectral Leica TCS-SP-AOBS, empleando una longitud de onda de excitación de 480 nm, emitiendo en el rango de 508 a 603 nm. Se tomaron fotografías en el tiempo 0 (día de elaboración de los quesos) y 7 días después para observar posibles diferencias.

RESULTADOS

1. Crecimiento y viabilidad de *Lactobacillus plantarum* CECT 9567 en los *films*.

Para conocer la relación entre la DO^{600nm} y las UFC/mL se realizó la curva de crecimiento del microorganismo en MRS (Figura 11). Esta información es necesaria para conocer la carga microbiana que se añadirá posteriormente en los recubrimientos alimentarios.

Para ello, se tomaron muestras de MRS líquido inoculado con *L. plantarum*, midiendo su DO^{600nm} y sembrando diluciones seriadas 1:10 (incubadas a 30°C durante 48 horas). En la Figura 13 se puede observar la curva de crecimiento. En ella, se puede ver que la fase de latencia dura unas 7 horas, tiempo a partir del cual el microorganismo comienza a crecer de manera exponencial hasta llegar a la fase estacionaria a las 20 horas. Tras este tiempo, y debido a la falta de nutrientes del medio, comienza la fase de muerte o declive. Tras obtener la curva de crecimiento, la relación que se obtuvo fue la siguiente: para una DO^{600nm} de 1, se tienen $6,83 \cdot 10^8$ UFC/mL.

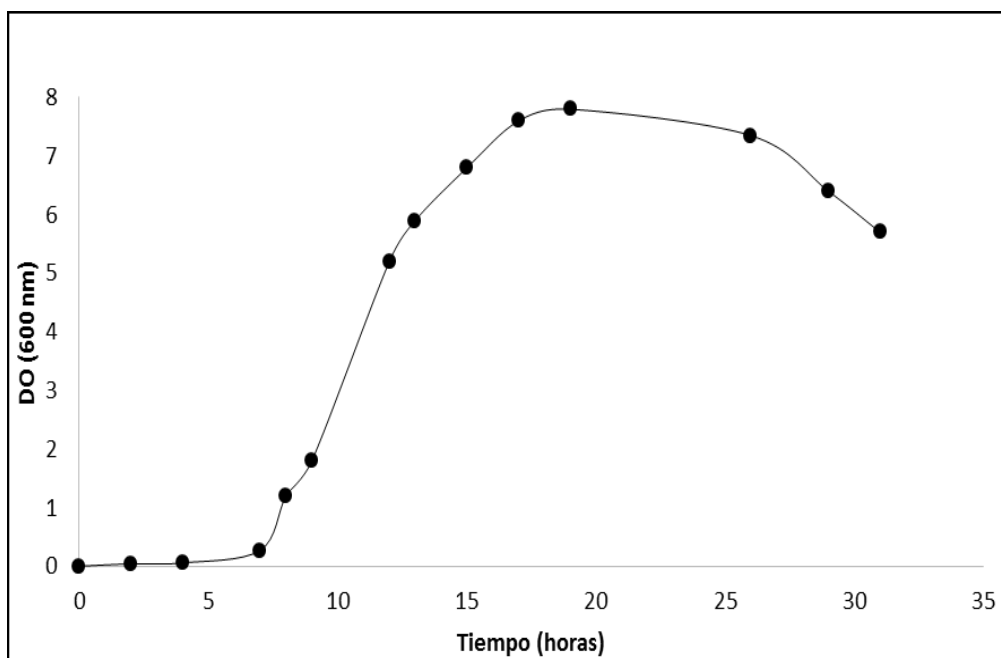


Figura 11. Curva de crecimiento de *L. plantarum* CECT 9567 en fase líquida.

Conocer la relación entre la DO^{600} y las UFC/mL permitió añadir una concentración de 10^9 UFC/ml en la solución formadora de *film*, valor por encima del límite establecido para que un alimento se le otorgue carácter probiótico. Tras recubrir los quesos se

analizó la viabilidad de *L. plantarum* a lo largo del tiempo, tomándose muestra el mismo día de la elaboración del queso y los días 1, 3, 6, 10 y 15.

En las Figuras 14 y 15 se muestra la evolución de *L. plantarum* durante el periodo de almacenamiento, a 4°C, en los tres tipos de *film* (Tabla 3). La Figura 12 muestra las UFC totales mientras que la Figura 13 las UFC/g.

Tabla 3. Quesos con *L. plantarum*.

Queso	Alginato y glicerol	LB	<i>L. plantarum</i>
Queso probiótico	Si	-	10 ⁹ UFC/ml
Queso simbiótico 1	Si	2%	10 ⁹ UFC/ml
Queso simbiótico 2	Si	4%	10 ⁹ UFC/ml

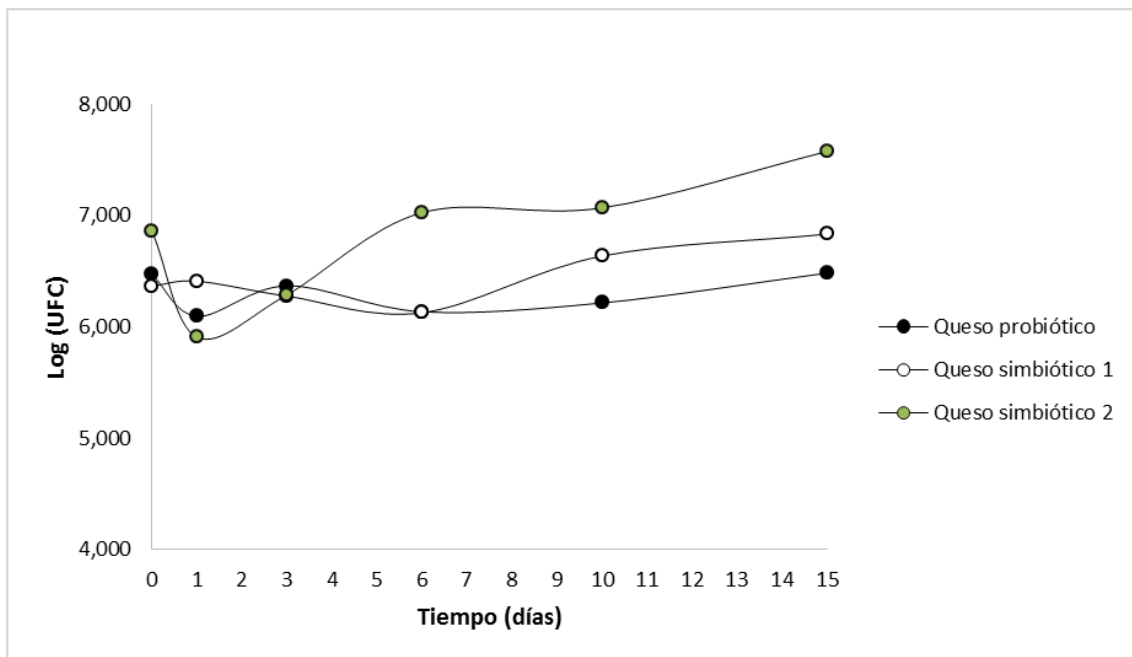


Figura 12. UFC totales en los *films* con *L. plantarum*.

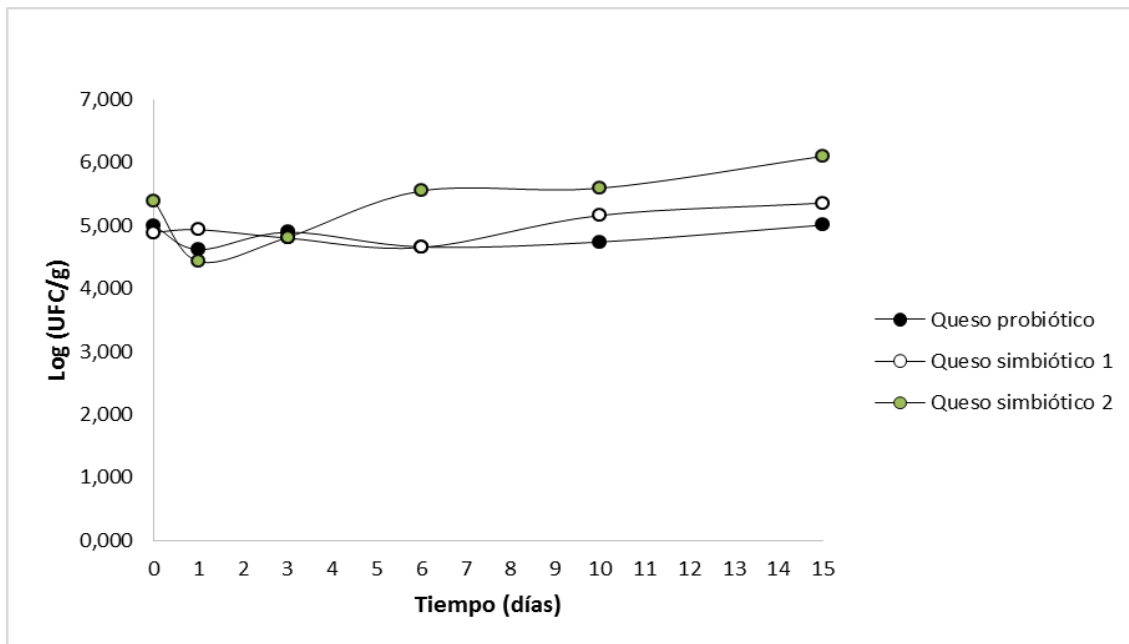


Figura 13. UFC/g en los *film* con *L. plantarum*

Se observó una disminución de la viabilidad de *L. plantarum* al inicio del experimento. Esto puede deberse a la necesidad de adaptación del microorganismo al nuevo ambiente que supone el *film*, al igual que ocurrió en otro estudio donde la concentración de *L. acidophilus* disminuyó al inicio, por la adaptación al *film* de alginato [45]. La viabilidad de *L. plantarum* durante el almacenamiento se vio influenciada por la composición de los diferentes tipos de *films*. En los *films* probióticos su viabilidad aumentó a lo largo del tiempo, obteniéndose al final del periodo de almacenamiento valores de 10^5 UFC/g en los quesos con *L. plantarum*. Sin embargo, teniendo en cuenta las UFC totales por 30 g de queso, se presentan 10^6 UFC. Cabe destacar que el recuento de microorganismo no muestra la cantidad real, ya que los *films* de alginato mostraron dificultades para deshacerse, quedando microorganismos sin contar. En otros estudios previos se demostró que la viabilidad de los microorganismos en *films* resulta favorable. En ellos, el uso de *films* de alginato y gellan (polisacárido obtenido de la fermentación bacteriana del almidón) permitió mantener la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 en papaya y manzana frescas durante 10 días de almacenamiento a 2°C, con valores comprendidos entre 10^6 y 10^7 UFC/g [34]; al igual que ocurre con el desarrollo de *films* de metilcelulosa con *L. plantarum* en manzanas, donde se observa que tras 90 días de almacenamiento el recuento total del microorganismo se mantiene por encima del mínimo necesario (10^7 UFC/g) para considerarse alimento probiótico [46]. En otros productos como el jamón, los *films* de

alginato permitieron mantener valores de *L. plantarum* B282, *L. plantarum* L125 y *L. pentosus* L33 superiores a 10^6 UFC/g durante los 70 días de almacenamiento de las muestras [31]. Por tanto, los *films* parecen ser un medio adecuado para la supervivencia de los microorganismos probióticos.

Por otro lado, en el presente trabajo se observó una mayor viabilidad de *L. plantarum* en los quesos simbióticos 1 y 2 los cuales contenían LB. Con un 2% de LB se obtuvieron 10^5 UFC/g y 10^6 UFC totales, valores similares a los obtenidos en el film probiótico. Sin embargo, una mayor concentración de LB (4%) resulta positiva, obteniéndose un aumento de la carga microbiana. Al final del periodo de almacenamiento, se obtuvieron 10^6 UFC/g y 10^7 UFC totales. El uso de LB como agente prebiótico resulta efectivo para la funcionalización de los quesos al tener un efecto positivo aumentando la viabilidad y cantidad del probiótico. En otros estudios se obtuvieron resultados similares, por ejemplo, en queso *Fiordilatte* en el cual la concentración de BAL durante el almacenamiento se mantuvo por encima de 10^7 UFC/g, gracias a la presencia de fructooligosacáridos (FOS) como prebiótico, que permitieron mejorar la supervivencia del probiótico, ya que los FOS sirven como sustrato para estos microorganismos [38]. El mismo efecto sinérgico de los prebióticos se observó en arándanos recubiertos con *films* de alginato los cuales incorporan *L. rhamnosus* como cepa probiótica y FOS como prebióticos, con recuentos de $1,58 \cdot 10^6$ UFC/g [47].

La concentración establecida legalmente para que un producto alimentario sea considerado como probiótico está comprendida entre 10^6 - 10^8 UFC/g en el momento de su consumo. De acuerdo con estos valores, al inicio del periodo de almacenamiento los quesos no pueden considerarse probióticos. Sin embargo al final del periodo de almacenamiento los quesos si pueden considerarse probióticos, teniendo en cuenta las UFC totales por cada queso. Los quesos simbióticos demuestran un efecto favorable en el desarrollo de *L. plantarum* gracias a la adición de LB. Cuanto mayor es la concentración de LB en los *films* mayor es el desarrollo del microorganismo. Los quesos simbióticos con un 4% de LB presentan potencial probiótico al contener 10^6 UFC/g pasados 15 días de almacenamiento.

Teniendo en cuenta la ingesta recomendada de queso fresco, 80-125g/día [48], tanto el queso probiótico como los quesos simbióticos presentan carácter probiótico. Con una

ingesta de 100g de estos quesos al final del periodo de almacenamiento se consiguen concentraciones de 10^6 y 10^8 UFC para el queso probiótico y simbiótico 1 y simbiótico 2 respectivamente. Incluso con una ingesta de 30g, es decir, ingiriendo uno de los quesos elaborados también se consideran probióticos (10^6 UFC para queso probiótico y simbiótico 1 y 10^7 UFC para queso simbiótico 2). Una recomendación similar se observa en zanahorias con *films* de alginato los cuales contienen *L. acidophilus*, recomendando una ingesta diaria de 77g del producto [45].

2. Caracterización de los quesos simbióticos.

El recubrimiento con *films* de alginato, que contienen una cepa probiótica y un compuesto prebiótico, permite obtener un nuevo tipo de alimento funcional. A la hora de elaborar un nuevo tipo de alimento es muy importante caracterizar sus diferentes propiedades, entre ellas la textura, el cual es un parámetro esencial para la aceptación por parte de los consumidores. En el caso de los recubrimientos, es necesario conocer la capacidad y viabilidad de la cepa probiótica para llegar al TGI, donde ejercerá su efecto beneficioso sobre el huésped.

2.1. Caracterización textural de los quesos simbióticos.

A la hora de elaborar nuevos alimentos es fundamental estudiar y analizar su estructura para conocer y mejorar la textura y poder crear alimentos que sean atractivos para los consumidores. La texturometría permite medir diferentes parámetros, entre ellos, la firmeza y pegajosidad de las muestras. Los quesos simbióticos elaborados están recubiertos por un *film* que contiene conjuntamente la cepa probiótica y LB como compuesto prebiótico. Inicialmente, la incorporación de probióticos y prebióticos no debería afectar a las propiedades texturales de los quesos. Para conocer las diferencias entre los quesos elaborados con diferentes tipos de *film*, se analizó su textura, así como la de controles negativos (quesos sin recubrimiento) con el texturómetro TA.XT.plus. Se llevó a cabo un ensayo de penetración que permitió obtener datos sobre la firmeza y pegajosidad de los estos quesos.

Los valores obtenidos de firmeza se muestran en la Figura 14. Los quesos recubiertos, independientemente del tipo de recubrimiento que tienen, presentan una firmeza mayor que los controles negativos. En cuanto a la dureza del queso, ésta generalmente aumenta con el tiempo como resultado de la pérdida de agua y la proteólisis [49]. En el trabajo actual, se observó que los quesos recubiertos con *film* de alginato sin *L. plantarum* y sin LB tienen una firmeza mayor que los films prebióticos los cuales contienen LB en dos concentraciones diferentes (2 y 4%). Una posible explicación puede ser la capacidad que tiene el ácido lactobiónico de retener agua [23], generando *films* más hidratados que disminuyen la firmeza en la superficie de los quesos. La firmeza entre los quesos prebióticos (LB) y los simbióticos (LB y *L. plantarum*) no muestra grandes diferencias. Lo que se puede observar, al igual que en los quesos recubiertos con *films* prebióticos, es que con un 4% de ácido lactobiónico la firmeza del *film* es menor. La reciente formación del *film* hace que en el tiempo 0 los quesos presenten una firmeza menor; sin embargo, con el paso del tiempo la firmeza aumenta ligeramente por la pérdida de humedad de los *films*. Los valores de pegajosidad de los quesos se muestran en la Figura 15. Se obtuvieron valores más variables, teniendo en cuenta las diferencias existentes en la sujeción del queso a la hora del despegue de la sonda de la superficie de estos.

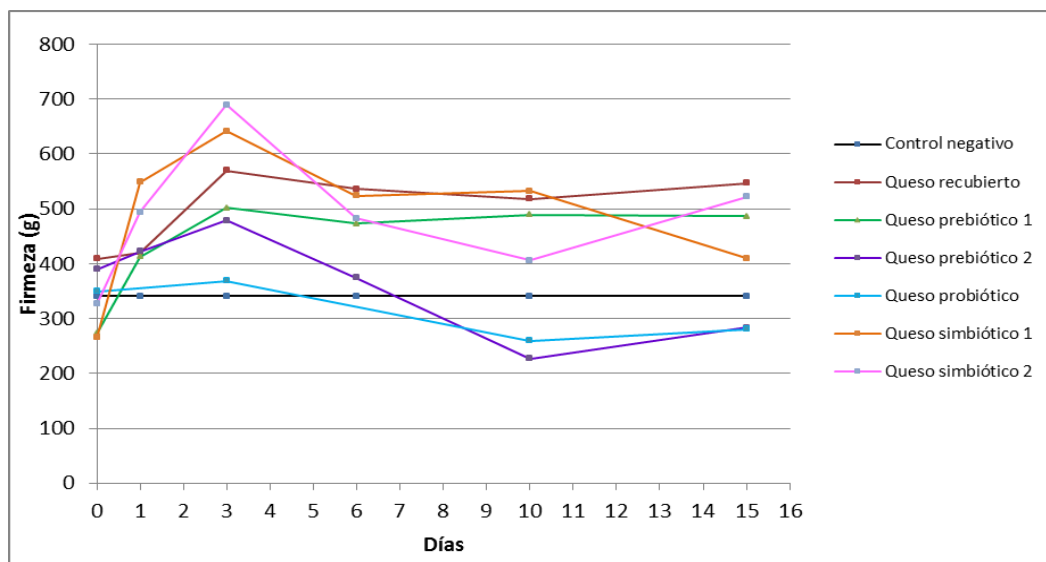


Figura 14. Firmeza de los quesos (g)

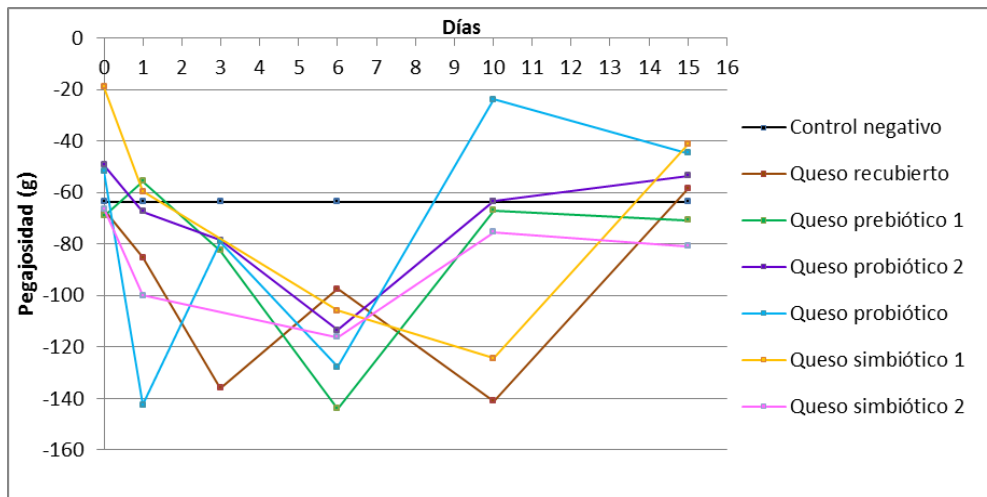


Figura 15. Pegajosidad de los quesos (g)

El recubrimiento de los quesos con *films* de alginato no afecta en gran medida a la textura de los quesos. Las leves diferencias observadas pueden deberse a la elaboración artesanal de los quesos, los cuales fueron prensados manualmente teniendo algunos una mayor consistencia de otros. También variaciones en el tiempo de inmersión de los quesos en la solución de CaCl_2 puede generar cambios en su textura, ya que el uso de calcio induce cambios conformacionales en la estructura del alginato, dando lugar a *films* más rígidos y densos [5].

En otros estudios, los quesos recubiertos con *films* a base de proteínas de suero lácteo presentaron una menor firmeza que los quesos sin recubrir, al contrario que en el presente trabajo, pero no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tipos de recubrimiento (*film* con ácido láctico, *film* con quitooligosacáridos y *film* con ácido láctico y quitooligosacáridos). También se observó una menor firmeza en el tiempo 0, la cual fue aumentando durante el tiempo de almacenamiento por una pérdida de humedad [50]. En queso *Ricotta* recubierto con un *film* de proteínas de suero y quitosano tras el análisis sensorial se dedujo que no había diferencias significativas en cambios en la textura, manteniendo mejor textura el queso recubierto [51]. En quesos bajos en grasa también se observó un ligero aumento de la dureza con el tiempo como resultado de la pérdida de agua [52]. También se observan valores de firmeza menores en quesos *Fiordilatte* sin recubrir frente a los recubiertos con un *film* a base de proteína de suero [53].

2.2. Digestibilidad de los *films* simbióticos.

Es necesario simular las condiciones de digestibilidad mediante un ensayo de digestibilidad para conocer la viabilidad de *L. plantarum* y la degradación de LB a través de su paso por el TGI. Para este ensayo se seleccionaron los *films* con *L. plantarum*, es decir, el *film* probiótico y los quesos simbióticos 1 y 2 (Tabla 3). Se usó también como control positivo *L. plantarum* incubado en medio MRS líquido, con dos concentraciones diferentes, 10^9 y 10^4 UFC/mL.

La digestibilidad de los *films* y del microorganismo probiótico sin protección se muestra en la Figura 16. La primera etapa (fase 1) fue un lavado con agua destilada, que sirvió para determinar la cantidad de microorganismo existente antes de llevar a cabo el ensayo de digestibilidad. En esta fase se obtuvieron valores de 10^6 UFC/mL en los *films*, y valores de 10^7 y 10^8 UFC/mL para *L. plantarum* libre (valores para 10^4 y 10^9 UFC/mL respectivamente). Este recuento inicial es apto para considerar el potencial probiótico de los *films*. Tras someter los *films* y la cepa libre a la acción del JGE se puede observar que los *films* tienen la capacidad de proteger al microorganismo del ambiente ácido característico del estómago. *L. plantarum* libre, al no presentar protección, es degradado por este ambiente agresivo, mientras que se mantuvieron concentraciones de 10^8 y 10^9 UFC/mL en los *films* probiótico y simbióticos respectivamente. La acción del JGI sin embargo no resulta tan favorable, debido al cambio drástico de condiciones, debido a la presencia de otras enzimas digestivas que afectan más al microorganismo. Los *films* probióticos al final del ensayo de digestibilidad muestran valores de 10^2 UFC/mL, mientras que los *films* simbióticos 1 y 2 presentan valores de 10^3 y 10^4 UFC/mL respectivamente. Los resultados finales dejan ver una mayor supervivencia de *L. plantarum* en los *films* simbióticos, sobre todo en el simbiótico 2 (con un 4% LB), resultados que concuerdan con la viabilidad del microorganismo (Figuras 14 y 15). Los *films* son una buena estrategia para la protección de *L. plantarum*, manteniendo su viabilidad al ser expuestos al pH ácido que presenta el JGE, pero mostrándose una pérdida de viabilidad ante la acción del JGI, bilis y pancreatina. Por ello, resulta favorable el uso de *films* ya que el microorganismo no es degradado por completo como ocurre en el caso de la cepa sin protección.

Teniendo en cuenta la ingesta recomendada de queso fresco al día, 80 – 125g [51], con una ingesta de 100g de queso recubierto con el *film* simbiótico 2 se conseguirían 10^6 UFC tras el paso por el TGI, siendo esta cantidad de queso la óptima para conseguir un efecto probiótico y que tenga efectos beneficiosos en el consumidor.

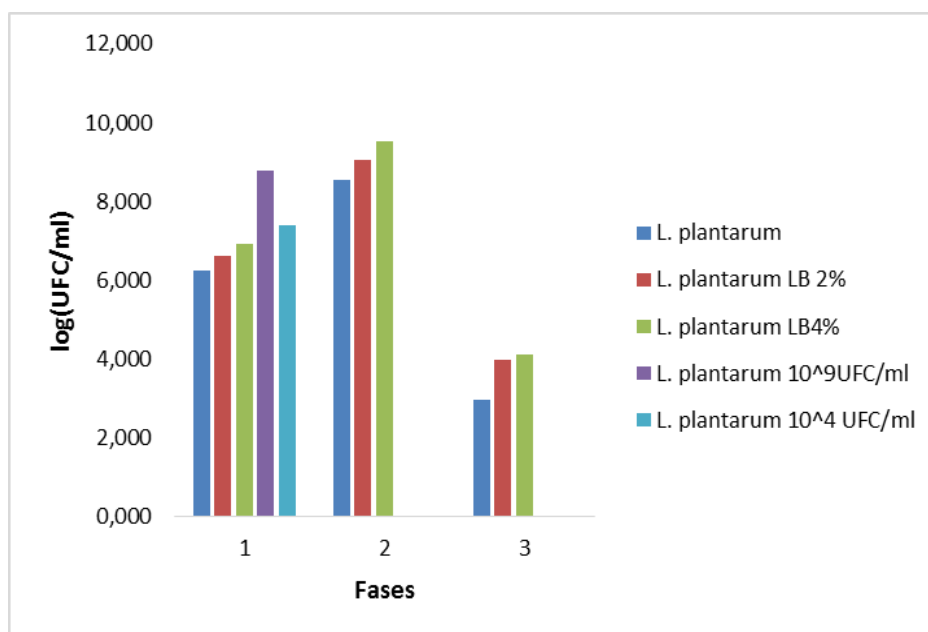


Figura 16. Viabilidad de *L. plantarum* tras la prueba de digestibilidad.

Estudios previos demuestran el efecto beneficioso que tienen los *films* en la protección de las cepas usadas como agentes probióticos. La simulación de condiciones gastrointestinales sobre *L. plantarum* CIDCA 83114 contenido en *films* de metilcelulosa demuestran que tras la digestión *in vitro* la carga de lactobacilos fue suficientemente alta (10^6 UFC/g) para asegurar que la ingesta de 25g de snack de manzana permite alcanzar una concentración requerida de microorganismos en el intestino para ejercer un efecto beneficioso [46]. En otras matrices alimentarias, como el pan, en el cual se emplearon *films* de alginato de sodio que sirven de vehículo para *L. rhamnosus* GG los resultados también dejaron ver el carácter protector de estos recubrimientos. La digestión de *L. rhamnosus* GG sin protección mostraron su debilidad ante las condiciones gastrointestinales simuladas, pero la inclusión de la cepa en los *films* de alginato proporcionó una protección significativa de *L. rhamnosus* GG, con valores por encima del mínimo requerido para rebanadas de 30 – 40 g [37]. También ha sido estudiada la capacidad de *films* de proteína de suero y de kefirán (polisacárido presente

en granos de Kéfir) como materiales para proteger a cepas probióticas a través del TGI. *L. paracasei* CIDCA 8339 no es viable tras la simulación *in vitro* en los *films* de kefirán, pero la incorporación de este microorganismo en *films* de proteínas de suero resulta favorable, protegiéndolo de las condiciones gastrointestinales así como de otras situaciones de estrés [54].

2.3. Análisis morfológico de los *films* simbióticos.

Para observar las colonias de *L. plantarum* en el interior de los *films* se empleó la técnica de microscopía de fluorescencia. Los resultados del tiempo 0 se muestran en la Figura 17 y los resultados del tiempo 1 (7 días después) en la Figura 18.

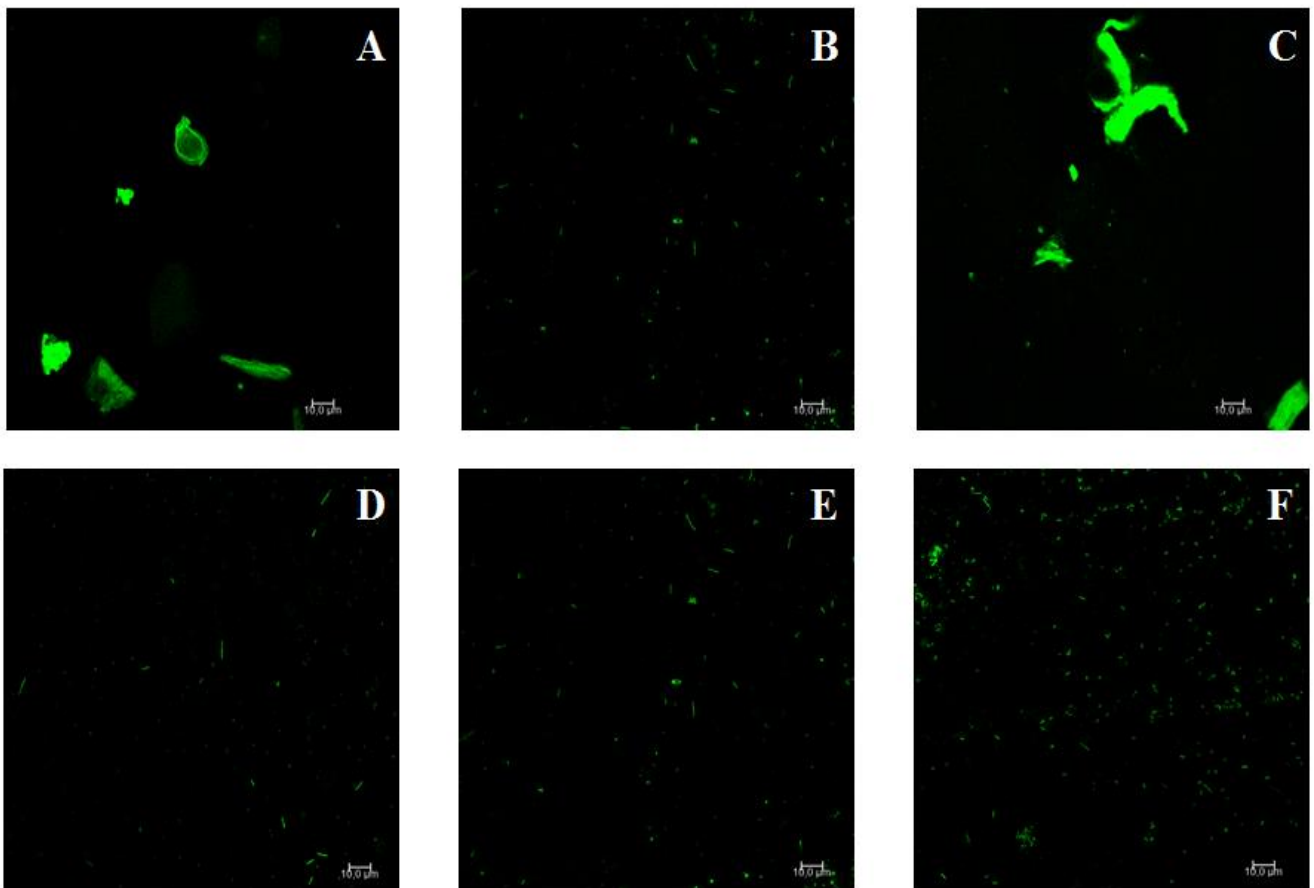


Figura 17. Imágenes del tiempo 0 obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los films.
A) Control negativo. B) *Film* prebiótico 1. C) *Film* prebiótico 2. D) *Film* probiótico. E) *Film* simbiótico 1. F) *Film* simbiótico 2.

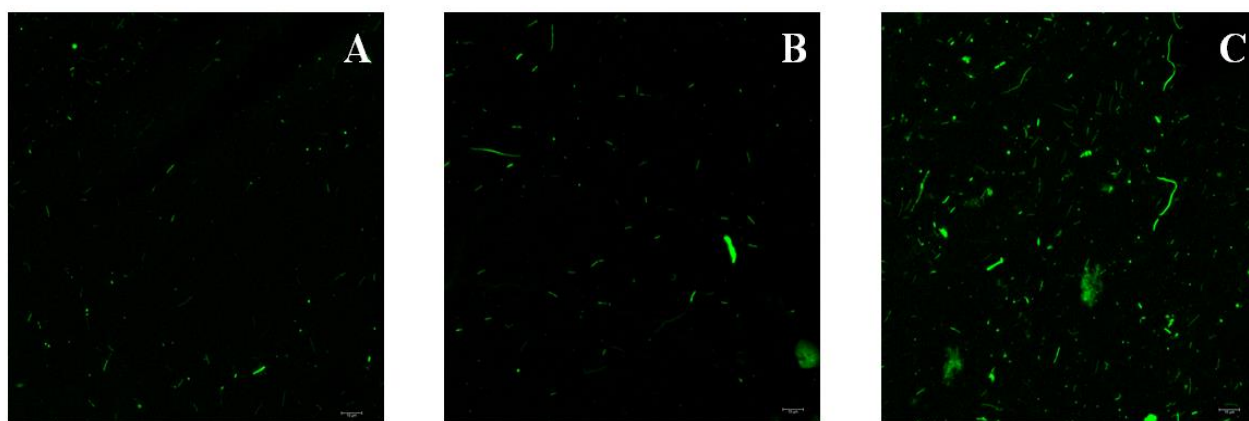


Figura 18. Imágenes del tiempo 1 obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los films a escala 10µm y longitud de onda 460 nm. A) *Film* probiótico. B) *Film* simbiótico 1. C) *Film* simbiótico 2.

Como cabe esperar, en el control negativo no se observaron *Lactobacillus*. En los controles negativos y quesos prebióticos sin *L. plantarum* se observaron artefactos de diferentes tamaños (Figura 18- imágenes A, B y C). Esto se debe a que la naranja de acridina es capaz de teñir otras estructuras como las proteínas, en este caso, las caseínas del queso, que se quedarían adheridas al *film* y que serían las estructuras más voluminosas que se observan en las imágenes. Estas estructuras también se observaron en las fotografías de los *films* probióticos y simbióticos.

En los *films* probiótico y simbióticos, tanto en el tiempo 0 como en el 1, sí se diferenciaron estructuras fluorescentes con forma de bacilo, indicando la presencia de *L. plantarum*. En el tiempo 0 se observó una mayor cantidad de *L. plantarum* en los *films* simbióticos (Figura 18- imágenes E y F) en comparación con el *film* probiótico (Figura 18- imagen C). Comparando ambos *films* simbióticos, el *film* simbiótico 2 muestra una mayor cantidad de microorganismo, resultado que concuerda con su viabilidad. La mayor concentración de LB en los *films* favorece un mayor crecimiento de *L. plantarum*, tal y como se describió en las Figuras 12 y 13.

Tras 7 días de almacenamiento, se observó una mayor cantidad de microorganismo en los *films*. Estos resultados guardan relación con la viabilidad del microorganismo (Figuras 12 y 13). Al igual que en el tiempo 0, los *films* simbióticos presentaron mayor cantidad de microorganismo que el *film* probiótico, viéndose más favorecido su crecimiento con 4% de LB; observándose una vez más el efecto sinérgico existente entre *L. plantarum* y LB.

3. Investigaciones futuras y posibles mejoras.

A partir de los datos obtenidos en este trabajo se podría realizar un estudio más conciso sobre quesos de cabra recubiertos con *films* de alginato realizando un análisis con HPLC para poder observar la evolución del LB durante el almacenamiento y observar la relación con el desarrollo del microorganismo, ya que en este trabajo, debido a problemas técnicos, no se pudo llevar a cabo.

Se podrían realizar más pruebas sobre los quesos enriqueciendo los *films* con mayor cantidad de prebiótico para poder llegar de manera más satisfactoria a los límites legales establecidos de probiótico además de probar algún método que consiga deshacer más el *film* de alginato y tener un recuento más concreto de *L. plantarum*.

A pesar de las mejoras que se pueden llevar a cabo, no queda duda que los *films* alimentarios son una gran estrategia para la protección de compuestos bioactivos, los cuales favorecen la salud de los consumidores.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este proyecto, se extrajeron las siguientes conclusiones:

- Los *films* alimentarios resultan una matriz adecuada para el mantenimiento y el crecimiento de *L. plantarum* durante un periodo de almacenamiento de 15 días. Los quesos elaborados presentan un potencial probiótico en relación con el recuento de UFC totales por cada 30 g de queso. Se observa un efecto sinérgico entre *L. plantarum* y el LB, beneficiando mayores concentraciones de LB al crecimiento del microorganismo. Al final del periodo de almacenamiento los quesos simbióticos 2 con un 4% de LB presentaron potencial probiótico con valores de 10^6 UFC/g.
- El recubrimiento de los quesos con *films* permite aumentar la firmeza de los quesos en comparación con los quesos sin recubrir. Mayores cantidades de LB disminuyen la firmeza debido a su capacidad de retener agua, siendo más firmes los quesos probióticos que ambos simbióticos. Estos *films* resultan ser un medio adecuado para la protección del probiótico ya que tras el proceso de digestión *in vitro* se mantiene la viabilidad de *L. plantarum*. Se obtuvieron 10^6 UFC por cada 100 g de queso en los quesos simbióticos 2, por lo que estos pueden considerarse con potencial probiótico.
- El uso de *films* de alginato como vehículo de compuestos probióticos y prebióticos para generar quesos simbióticos permite obtener un alimento lácteo funcional novedoso dentro de un mercado que se encuentra en amplia expansión.

SIMBOLOS

Ácido lactobiónico (LB)

Bacterias del ácido láctico (BAL)

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)

Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)

Denominación de Origen Protegida (DOP)

Densidad Óptica (DO)

Fructooligosacáridos (FOS)

Galactooligosacáridos (GOS)

Generally Recognized as Safe (GRAS)

Jugo gástrico estomacal (JGE)

Jugo gástrico intestinal (JGI)

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO)

Tracto gastrointestinal (TGI)

Unidades formadoras de colonias (UFC)

BIBLIOGRAFÍA

- [1] F. Fiber, "Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos." 2007.
- [2] K. R. Pandey, S. R. Naik, and B. V. Vakil, "Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review." *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 12, pp. 7577–7587, 2015.
- [3] R. Rodríguez *et al.*, "Selección y caracterización de lactobacilos para su uso en productos lácteos probióticos." en *Microorganismos y salud: bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas*, Editorial., Editorial Complutense, Ed. Madrid, 2008.
- [4] C. García, L. Bautista, M. Rendueles, and M. Díaz, "A new synbiotic dairy food containing lactobionic acid and *Lactobacillus casei*." *Int. J. Dairy Technol.*, vol. 72, no. 1, pp. 47–56, 2019.
- [5] T. Senturk, K. Müller, and M. Schmid, "Alginate-Based Edible Films and Coatings for Food Packaging Applications." pp. 1–38, 2018.
- [6] P. J. P. Espitia, R. A. Batista, H. M. C. Azeredo, and C. G. Otoni, "Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings." *Food Res. Int.*, vol. 90, pp. 42–52, 2016.
- [7] J. M. Castro, M. E. Tornadijo, J. M. Fresno, and H. Sandoval, "Biocheese: A Food Probiotic Carrier." *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, no. October, pp. 1–11, 2015.
- [8] CODEX STAN 283, "Norma General del CODEX para el Queso." *CODEX Aliment.*, pp. 1–4, 2013.
- [9] C. Canales *et al.*, *Isbn 84-8320-321-9*. 2005.
- [10] Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, "Producción anual y destinos de la leche (todas las clases de leches) en las industrias lácteas." Año: 2017. pp. 2–6, 2017.
- [11] A. Hernandez, *Microbiología Industrial*, Universida. Costa Rica, 2003.
- [12] "Poncelet: enciclopedia del queso." [Online]. Available: <https://poncelet.es/enciclopedia-del-queso>. [Accessed: 25-May-2019].

- [13] L. Baró Rodríguez, E. López-Huertas, and J. J. Boza Puerta, “Leche y derivados lácteos.” en *Tratado de nutrición tomo II*, Panamerica., Madrid, 2010, pp. 79–102.
- [14] A. Marcos Sánchez, M. González Gross, S. Gómez Martínez, E. Nova Rebato, and E. Ramos Mosquera, “Alimentos funcionales.” en *Tratado de Nutrición Tomo III*, Panamerica., Madrid, 2017, pp. 567–568.
- [15] L. K. Sarao and M. Arora, “Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review.” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 2, pp. 344–371, 2017.
- [16] P. J. P. Espitia, R. A. Batista, H. M. C. Azeredo, and C. G. Otoni, “Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings.” *Food Res. Int.*, vol. 90, pp. 42–52, 2016.
- [17] S. E. E. Profile, “Prebiotics and probiotics : An assessment of their safety and health benefits.” no. March, 2016.
- [18] O. Papadopoulou and N. Chorianopoulos, “Production of a Functional Fresh Cheese Enriched with the Probiotic Strain Lb. Plantarum T571 Isolated From Traditional Greek Product.” *Curr. Res. Nutr. Food Sci. J.*, vol. 4, no. Special-Issue-October, pp. 169–181, 2016.
- [19] Medwave, “¿Cuándo un microorganismo se considera probiótico?.” 2007. [Online]. Available: <https://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/Cursos/3253>. [Accessed: 26-May-2019].
- [20] J. K. Isa and S. H. Razavi, “Characterization of *Lactobacillus plantarum* as a potential probiotic *in vitro* and use of a dairy product (yogurt) as food carrier.” *Appl. Food Biotechnol.*, vol. 4, no. 1, pp. 11–18, 2017.
- [21] G. Olagnero, A. Abad, and S. Bendersky, “Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos.” *Diaeta*, vol. 25, no. 121, pp. 20–33, 2007.
- [22] Y. K. Ahmad S, “Health Benefits and Application of Prebiotics in Foods.” *J. Food Process. Technol.*, vol. 06, no. 04, 2015.

- [23] S. Alonso, M. Rendueles, and M. Díaz, “Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects.” *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 8, pp. 1275–1291, 2013.
- [24] K. Goderska, “The antioxidant and prebiotic properties of lactobionic acid.” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 3737–3751, 2019.
- [25] PubChem, “Lactobionic acid.” [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactobionic-acid>. [Accessed: 12-Jun-2019].
- [26] N. Minal, Bharwade, S. Balakrishnan, N. N. Chaudhary, and A. K. Jain, “Lactobionic Acid: Significance and Application in Food and Pharmaceutical.” *Int. J. Fermented Foods*, vol. 6, no. 1, p. 25, 2018.
- [27] M.-S. M. Baldwin C, Akashe A, Zeller AL, “Mineral complexes of lactobionic acid and method of using for mineral fortification of food products.” US 2007/0026110 A1, 2007.
- [28] B. A. Koka R, Mehnert DW, Fritsch RJ, Steffan W, Habermeier P and R. M. Wolfschoon-Pombo A, “Process for manufacturing cheeses and other dairy products and products thereof.” US 6916496, 2005.
- [29] F. Contò, “Product innovation Functional Dairy Products Including Pro / Pre / Symbiotics.” pp. 215–247.
- [30] Y. A. Rodríguez R., A. F. Rojas G., and S. Rodríguez B., “Encapsulación De Probióticos Para Aplicaciones Alimenticias.” *Biosalud*, vol. 15, no. 2, pp. 106–115, 2016.
- [31] F. Pavli *et al.*, “Alginate-based edible films delivering probiotic bacteria to sliced ham pretreated with high pressure processing.” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 9, 2017.
- [32] A. E. Quirós-Sauceda, J. F. Ayala-Zavala, G. I. Olivas, and G. A. González-Aguilar, “Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review.” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 51, no. 9, pp. 1674–1685, 2014.

- [33] L. Sánchez-González, J. I. Quintero Saavedra, and A. Chiralt, “Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*.” *Food Hydrocoll.*, vol. 33, no. 1, pp. 92–98, 2013.
- [34] M. S. Tapia, M. A. Rojas-Graü, F. J. Rodríguez, J. Ramírez, A. Carmona, and O. Martín-Belloso, “Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits.” *J. Food Sci.*, vol. 72, no. 4, pp. 190–196, 2007.
- [35] N. Romano, M. J. Tavera-Quiroz, N. Bertola, P. Mobili, A. Pinotti, and A. Gómez-Zavaglia, “Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria.” *Food Res. Int.*, vol. 64, pp. 560–566, 2014.
- [36] C. Soukoulis, S. Behboudi-Jobbehdar, L. Yonekura, C. Parmenter, and I. D. Fisk, “Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films.” *Food Chem.*, vol. 159, pp. 302–308, 2014.
- [37] C. Soukoulis, L. Yonekura, H. H. Gan, S. Behboudi-Jobbehdar, C. Parmenter, and I. Fisk, “Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread.” *Food Hydrocoll.*, vol. 39, pp. 231–242, 2014.
- [38] L. Angiolillo, A. Conte, M. Faccia, A. V. Zambrini, and M. A. Del Nobile, “A new method to produce synbiotic Fiordilatte cheese.” *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 22, pp. 180–187, 2014.
- [39] A. Surmacka, “Texture is a sensory property,” *Food Qual. Prefer.*, vol. 13, pp. 215–225, 2002.
- [40] A. Lo Curto, I. Pitino, G. Mandalari, J. R. Dainty, R. M. Faulks, and M. S. John Wickham, “Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion.” *Food Microbiol.*, vol. 28, no. 7, pp. 1359–1366, 2011.
- [41] F. Carri, “Function suitable for food – an international consensus.” pp. 1113–1124, 2014.

- [42] Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), “Propiedades físicas: texturometría” [Online]. Available: <https://www.ictan.csic.es/servicios/servicios-analiticos/propiedades-fisicas/>. [Accessed: 06-Jun-2019].
- [43] M. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, and M. D. Bootman, “Fluorescence Microscopy Michael,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 10, no. 10, pp. 1–36, 2014.
- [44] A. E. Cantos, and C. Alonso, “Fundamentos de la microscopía de fluorescencia.” Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).
- [45] E. Shigematsu *et al.*, “Edible coating with probiotic as a quality factor for minimally processed carrots.” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 55, no. 9, pp. 3712–3720, 2018.
- [46] M. J. Tavera-Quiroz, N. Romano, P. Mobili, A. Pinotti, A. Gómez-Zavaglia, and N. Bertola, “Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*.” *J. Funct. Foods*, vol. 16, pp. 164–173, 2015.
- [47] M. Florencia, M. Victoria, and R. Moreira, “Novel functional blueberries: Fructo-oligosaccharides and probiotic lactobacilli incorporated into alginate edible coatings.” *Food Res. Int.*, vol. 122, no. January, pp. 653–660, 2019.
- [48] G. Carcamo and C. Mena, “Alimentación saludable.” *Horizontes Educ.*, vol. 11, no. 1, p. 1, 2006.
- [49] M. Bourne, *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. 2002.
- [50] Ó. L. Ramos *et al.*, “Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese.” *J. Dairy Sci.*, vol. 95, no. 11, pp. 6282–6292, 2012.
- [51] P. Di, A. Sorrentino, L. Mariniello, C. Valeria, L. Giosafatto, and R. Porta, “LWT - Food Science and Technology Chitosan / whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life.” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 44,

- no. 10, pp. 2324–2327, 2011.
- [52] M. Artiga-artigas, A. Acevedo-fani, and O. Martín-belloso, “Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion- based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber.” *Food Control*, vol. 76, pp. 1–12, 2017.
- [53] M. Henriques, G. Santos, A. Rodrigues, D. Gomes, C. Pereira, and M. Gil, “Replacement of conventional cheese coatings by natural whey protein edible coatings with antimicrobial activity.”
- [54] N. Gagliarini, G. Diosma, G. L. Garrote, A. G. Abraham, and J. Piermaria, “Whey protein-kefir films as driver of probiotics to the gut.” *Lwt*, vol. 105, no. February, pp. 321–328, 2019.