

INTRODUCCIÓN A LA BIOTECNOLOGÍA

Introducción a la Biotecnología
Sus aplicaciones y alcances

María Florencia Rossetti
Ángela Guillermina Forno
[editoras]

**UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL LITORAL**

 **ediciones UNL**

Consejo Asesor
Colección Cátedra
Alicia Camilloni
Miguel Irigoyen
Bárbara Mántaras
Isabel Molinas
Héctor Odetti
Andrea Pacífico
Ivana Tosti

Dirección editorial
Ivana Tosti
Coordinación editorial
María Alejandra Sadrán
Coordinación diseño
Alina Hill
Coordinación comercial
José Díaz

Corrección
Félix Chávez
Diagramación interior y tapa
Laura Canterna

© Ediciones UNL, 2022.

—
Sugerencias y comentarios
editorial@unl.edu.ar
www.unl.edu.ar/editorial

Introducción a la Biotecnología : sus aplicaciones y alcances / María Florencia Rossetti ... [et al.] ; Editado por María Florencia Rossetti; Ángela Guillermina Forno ; Prefacio de Raquel Lía Chan.

—1a ed— Santa Fe : Ediciones UNL, 2022.
Libro digital, PDF/A – (Cátedra)

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-749-386-3

1. Biotecnología. 2. Biología. 3. Ingeniería. I. Rossetti, María Florencia II. Rossetti, María Florencia , ed. III. Forno, Ángela Guillermina , ed. IV. Chan, Raquel Lía, pref.
CDD 570

—
©Attallah, Burns, Cabello, Campi, Cappellino, Caputto, Cardozo, Colombatti, Comelli, Follonier, Fontana, Forno, Fuselli, Gaydou, Gerard, Gugliotta, Hick, Luque, Mercanti, Muriel, Prieto, Raineri, Ramos, Re, Reidel, Reyes, Rossetti, Russi, Tossolini, Trombert, Tschopp, 2022.

© del prefacio Raquel Lía Chan, 2022.



7 Producción de alimentos funcionales: una visión desde la biotecnología

DIEGO MERCANTI · EMILIA HICK · PATRICIA BURNS

INTRODUCCIÓN

El presente capítulo aborda el desarrollo de un alimento funcional, queso tipo Fior di Latte adicionado de microorganismos probióticos, realizado en el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) perteneciente a la Universidad Nacional del Litoral (UNL) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). El objetivo es describir el recorrido que realizamos los científicos, tecnólogos y microbiólogos, desde la idea-proyecto hasta el desarrollo del producto final donde nos enfrentamos con aciertos, desafíos y dudas.

La Sociedad Española de Biotecnología (SEBIOT) define a la biotecnología de los alimentos como el conjunto de técnicas o procesos que emplean organismos vivos o sustancias que provengan de ellos para producir o modificar un alimento, mejorar las plantas o animales de los que provienen los alimentos, o desarrollar microorganismos que intervengan en los procesos de elaboración de estos (<https://www.madrimasd.org/blogs/alimentacion/2007/04/25/64351>). Si bien la mayoría de las personas asocia este término con alimentos transgénicos, prácticamente en todos los alimentos que ingerimos, ha participado algún proceso biotecnológico. Desde hace miles de años, por ejemplo, el hombre utiliza microorganismos para la producción de alimentos fermentados como el vino, la cerveza, el pan con levadura, el queso. En estos procesos de fermentación, que podemos llamar de la «biotecnología tradicional» los microorganismos (bacterias y/o levaduras) transforman la materia prima en productos finales. La «biotecnología moderna», se diferencia de la tradicional en que emplea la ingeniería genética para obtener plantas, animales y microorganismos modificados genéticamente. La ventaja principal es que se puede introducir un gen de interés de una especie en otra distinta para conferirle una característica determinada.

El Instituto de Tecnólogos de Alimentos de los Estados Unidos (Institute of Food Technologists; IFT, 2004) define a los alimentos funcionales como aquellos que proporcionan un beneficio para la salud más allá de la nutrición básica. Un ejemplo de alimentos funcionales son los productos lácteos fermentados adicionados de microorganismos probióticos. En los últimos años, la mayor concientización de la sociedad sobre la influencia de la dieta en la salud ha incrementado la demanda de este tipo de alimentos. Este aumento en el consumo de alimentos funcionales, mínimamente procesados, más naturales

y beneficiosos para la salud estimula la innovación y el desarrollo de nuevos productos en la industria alimentaria mundial. En nuestro país, los alimentos funcionales más populares y disponibles en el mercado son yogures o leches fermentadas. En el año 2010, La Serenísima incorporó la cepa probiótica comercial *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG a su línea de quesos Port Salut (<https://www.perfil.com/noticias/economia/la-serenisima-incorpora-lactobacillus-gg-a-su-linea-de-quesos-blandos-20101005-0030.phtml>). No obstante, actualmente estos productos ya no se encuentran en el mercado local.

La definición aceptada actualmente de microorganismos probióticos fue establecida por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agricultural Organization; FAO) en el año 2001 y revisada por un panel de expertos de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics; ISAPP) en el año 2014. La definición consenso establece que los probióticos son «microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del consumidor» (Hill *et al.*, 2014). Los géneros de bacterias más estudiados y utilizados como probióticos son *Lactobacillus*, *Lactocaseibacillus* y *Bifidobacterium*.

Los efectos sobre la salud asociados al consumo de microorganismos probióticos están ampliamente demostrados y se han propuesto numerosos mecanismos para explicarlos, entre ellos: metabolización de carbohidratos complejos, mejora de los síntomas de intolerancia a la lactosa, defensa contra microorganismos patógenos (a través de la producción de compuestos antimicrobianos y/o la competencia por sitios de adhesión y nutrientes), modulación de la permeabilidad de la barrera intestinal y estimulación del sistema inmunológico, entre otros (Dongarrá *et al.*, 2013; Vinderola y Burns, 2021). Uno de los criterios que debe cumplir un alimento adicionado de un probiótico es que debe mantenerse la viabilidad del microorganismo en determinada concentración, hasta el final de la vida útil del producto. Por otro lado, si el alimento es destinado al consumo humano, su efecto sobre la salud debe demostrarse en al menos un estudio clínico en humanos (Hill *et al.*, 2014). En cuanto a la dosis de ingesta recomendada de probióticos en un alimento, varios autores proponen una concentración de 1×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC), con lo cual el alimento debe contener entre 10^6 y 10^7 UFC/g o mL durante la vida útil, considerando una ingesta de 100 g o mL del producto (Burns *et al.*, 2015; Salminen *et al.*, 2016; Cuffia *et al.*, 2019a; Patrignani *et al.*, 2019).

Los productos lácteos fermentados son, en general, una matriz apta para la adición de probióticos; además, aportan nutrientes como calcio y proteínas y son aceptados por numerosos consumidores como parte de una dieta saludable.

DESARROLLO DE UN NUEVO ALIMENTO FUNCIONAL. QUESO TIPO *FIOR DI LATTE*

Fior di Latte es un queso blando de pasta hilada (tipo Mozzarella) con alto contenido de humedad, elaborado con leche bovina, mediante acidificación química de la cuajada o utilizando cultivos iniciadores de bacterias ácido-lácticas (BAL) como *Streptococcus thermophilus*. Es un queso blanco, sin corteza, con un ligero sabor a ácido láctico que se consume a los pocos días de su preparación (Cuffia *et al.*, 2017).

La tecnología de elaboración de los quesos de pasta hilada tiene una etapa de hilado que consiste en sumergir la cuajada ácida en agua caliente y luego someterla a un proceso de texturado (amasado y estiramiento) manual o mecánico, en donde la cuajada caliente se estira haciendo que las proteínas formen fibras. Esta etapa permite que el producto adquiera su textura característica; no obstante, constituye el principal desafío al momento de adicionar bacterias probióticas y mantener su viabilidad, debido a la utilización de altas temperaturas (Cuffia *et al.*, 2017, 2019a). En la figura 7.1 se observa el corte de la cuajada (A), hilado (B), comprobación del punto de hilado (C) y formación de los *bocconcini* (D) característicos del proceso de elaboración de los quesos *Fior di Latte*.



Figura 7.1. Etapas del proceso de elaboración del queso *Fior di Latte*

Teniendo en cuenta este marco teórico, como científicos tecnólogos y microbiólogos, nos realizamos algunas preguntas a la hora de pensar nuestra idea-proyecto:

¿Qué tipo de alimentos funcionales adicionados de microorganismos probióticos existen en el mercado? ¿Podemos desarrollar nuevos alimentos funcionales? Hoy en día, ¿cuál es la tendencia de los consumidores respecto a la alimentación? Un queso de pasta hilada tipo *bocconcini* (esferas) ¿sería bien aceptado por el consumidor para incorporarlo a su dieta, por ejemplo, en ensaladas frías? ¿Contamos en el laboratorio con el equipamiento y el personal capacitado para desarrollar el producto? ¿Podría ser un desarrollo de interés para la industria? ¿Existen reportes bibliográficos de este tipo de productos? ¿Se puede utilizar la tecnología tradicional de elaboración de este tipo de quesos de pasta hilada o necesitamos modificarla? ¿Qué microorganismos iniciadores y probióticos utilizamos, son compatibles? Teniendo en cuenta la tecnología de elaboración de los quesos de pasta hilada, ¿qué característica de interés debemos considerar a la hora de seleccionar el/los probiótico/s? ¿A qué problema nos podemos enfrentar durante la elaboración si el fermento es atacado por bacteriófagos? ¿Un bacteriófago podría atacar al microorganismo probiótico? Un alimento con más de un probiótico ¿tendrá un efecto sinérgico en cuanto a su potencial benéfico sobre la salud? ¿Qué modelo animal utilizamos para evaluar su funcionalidad *in vivo*? ¿Es un producto aceptable desde el punto de vista sensorial?

Como mencionamos anteriormente, en el mercado argentino predominan los yogures que contienen microorganismos probióticos, por lo cual, el desarrollo de un nuevo alimento funcional como es un queso, que pueda consumirse en platos fríos o ensaladas, podría ser bien recibido y aceptado por los consumidores y resultar de interés para las industrias lácteas que buscan innovar y aumentar la oferta de este tipo de alimentos en el mercado. Por otro lado, al momento de realizar la búsqueda bibliográfica, nos encontramos con que no existían desarrollos de este tipo, lo que avalaba aún más nuestra innovación del agregado de probióticos a quesos frescos de pasta hilada. Los trabajos publicados por Minervini *et al.* (2012), Ortakci *et al.* (2012) y Angiolillo *et al.* (2014) hacían referencia a la adición de bacterias probióticas microencapsuladas en alginatos o preadaptadas al calor, adicionadas a quesos de pasta hilada.

En el INLAIN contamos con el equipamiento necesario, incluida la planta piloto, y el personal capacitado para el desarrollo del producto. Entonces, el primer gran desafío que se nos planteó fue si se podía utilizar la tecnología tradicional de elaboración de estos quesos o si debíamos modificarla, es decir hacerla menos «agresiva» para que, al adicionar las bacterias probióticas, estas pudieran mantener su viabilidad en niveles elevados. Por otro lado, considerando que el principal desafío es la elevada temperatura del agua que se utiliza para el hilado de la cuajada, debíamos seleccionar cepas probióticas con elevada resistencia térmica.

En cuanto al ajuste y puesta a punto de la tecnología de elaboración, los parámetros seleccionados como óptimos fueron: acidificación de la cuajada (pH $5,20 \pm 0,05$), tiempo de hilado (10 min) temperatura del agua de hilado ($79,0 \pm 1,0$ °C), lo que implica una temperatura del interior de la cuajada de $60,0 \pm 1,0$ °C (menor a la habitual) (Cuffia *et al.*, 2017). Del elenco de cepas probióticas pertenecientes a la colección del INLAIN, se seleccionaron los dos lactobacilos comerciales que presentaron menor sensibilidad a la temperatura (*L. rhamnosus* GG y *Lactobacillus acidophilus* LA5), simulando las condiciones a las cuales estarían expuestas las cepas en la cuajada (Cuffia *et al.*, 2019 a y b). Como cultivo iniciador se utilizó la cepa comercial *S. thermophilus* ST1-14. Durante la elaboración de queso o yogur, el rol de los cultivos iniciadores de bacterias lácticas es el de acidificación, mediante producción de ácido láctico a partir de la lactosa de la leche. Esto contribuye a la coagulación, a la inhibición del desarrollo de bacterias patógenas o alterantes del alimento, a la vez que, en el caso de los quesos, aportan enzimas cuya actividad es importante para el desarrollo de aroma y sabor. Los fermentos adjuntos, en cambio, se emplean para obtener características adicionales, como ser la formación de ojos en los quesos, el mejoramiento de la textura del producto, la producción de aromas y sabores específicos durante la maduración de los quesos, o en el caso de las bacterias probióticas, un efecto beneficioso sobre la salud del consumidor. Tanto cultivos iniciadores como adjuntos pueden ser atacados por bacteriófagos (virus que infectan bacterias, también llamados fagos), conllevando grandes pérdidas económicas. Las infecciones por fagos de cultivos iniciadores se detectan fácilmente por problemas en la acidificación, pero en bacterias probióticas son mucho más difíciles de notar, ya que pueden no modificar parámetros observables y/o cuantificables durante la fermentación, y requieren en general un recuento diferencial de la/s cepa/s probiótica/s empleada/s (Briggiler Marcó y Mercanti, 2021). Para poder realizar dicho recuento diferencial, determinar la concentración de ambos microorganismos probióticos en el producto y diferenciarlo también del cultivo iniciador, se ensayaron varios medios de cultivo. Se seleccionó agar de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) + bilis bovina 0,15 % (p/v) (Cuffia *et al.*, 2019a) en el cual el cultivo iniciador no fue capaz de desarrollar y ambos probióticos se diferenciaron según las características morfológicas de las colonias. Hasta el momento, los probióticos seleccionados presentaban cierta resistencia térmica y se podían contar independientemente entre ellos y del cultivo iniciador. El próximo paso consistió en elaborar los quesos *Fior di Latte*. Se elaboraron 4 tipos de quesos: 1) Queso control (en el cual solo se utilizó el cultivo iniciador *S. thermophilus* ST1-14); 2) Queso GG (en el cual se adicionó como cultivo adjunto *L. rhamnosus* GG); 3) Queso L (en el cual se adicionó como cultivo adjunto *L. acidophilus* LA5) y 4) Queso GL (en el cual se adicionaron ambos cultivos adjuntos). El comportamiento del cultivo iniciador fue el esperado, indicando que no hubo ataque de bacteriófagos durante la elaboración de los quesos.

El ajuste en la tecnología de elaboración permitió mantener la viabilidad de los cultivos probióticos añadidos en concentraciones superiores a 10^8 UFC/g hasta el final de la vida útil de los quesos (15 días almacenados a 4 °C) (Cuffia *et al.*, 2019a), con lo cual se cumplía con los requerimientos del nivel de probióticos requeridos en un alimento (Angiolillo y *et al.*, 2014). Por otro lado, se logró que los quesos tuvieran las mismas características de textura que si fueran elaborados con la tecnología tradicional. De acuerdo con los recuentos de los cultivos adjuntos (probióticos), tampoco en este caso se observaron infecciones por fagos, aunque se debe tener en cuenta que, como los probióticos no se multiplican en la leche o la cuajada durante la elaboración, son mucho menos susceptibles de ser atacados por fagos (que en general requieren células en división activa para una infección eficiente). No obstante, dicha posibilidad nunca debe descartarse, especialmente si se usan cultivos que no sean de adición directa a tina y requieran, por lo tanto, pasos previos de propagación.

L. rhamnosus GG y *L. acidophilus* LA5 son dos cepas probióticas comerciales con efectos benéficos ampliamente demostrados (De Vrese *et al.*, 2011; Gorbach, Doron y Magro, 2016). No obstante, cuando se incorporan a un alimento, sus características funcionales pueden verse afectadas debido, por ejemplo, a ingredientes de la matriz alimentaria. Por esto, para un alimento adicionado de cepas probióticas es necesario demostrar la funcionalidad del producto final mediante ensayos *in vivo*. Como se mencionó anteriormente, si bien para un alimento de consumo humano su funcionalidad debe demostrarse en un estudio clínico en humanos, los primeros estudios *in vivo* suelen realizarse utilizando modelos animales.

En este sentido, para este trabajo se evaluó la funcionalidad de los quesos frescos de pasta hilada G, L y GL (almacenados a 4 °C durante 15 días) utilizando un modelo de ratones BALB/c. Los animales fueron alimentados durante 10 días consecutivos, por intubación intragástrica, con una suspensión de los quesos en agua (recibiendo una dosis de entre 7,6 y 7,9 log UFC/ratón). Se evaluó la seguridad de los quesos mediante translocación y la capacidad de modular el sistema inmunológico a través de la determinación de la concentración de IgA-s (inmunoglobulina A-secretoria, principal defensa de las mucosas) en fluido intestinal y de citoquinas pro-inflamatorias en intestino delgado y grueso (ELISA). Además, un grupo de animales recibió el queso control (c).

En todos los casos el ensayo de translocación resultó negativo, indicando que los quesos fueron seguros. Por otro lado, los animales alimentados con los quesos L y GL presentaron niveles significativamente más elevados de IgA-S, respecto a los quesos G y c y, el nivel de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α e IFN- γ) se redujo significativamente en los animales alimentados con los quesos probióticos respecto al grupo control (Cuffia *et al.*, 2019a).

Estos resultados demuestran que los quesos L, G y GL resultaron seguros y fueron capaces de modular la respuesta inmune en animales, incrementando

las defensas a nivel de mucosas y disminuyendo el perfil de citoquinas proinflamatorias. Los efectos dependieron de la cepa probiótica utilizada y en ninguno de los casos se observó un efecto sinérgico debido al agregado de ambos cultivos probióticos combinados, lo que confirmó que, el efecto benéfico de los microorganismos probióticos es cepa-dependiente y debe evaluarse cada caso particular.

En cuanto al análisis sensorial, cuando se elabora este tipo de alimentos, se espera que las cepas probióticas no alteren (no modifiquen de manera negativa) las características del alimento, o bien las mejoren. En este caso, todos los quesos fueron aceptados por el panel sensorial, si bien se encontró mayor sabor ácido en los quesos adicionados de los lactobacilos (Cuffia *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

El aporte realizado en este trabajo, desde la biotecnología de los alimentos, es considerado muy valioso ya que se logró el desarrollo exitoso de quesos frescos de pasta hilada adicionados de cepas probióticas demostrándose su funcionalidad *in vivo* y su aceptabilidad sensorial, lo cual podría ampliar la oferta de alimentos funcionales existentes en el mercado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGIOLILLO, L.; CONTE, A.;...; DEL NOBILE, M. (2014a). A new method to produce symbiotic Fiordilatte cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, (22), 180–187.
- ANGIOLILLO, L.; CONTE, A.;...; DEL NOBILE, M. (2014b). A new method to produce symbiotic Fiordilatte cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, (22), 180–187.
- BRIGGILER MARCÓ, M.; MERCANTI, D. (2021). Bacteriophages in dairy plants. En *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier, Academic Press. En prensa. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2021.02.015>
- BURNS, P.; PATRIGNANI, F.;...; LANCIOTTI, R. (2015). Potential of high-pressure homogenisation on probiotic Caciotta cheese quality and functionality. *Journal of Functional Foods*, (13), 126–136.
- CUFFIA, F.; GEORGE, G.;...; BURNS, P. (2017). Technological challenges in the production of a probiotic pasta filata soft cheese. *LWT – Food Science and Technology*, (81), 111–117.
- CUFFIA, F.; GEORGE, G.;...; BURNS, P. (2019a). In vivo study of the immunomodulatory capacity and the impact of probiotic strains on

- physicochemical and sensory characteristics: Case of pasta filata soft cheeses. *Food Research International*, (125), 108606.
- CUFFIA, F.; PAVÓN, Y.;...; BURNS, P.** (2019b). Effect of storage temperature on the chemical, microbiological and sensory characteristics of pasta filata soft cheese containing probiotic lactobacilli. *Food Science and Technology International*, 25(7), 588-596.
- DE VRESE, M.; KRISTEN, H.;...; SCHREZENMEIR, J.** (2011). Probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a fermented milk product with added fruit preparation reduce antibiotic associated diarrhea and *Helicobacter pylori* activity. *Journal of Dairy Research*, 78(4), 396-403.
- DONGARRÁ, M.L.; RIZZELLO, V.;...; FERLAZZO, G.** (2013). Mucosal immunology and probiotics. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13(1), 19-26.
- GORBACH, S.; DORON, S.; MAGRO, F.** (2016). *Lactobacillus rhamnosus* GG. En *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis* (pp. 79-89). Elsevier.
- HILL, C.; GUARNER, F.;...; SANDERS, M. E.** (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514.
- INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS** (2004). Expert Report: Functional Foods: Opportunities and Challenges. *Food Technology Magazine*, 58(12). <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2004/december/features/functional-foods-opportunities-and-challenges>
- MINERVINI, F.; SIRAGUSA, S.;...; DE ANGELIS, M.** (2012). Manufacture of Fiordilatte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli. *Journal of Dairy Science*, (95), 508-520.
- ORTAKCI, F.; BROADBENT, J.R.;...; MCMAHON, D.J.** (2012). Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. *Journal of Dairy Science*, (95), 6274-6281.
- PATRIGNANI, F.; SIROLI, L.;...; LANCIOTTI, R.** (2019). Use of *Lactobacillus crispatus* to produce a probiotic cheese as potential gender food for preventing gynaecological infections. *PLoS One*, 14(1), e0208906.
- SALMINEN, S.; KNEIFEL, W.; OUWEHAND, A.C.** (2016). *Probiotics: Application of probiotics in dairy products: Established and potential benefits*. Reference Module in Food Sciences.
- VINDEROLA G.; BURNS P.** (2021). The Biotics Family. En Gomes da Cruz, A.; Ranadheera, S.; Nazzaro, F. and Mortazavian, A. (Eds), *Probiotics and Prebiotics in Foods* (pp. 1-11). Elsevier.