

Uso de bacterias lácticas en nuevos productos funcionales de lactosuero

Micaela Pescuma¹, Elvira M. Hébert¹, Graciela Font de Valdez^{1,2} y Fernanda Mozzi¹

¹Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET - San Miguel de Tucumán, Argentina.
C.E.: fmozzi@cerela.org.ar.

²Cátedra de Microbiología Superior - Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia
Universidad Nacional de Tucumán - Tucumán, Argentina



En la Argentina, el 90% del lactosuero de queso es descartado provocando contaminación ambiental. Este importante subproducto podría ser utilizado para elaborar bebidas fermentadas funcionales de mejor digestibilidad y elevado contenido proteico. En este trabajo se estudió la capacidad de ciertas bacterias lácticas (BAL) de crecer en lactosuero y de degradar la β -lactoglobulina (BLG), proteína mayoritaria del lactosuero resistente a la digestión y potencialmente alergénica. Las BAL fueron capaces de crecer en lactosuero, liberar aminoácidos y reducir el pH y el contenido de lactosa. La

hidrólisis de BLG por las BAL incrementó la concentración de aminoácidos y péptidos pequeños, de mayor asimilación en el intestino. La presencia de polisacáridos en la matriz alimentaria aumentaría la digestibilidad de BLG. Las BAL seleccionadas podrían ser usadas en la elaboración de nuevos productos funcionales de lactosuero.

Introducción

El lactosuero es el principal subproducto de la industria quesera. En la Argentina el 80% de la producción de quesos se procesa con tecnología tradicional, desechándose el 90% del lactosuero al medio ambiente, con la consecuente contaminación ambiental. Actualmente, en las grandes plantas lecheras el lactosuero es recuperado y secado por spray o separado en sus componentes por medio de ultrafiltración para obtener lactosa y concentrado proteico de suero (CPS).

En la Argentina, la lactosa obtenida (6.935 ton/año) es principalmente utilizada en la industria farmacéutica, mientras que el CPS (4.380 ton/año) se comercializa como tal o hidrolizado y es destinado a las industrias alimentarias y farmacopea. El CPS es utilizado como suplemento dietario para deportistas debido a su alta concentración de aminoácidos ramificados⁽¹⁴⁾ y se lo usa en la industria alimentaria en la fabricación de quesos para aumentar el contenido proteico de los mismos, en productos de panificación para mejorar la crocantes sin el agregado de grasas, etc.

El lactosuero líquido está compuesto por lactosa (5%), agua (93%), proteínas (0.85%), minerales (0.53%) y grasas (0.36%), por lo cual los productos derivados del mismo proveen sólidos de leche con bajo contenido en grasas y alto contenido en calcio, que son uti-

lizados en la fabricación de varios productos reducidos en calorías (yogures, quesos untables, etc)^(7, 9).

Las principales proteínas del lactosuero son β -lactoglobulina (BLG) (53%) y α -lactoalbúmina (ALA) (13%), mientras que las inmunoglobulinas, albúminas séricas y proteasa-peptonas se encuentran en menor concentración. La BLG esta ausente en la leche humana, es altamente resistente a la digestión gástrica y es la principal causante de intolerancia oral y alergia a la leche de vaca, especialmente en niños menores de 3 años^(5, 8). La hidrólisis de esta proteína puede potencialmente reducir su alergenicidad y aumentar su digestibilidad por medio de la liberación de aminoácidos y péptidos pequeños que son fácilmente absorbidos en el intestino⁽¹⁵⁾.

La resistencia a la hidrólisis es un indicador de la potencialidad que tiene una proteína de producir alergia. Luego de la digestión, el análisis del grado de hidrólisis de la proteína, la secuencia y el tamaño de los péptidos formados (entre 3-8 KDa) son indicadores de una reducción de alergenicidad⁽¹²⁾. La digestibilidad de las proteínas presentes en el alimento puede ser también afectada por la presencia de polisacáridos debido a un aumento de la viscosidad del medio, un cambio en la solubilidad de las proteínas o una disminución de la actividad de las enzimas digestivas.

En la industria alimentaria, se agregan polisacáridos a los productos lácteos para mejorar la textura y disminuir la sinéresis en productos como leches fermentadas (especialmente bebibles y descremadas), flanes, cremas, helados, etc. En la matriz alimentaria, compuesta por la mezcla de proteínas y polisacáridos, estos polímeros interactúan entre sí de diversas maneras, dependiendo de sus estructuras y de las condiciones del medio en el que se encuentran (pH, fuerza iónica, etc.).⁽¹⁸⁾

Las bacterias lácticas (BAL) son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria como cultivos iniciadores y/o adjuntos en la elaboración de diversos productos fermentados⁽¹⁰⁾. Estos microorganismos son capaces de metabolizar azúcares, grasas y proteínas, contribuyendo a la digestibilidad y conservación de los alimentos y mejorando sus características organolépticas. La mayoría de estas bacterias son capaces de degradar lactosa y proteínas de origen lácteo generando péptidos, azúcares y ácidos orgánicos que le otorgan características distintivas y valor agregado al producto final. Además, ciertas BAL son capaces de producir polisacáridos de gran diversidad respecto a su composición monomérica y tamaño molecular⁽¹³⁾. Recientemente, se ha demostrado que algunas BAL son capaces de degradar proteínas del lactosuero presentes en productos lácteos y de hidrolizar la porción alergénica de la BLG^(1, 4, 16).

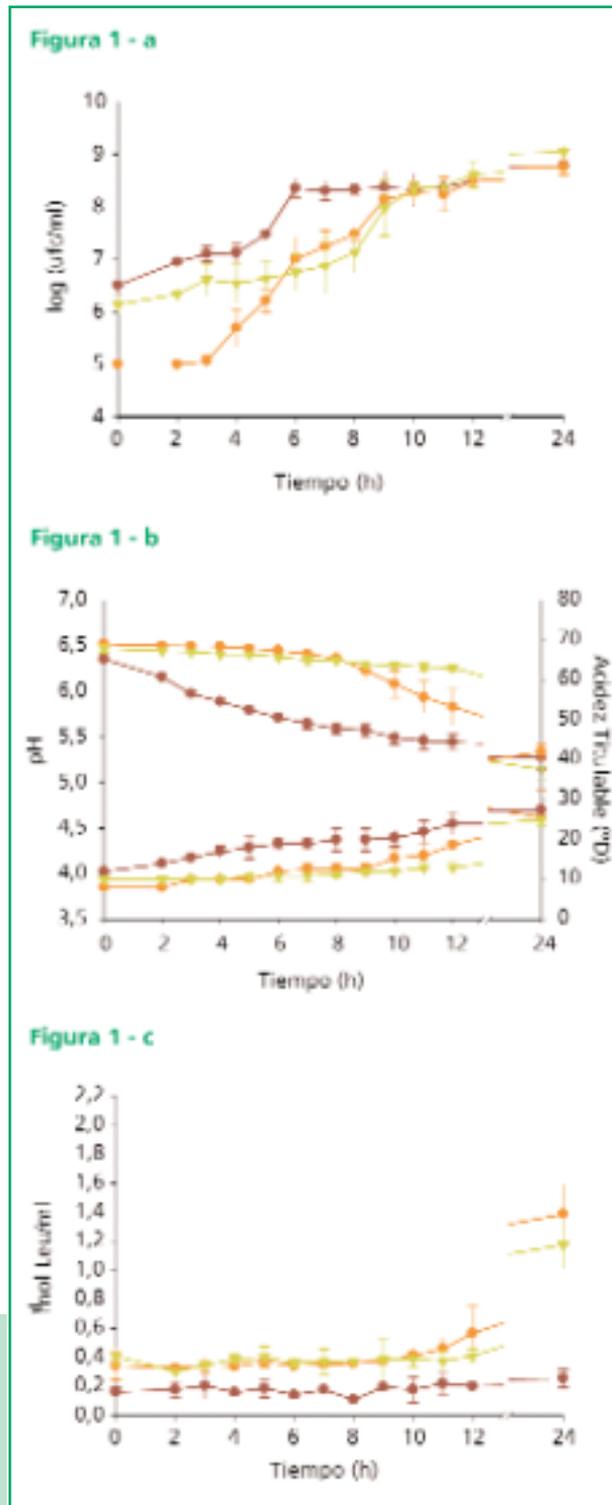
Todas estas propiedades convierten a las BAL en una alternativa interesante para ser utilizadas en la elaboración de bebidas fermentadas de lactosuero con menor contenido de lactosa, mayor concentración de aminoácidos libres, mejor digestibilidad de sus proteínas y/o reducido contenido alergénico. En este trabajo se estudió la capacidad de BAL de importancia industrial de crecer en lactosuero, degradar sus proteínas, principalmente BLG, y evaluar su digestibilidad en presencia de polisacáridos.

Materiales y métodos

Microorganismos y condiciones de fermentación

Se emplearon 71 cepas de BAL de especies comúnmente usadas en la elaboración de productos fermentados (*Lactobacillus casei*, 26; *L. acidophilus*, 13; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 15 y *Streptococcus thermophilus*, 17) pertenecientes a la colección de cultivos del Centro de

Figura 1. a) Crecimiento log (ufc/ml), b) producción de ácido (pH y acidez titulable), c) actividad proteolítica por *S. thermophilus* CRL 804, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 y *L. acidophilus* CRL 636 en lactosuero incubado a 37°C durante 24 h.



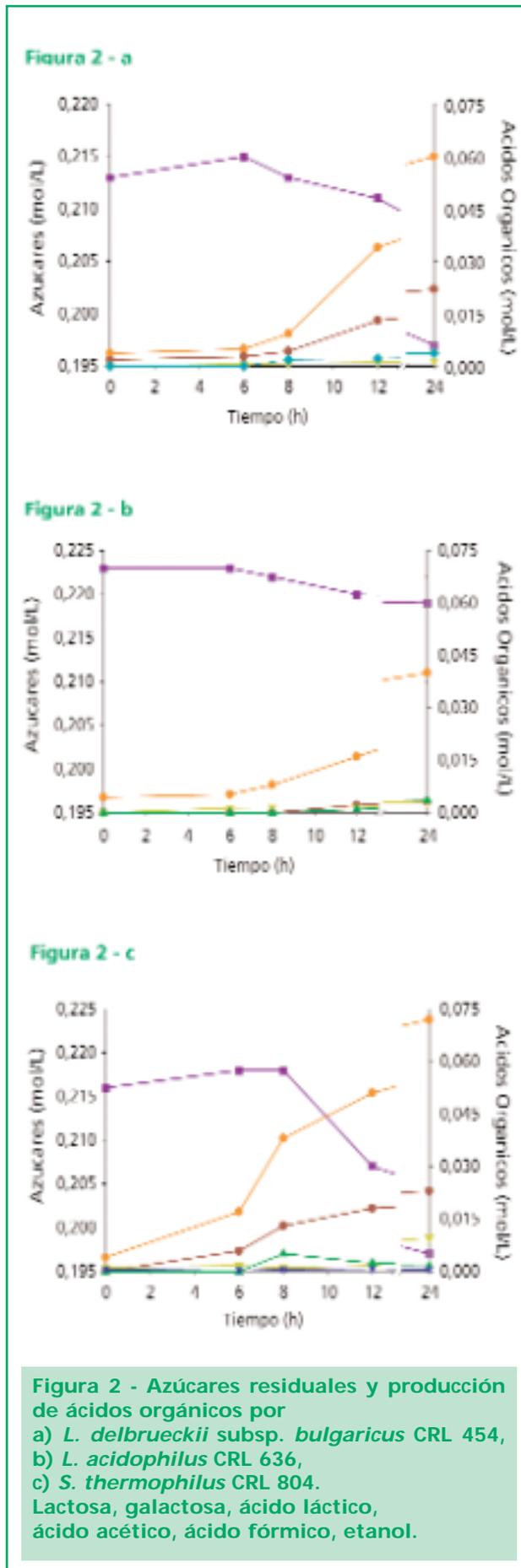
MAGYARKEM[®]
S.R.L.

Confeccionamos programas de limpieza y saneamiento para cada planta

**Productos químicos para
Limpieza e higiene Industrial**

www.magyarkem.com.ar

Tel./Fax: (54-11) 4919-4645 • Fax: (54-11) 4631-5679 • e-mail: infoventas@magyarkem.com.ar



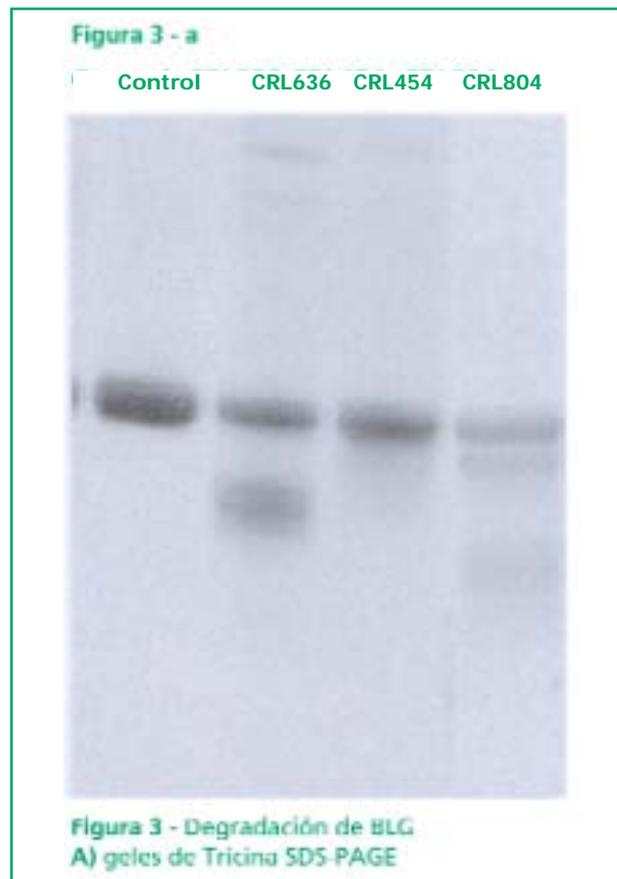
Referencia para Lactobacilos (CERELA, San Miguel de Tucumán, Argentina). Las fermentaciones se llevaron a cabo con cultivos activos (inóculo 1% v/v) en lactosuero reconstituido al 10% (p/v) a 37°C durante 24 horas. Se determinó viabilidad celular (ufc/ml), pH, producción de ácidos orgánicos y consumo de lactosa (HPLC), producción de compuestos de aroma (diacetilo-acetoina)⁽⁶⁾ y actividad proteolítica (mol de leucina liberada/ml) por el método de OPA⁽³⁾.

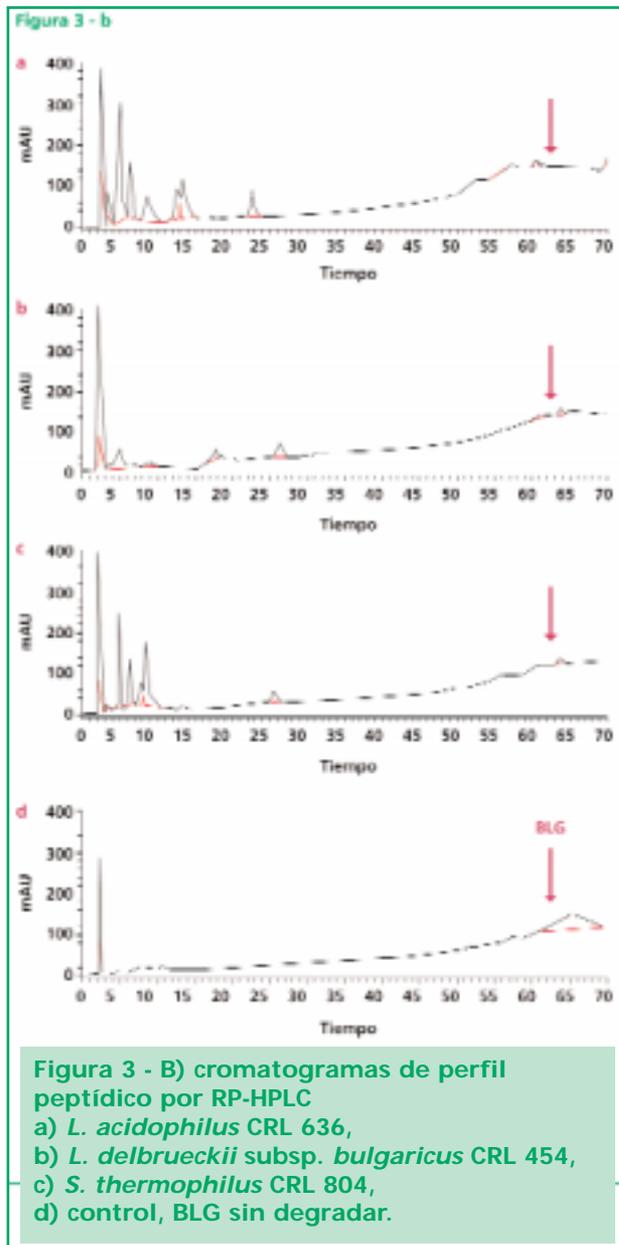
Degradación de proteínas y análisis de péptidos liberados

La degradación de BLG se evaluó utilizando un sistema de células no proliferantes, para evitar interferencias con otras proteínas presentes en el lactosuero. Las células se incubaron con BLG pura en un sistema buffer durante 6 horas y se determinó hidrólisis de esta proteína mediante Tricina SDS-PAGE⁽¹⁷⁾. El porcentaje de hidrólisis se calculó por análisis densitométrico de los geles utilizando el programa QuantiScan (BIOSOFT 1.5, USA). Los péptidos fueron analizados por RP-HPLC⁽²⁾.

Digestibilidad de BLG

Se utilizó un sistema digestivo in vitro en dos etapas⁽⁹⁾ y se estudió el efecto de polisacáridos sobre la digestibilidad de BLG. Los polisacáridos usados fueron: pectina, de origen vegetal y EPS1190 y EPS804, producidos por BAL (13). Con el fin de evaluar si los péptidos generados por hidrólisis de BLG eran capaces de cruzar la barrera intestinal, la hidrólisis por tripsina y quimiotripsina se realizó en bolsas de diálisis de 3 y 8 kDa y los péptidos liberados se analizaron por HPSEC (cromatografía de exclusión molecular).





Resultados y discusión

Todas las BAL estudiadas fueron capaces de crecer (1-3 log ufc/ml) en lactosuero, siendo en general las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* las más acidificantes (pH 5.6 a las 6 horas de fermentación). Las cepas de *L. casei* fueron en general más proteolíticas (0.5-0.6 mol Leu/ml) mientras que las de *S. thermophilus* mostraron baja proteólisis (0.3 mol Leu/ml) o consumieron los aminoácidos presentes en el lactosuero (-0.5 mol Leu/ml) en las primeras 6 horas de incubación. El 80% de las cepas produjeron diacetilo, compuesto de aroma característico en yogures y leches fermentadas.

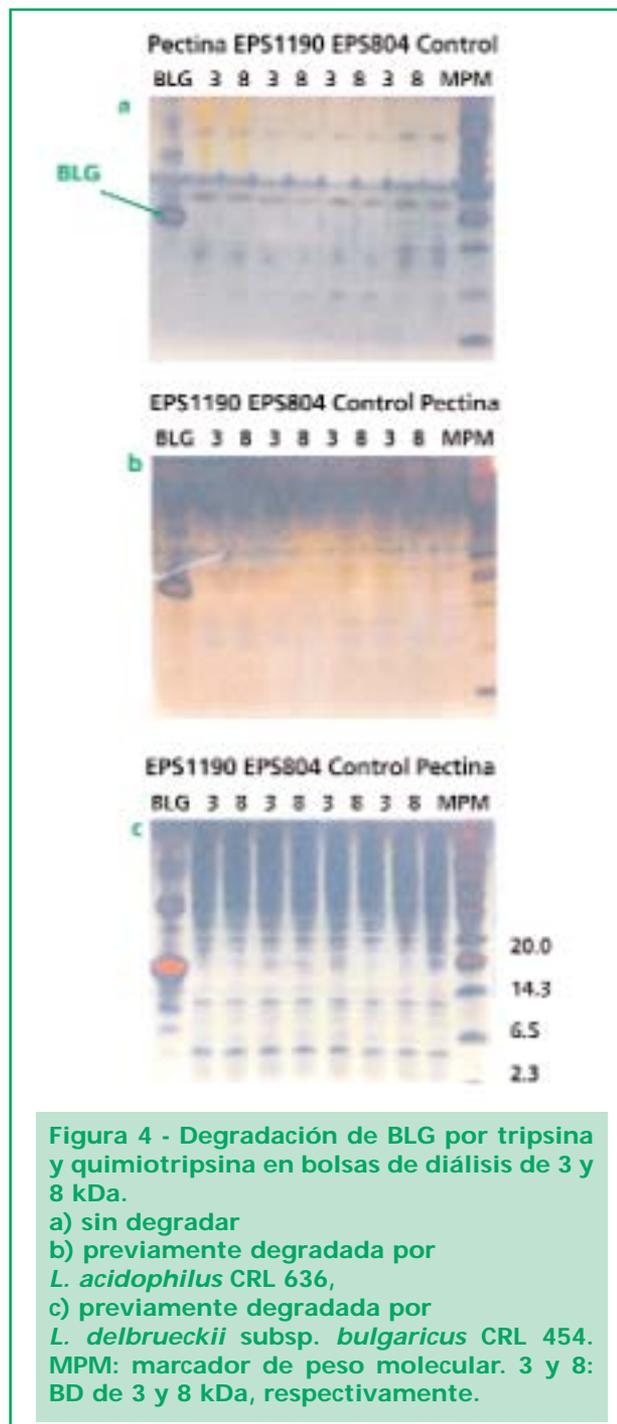
Se seleccionaron tres cepas (*L. acidophilus* CRL 636, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 y *S. thermophilus* CRL 804) por las características de su crecimiento en lactosuero (2-3 unidades logarítmicas) y actividad proteolítica (1.4 y 0.2 mmol Leu/L) (Figura 1).

En general, estos microorganismos mostraron una lenta reducción del pH durante las primeras horas de incubación alcanzando valores de pH 4.0 a las 24 hs.

Estas cepas degradaron lactosa entre 2-9% (siendo el consumo mayor para *S. thermophilus* CRL

804) y produjeron ácido láctico y acético (0.4-0.7, 0.01-0.09 mol/L, respectivamente, a las 24 hs de fermentación) (Figura 2).

Las BAL seleccionadas fueron capaces de degradar la proteína mayoritaria (BLG) del lactosuero, mostrando diferentes perfiles peptídicos (geles de Tricina SDS-PAGE, Figura 3a) probablemente debido a la presencia de proteasas celulares con especificidades diferentes. La diferencia de los perfiles obtenidos fue confirmada por RP-HPLC (Figura 3b). La mayoría de los péptidos liberados presentaron características hidrofílicas y el perfil obtenido fue dependiente de cepa. La hidrólisis de BLG por tripsina y quimiotripsina (enzimas presentes en el intestino) genera una gran variedad de péptidos con residuos de aminoácidos hidrofílicos⁽²⁾.



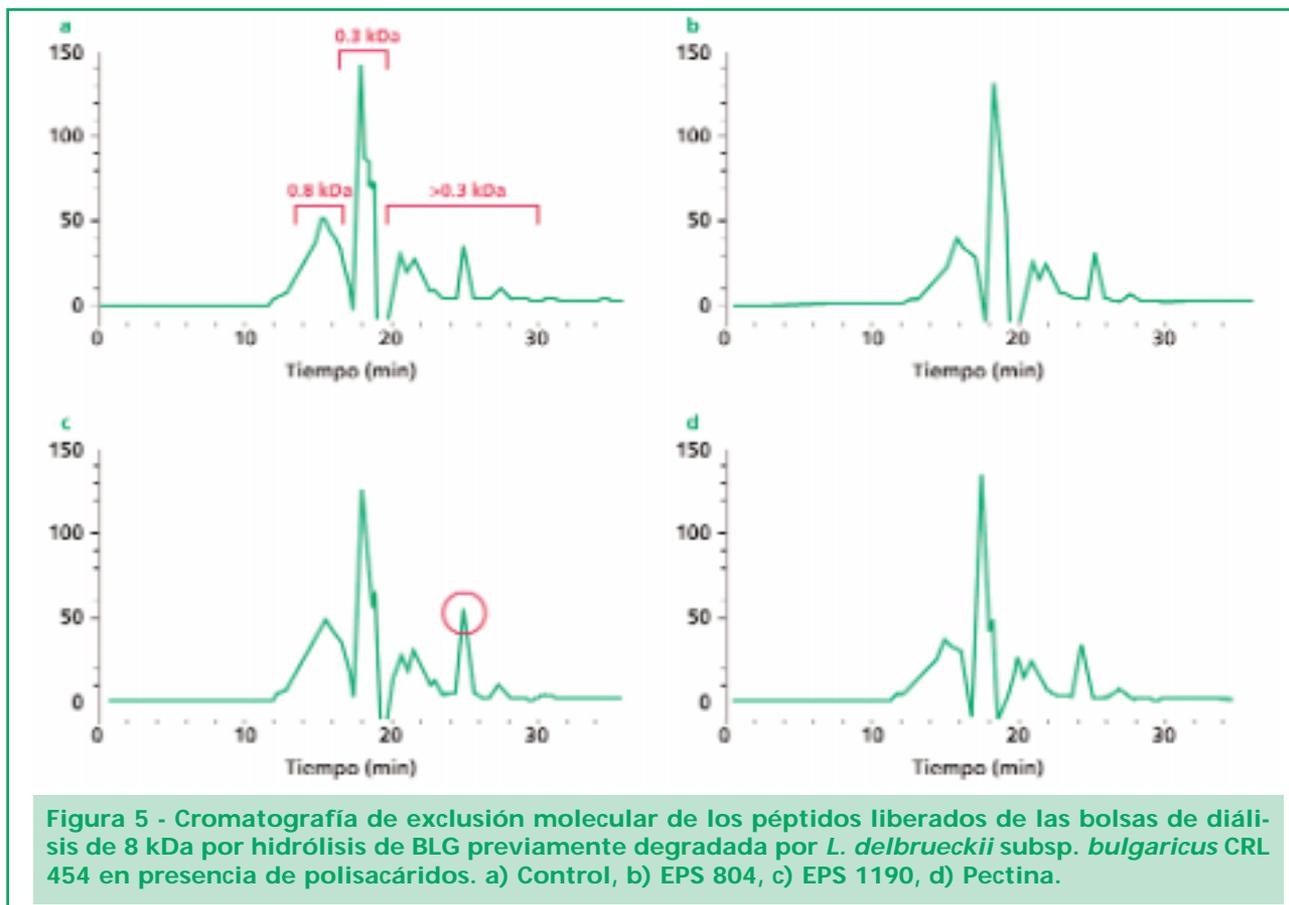


Figura 5 - Cromatografía de exclusión molecular de los péptidos liberados de las bolsas de diálisis de 8 kDa por hidrólisis de BLG previamente degradada por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 en presencia de polisacáridos. a) Control, b) EPS 804, c) EPS 1190, d) Pectina.

Las diferencias en los péptidos observados podría estar involucrada en la menor inmunoreactividad determinada en las leches fermentadas por BAL⁽¹¹⁾.

Posteriormente, se estudió la digestibilidad de BLG utilizando un sistema digestivo in vitro en presencia de polisacáridos vegetales y bacterianos (Figura 4). Los resultados mostraron que la presencia de polisacáridos, especialmente pectina, aumentaba la digestibilidad de BLG cuando no era hidrolizada previamente por las BAL. Sin embargo, la presencia de de estos polímeros facilitarían la formación de péptidos potencialmente alergénicos (mayores de 3 kDa). La presencia de los polisacáridos no influyó en la degradación de BLG cuando fue previamente hidrolizada por las BAL. Se observaron péptidos mayores de 3 kDa al final de la digestión cuando BLG fue degradada por *L. acidophilus* CRL 636 y por el contrario, no se observaron péptidos potencialmente alergénicos con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 (Figura 5).

Conclusión

L. acidophilus CRL 636, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 y *S. thermophilus* CRL 804 podrían ser utilizadas en la elaboración de alimentos o bebidas funcionales de lactosuero con menor contenido de BLG, mayor concentración de aminoácidos y péptidos pequeños, y menor contenido de lactosa.

Agradecimientos

Se agradece a DANONE Argentina S.A. por proveer gentilmente el lactosuero en polvo y a Laurie Davis de DAVISCO FOODS International (MN, USA) por la provisión de BLG utilizados en este trabajo. Se agradece al CONICET, la ANCyPT y CIUNT el aporte económico para llevar a cabo este trabajo.

Referencias

- Bertrand-Harb C., Ivanova I.V., Dalgarrondo M., Haertlé, T. (2003) Evolution of β -lactoglobulin and β -lactalbumin content during yoghurt fermentation. *Int Dairy J* 13, 39-45.
- Britt M., Allemere T., Telemo E., Bengtson U., Ekstrand B. (2005) Modification of IgE binding to β -lactoglobulin by fermentation and proteolysis of cow's milk. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3743-3748.
- Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H., Catignani G.L.J. (1983) Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66, 1219-1227.
- El-Zahar K., Chobert J.M., Sitohy M., Dalgarrondo, M., Haertlé T. (2003) Proteolytic degradation of ewe milk proteins during fermentation of yoghurts and storage. *Nahrung/Food* 47, 199-206.
- El-Zahar K., Sitohy M., Choiset Y., Metro F. (2005). Peptic hydrolysis of ovine β -lactoglobulin. Exceptional susceptibility of native ovine β -lactoglobulin to pepsinolysis. *Int. Dairy J.* 15, 17-27.
- Harrigan, W.F. y M.E. Mc Cance, *Laboratory Methods in Food and dairy Microbiology*. Academic Press Inc.(London) LTD (1976).
- Hauque Z.U., Ji T. (2003) Cheddar whey processing and source: II. Effect on non-fat ice cream and yoghurt. *Int. J. F. Sci. Tech.* 38, 463-473.
- Hølst A., Halken S. (1998). Epidemiology and prevention of cow's milk allergy. *Allergy* 53 (Suppl), 111-113.
- Huginin, A. (1999) Whey products in yogurt and fermented dairy products. *Application Monographs of the U.S Dairy Export Council*.
- Leroy F., De Vuyst L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 67-78.
- Maier I., Okun V. M., Pittner F., Lindner, W. (2006) Changes in peptic digestibility of bovine β -Lactoglobulin as a result of food processing studied by capillary electrophoresis and immunochemical methods. *J. Chromb.* 841, 160-167
- Mouécoucou J., Guillaume C., Sanchez C., Mejean L. (2004) β -Lactoglobulin/polysaccharide interactions during in vitro gastric and pancreatic hydrolysis assessed in dialysis bags of different molecular weight cut-offs. *Biochem. Biophys. Acta.* 1670, 105-112.
- Mozzi F., Vaningelgem F., Hébert E.M., Van der Meulen R., Foulquié Moreno M.R., Font de Valdez G., De Vuyst L. (2006) Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Appl. Environm. Microbiol.* 72, 4431-4435.
- Pasin, G., Miller, S. L. (2000) U.S. Whey proteins and sport nutrition. *Application Monographs of the U.S Dairy Export Council*.
- Peñas, E., Préstamo, G., Baeza, M., Martínez-Molero, M. and Gomez, R. (2006) Efecto of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey prot. *Int. Dairy J.* 16, 831-839.
- Prioult G., Pecquet S., Fliss I. (2005) Allergenicity of acidic peptides from bovine β -lactoglobulin is reduced by hydrolysis with *Bifidobacterium lactis* NCC362 enzymes. *Int. Dairy J.* 15, 439-448.
- Schagger, H., Von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Weinbreck F., de Vries R., Schrooyen P., de Kriuf C.G. (2002) Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules* 10.2, A-K.