

PROYECTO ESPECÍFICO

Estrategias para la diferenciación de alimentos y el desarrollo de nuevos productos alimentarios.

PROYECTO INTEGRADOR Optimización de calidad integral y otras estrategias de agregado de valor.

IMPACTO DE LA INCORPORACIÓN DE LÍPIDOS VEGETALES Y ANTIOXIDANTES SOBRE EL COMPORTAMIENTO DEL STARTER DURANTE LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE UN QUESO FUNCIONAL EVALUADO POR TÉCNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO

J. Pega^{1,2}, S. Rizzo¹, L. Rossetti¹, C.D. Pérez^{1,2}, G. Díaz^{1,2}, S.M. Ruzal³, A.M. Descalzo¹, M. Nanni¹

¹ Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA), Centro de Investigación de Agroindustria (CIA), INTA-CNIA.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

³ IQIBICEN-CONICET, FCEyN, UBA.

Correo electrónico: pega.juan@inta.gob.ar

RESUMEN

Los fitoesteroles son un conjunto de lípidos vegetales que han sido utilizados para el diseño de productos lácteos funcionales debido a su capacidad para reducir el colesterol sérico. No obstante, su efecto sobre el comportamiento del cultivo starter en la elaboración de quesos no ha sido estudiado. En este trabajo se monitoreó la cinética del DNA y RNA de la bacteria *Streptococcus thermophilus*, un starter lácteo ampliamente utilizado y con potencial probiótico, durante la producción industrial de un queso funcional conteniendo esteres de fitoesteroles y alfa-tocoferol como compuestos bioactivos. Para este propósito, se optimizaron técnicas de PCR cuantitativa (qPCR) y qPCR con transcriptasa reversa (RT-qPCR). Asimismo, se utilizó un diseño experimental *ad hoc* para evaluar el umbral de detección de ácidos nucleicos libres. En nuestro conocimiento, este abordaje provee la primera evidencia experimental indicando que el DNA no es un indicador confiable de integridad celular cuando se detecta por qPCR, mientras que el RNA permitiría estimar de modo más preciso integridad bacteriana. El starter *S. thermophilus* se detectó por qPCR y RT-qPCR durante la producción del queso hasta los 81 días de madurado. Asimismo, se observó por primera vez que la adición de alfa-tocoferol y concentraciones funcionales de fitoesteroles correlacionó con un aumento significativo en los niveles de DNA y cDNA específicos.

Palabras clave: queso funcional, starter, fitoesteroles, alfa-tocoferol, métodos moleculares.

ABSTRACT

Phytosterols are plant lipophilic triterpenes that have been used for the design of functional dairy products because of their ability to lower serum cholesterol levels. However, their effect on the starter culture behavior during cheesemaking has not yet been studied. Here, we followed DNA and RNA kinetics of the bacterium *Streptococcus thermophilus*, an extensively used dairy starter with probiotic potential, during industrial production of a functional cheese containing phytosterol esters and alpha-tocopherol as bioactive compounds. For this purpose, real-time quantitative PCR (qPCR) and reverse transcription-qPCR (RT-qPCR) assays were optimized. An experimental set-up was used to evaluate the detection threshold of free nucleic acids. To our knowledge, this approach provides the first experimental evidence indicating that DNA is not a reliable marker of cell integrity, whereas RNA may constitute a more accurate molecular signature to estimate bacterial integrity. The starter *S. thermophilus* was detected by qPCR and RT-qPCR during cheese production until 81 days of ripening. We also showed for the first time that the addition of alpha-tocopherol and phytosterols at functional concentrations correlated with a significant increase in target DNA and cDNA levels.

Keywords: Functional cheese, starter, phytosterols, alpha-tocopherol, molecular methods.

INTRODUCCIÓN

Un alimento funcional contiene compuestos biológicamente activos conocidos que, al cumplir con aspectos cualitativos y cuantitativos definidos, provee un beneficio clínico comprobado, y puede por lo tanto ser utilizado para la prevención o tratamiento de enfermedades crónicas modernas (1). Los fitoesteroles son una familia de triterpenos lipofílicos utilizados como agentes para disminuir el colesterol sanguíneo (2). Por lo tanto, al diseñar

un alimento funcional es necesario garantizar que las moléculas bioactivas que se adicionen no deben afectar las características de calidad propia del mismo, tales como parámetros reológicos o sensoriales.

Asimismo, en el caso del diseño de alimentos funcionales fermentados tales como quesos o yogur, es crítico verificar que la incorporación de las moléculas bioactivas en cuestión no afecta el crecimiento de los microorganismos, como así su presencia en el producto final. Esto se debe a que la obtención de una cantidad adecuada de ciertos microorganismos en alimentos fermentados es necesario, no sólo para fines tecnológicos sino también para fines probióticos (3).

Pese a que algunos productos lácteos adicionados con fitoesteroles se encuentran en el mercado en algunos países, no existen a la fecha datos experimentales sobre el efecto de la incorporación de estos lípidos vegetales sobre la microbiota presente en estos productos.

El presente trabajo se efectuó en el marco del primer queso funcional del país que ya se encuentra en el mercado (Patente INPI 2015 010 1287). Este desarrollo fue parte de un proyecto FONARSEC (FSAGRO-AlimFun 0004/2010 “Desarrollo de Productos Lácteos Funcionales”) que involucró al MINCYT, al consorcio de PyMES asociadas (La Raíz S.A., Gacef S.A., Lácteos Capilla del Señor S.A.) y al Instituto Tecnología de Alimentos del INTA-CNIA (Castelar). El queso funcional aporta 2 g de fitoesteroles/60 g de queso, dosis que fueron reportadas como capaces de disminuir los niveles de colesterol sérico en humanos (2), y alfa-tocoferol en dosis que proveen el ~40% de los requerimientos diarios recomendados (RDA) para esta vitamina/60 g de queso (4). El objetivo del presente trabajo consistió en analizar si la adición de dosis funcionales de fitoesteroles y alfa-tocoferol afectó el comportamiento del microorganismo starter ácido-láctico *S. thermophilus* durante la elaboración y madurado de un queso funcional Port Salut light. Esto se efectuó mediante la optimización de métodos moleculares, PCR cuantitativa (qPCR) y qPCR con transcriptasa reversa (RT-qPCR). Asimismo, se desarrolló un ensayo *ad hoc* para evaluar por primera vez la utilidad de estas metodologías moleculares (independientes de cultivo) como indicadores de integridad celular en bacterias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de quesos funcionales y toma de muestras

Los quesos Port Salut light funcionales y controles se elaboraron a nivel industrial en la empresa Capilla del Señor, ubicada en la ciudad de Villa María, Córdoba, Argentina. Luego de la pasteurización de la leche, se incorporaron los fitoesteroles en el batch destinado a queso funcional a fin de lograr 2 g de fitoesteroles/60 g de queso, y alfa-tocoferol para proveer el ~40% de los requerimientos diarios recomendados (RDA) para esta vitamina/60 g de queso. Asimismo, previamente se utilizó otro batch de leche para los quesos control (sin compuestos bioactivos adicionados). Se agregó el cultivo iniciador (starter) de *S. thermophilus* y luego de la coagulación, el cuajo se cortó para realizar el salado. Los bloques se dividieron en porciones de 400 g y se almacenaron a 4°C. Se tomaron muestras de leche cruda (RM), leche pasteurizada (PM), PM 30 min luego de incorporar el starter (PMS) y cuajo (Cu). Los quesos envasados se maduraron a 4°C y se tomaron muestras a los 7, 20, 40, 57 y 81 días post-elaboración.

Optimización de protocolo de qPCR y RT-qPCR

Se utilizó el software Primer Express (Applied Biosystems, California, USA) para el diseño de primers específicos contra *S. thermophilus*, basado en la secuencia de su gen *tuf* y en la de otras especies de bacterias ácido lácticas (LAB), las cuales se obtuvieron de GenBank. Estas secuencias fueron alineadas utilizando Clustal W2 y BLAST para verificar la especificidad *in silico*. Asimismo, la especificidad de nuestro par de primers (Stherm) fue comparada con primers previamente reportados para hacer blanco en el mismo gen de *S. thermophilus* (5), observándose niveles comparables de especificidad. Los ensayos de qPCR y RT-qPCR se realizaron en un equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y los datos se analizaron con el StepOne software v2.2. Se evaluaron diferentes concentraciones de los primers Stherm, desde 40 a 600 nM y en base a ello se eligió una concentración de 400 nM. Se evaluaron asimismo diferentes condiciones de ciclado y así se estableció el siguiente protocolo: un ciclo a 95°C 15 min, 40 ciclos a 94°C 15 seg, 60°C 30 seg y 72°C 1 min. El cDNA se obtuvo de 1 µg de RNA purificado de cada muestra incubado con Dnase I (1 U/µL) (Invitrogen) durante 15 min. La transcripción reversa (RT) se efectuó con el M-MLV Reverse Transcriptase Kit (Promega, Wisconsin, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Evaluación del umbral de detección de DNA y RNA libres

Muestras de PM (45 mL c/u) se adicionaron con cuatro diluciones seriadas en base diez (6 ng - 6 µg) de DNA o RNA obtenidos del starter comercial liofilizado *S. thermophilus* o con 22 mg de este mismo starter. Las muestras fueron centrifugadas a 9700 xg por 15 min a 4°C y los sobrenadantes se descartaron. Los pellets resultantes, así como las muestras de PM, fueron sometidas a extracción de DNA o RNA seguidas de qPCR o RT-qPCR, respectivamente. Todas las condiciones se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas standard generadas mediante la adición de muestras de queso negativo (sin DNA ni RNA del starter) con distintas cantidades (0.01 µg - 10 mg) de starter liofilizado se muestran en la Fig. 1.

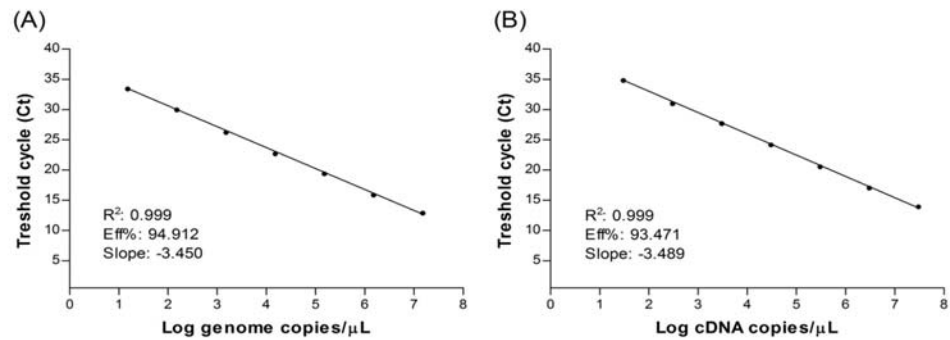


Figura 1. Curvas standard obtenidas por qPCR (panel A) y RT-qPCR (panel B) para *Streptococcus thermophilus*

En nuestro conocimiento, los resultados del presente trabajo constituyen la primera evidencia experimental indicando que el DNA específico detectado por qPCR no puede ser utilizado como indicador de integridad/viabilidad celular, mientras que la incapacidad para detectar RNA libre indica que estas moléculas serían más apropiadas para tal fin (Fig. 2).

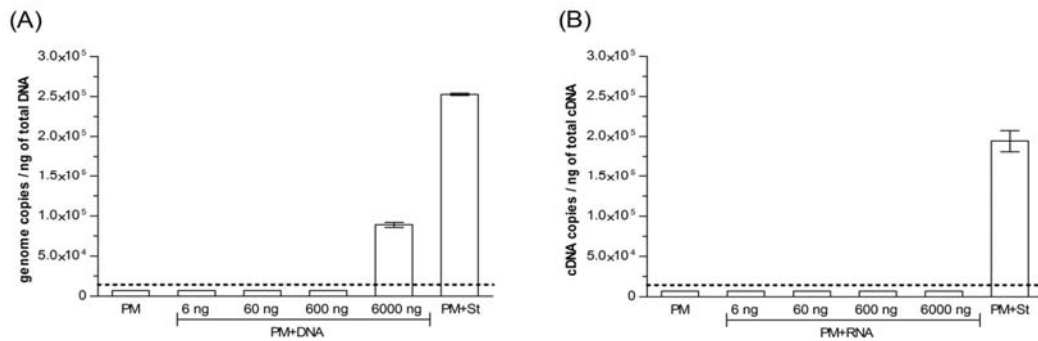


Figura 2. Umbral de detección de DNA y RNA libre determinado por qPCR (panel A) y RT-qPCR (panel B).

El DNA y cDNA del microorganismo *S. thermophilus* pudo ser cuantificado al menos desde 30 min luego de su inoculación y hasta los 81 días de madurado, confirmando así reportes previos (6) donde se postula la posible contribución de esta especie en los perfiles organolépticos (Figs. 3 y 4).

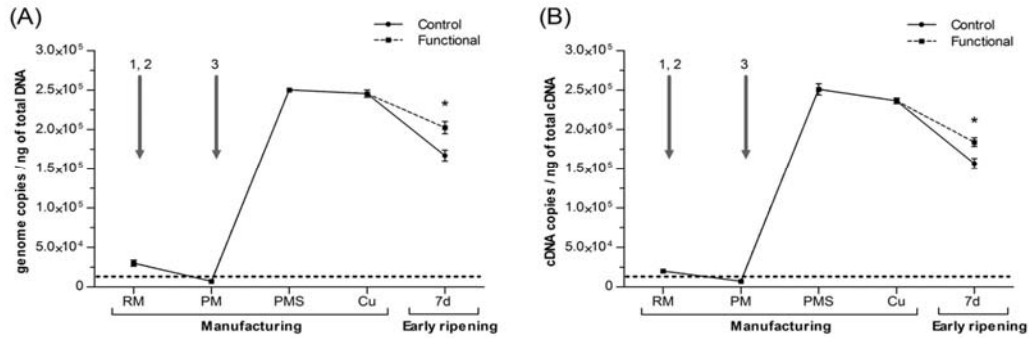


Figura 3. Curso temporal de ácidos nucleicos específicos del cultivo starter *S. thermophilus* durante la producción industrial de quesos funcionales y controles. Leche cruda (RM), leche pasteurizada (PM), PM 30 min luego de incorporar el starter (PMS), cuajo (Cu) y quesos con 7 días de madurado (7d). Flechas: (1) pasteurización, (2) incorporación de fitoesteroles y tocoferoles, (3) adición del starter liofilizado. (*) Diferencias estadísticamente significativas.

El presente trabajo mostró por primera vez que la adición de fitoesteroles en concentraciones funcionales y de tocoferoles, no sólo que no afectó la performance del starter sino que correlacionó con un incremento significativo en sus niveles de DNA y cDNA durante la producción del queso (Fig. 4).

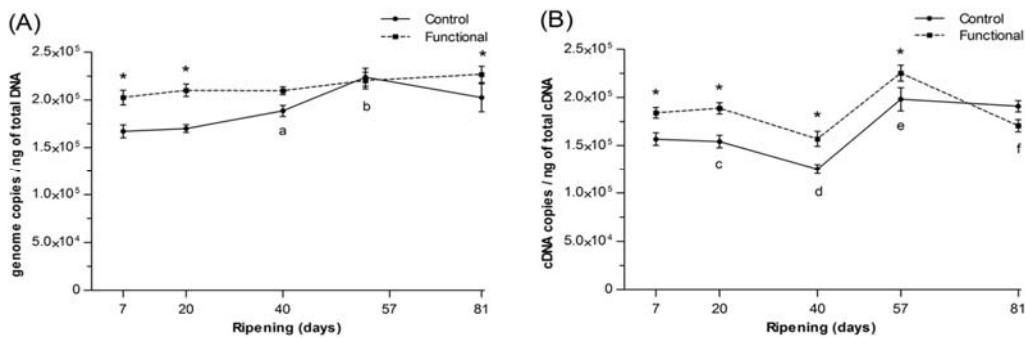


Figura 4. Curso temporal de ácidos nucleicos específicos del cultivo starter *S. thermophilus* durante el madurado de quesos funcionales y controles. Días de madurado (7, 20, 40, 57, 81). (* a-f) diferencias estadísticamente significativas.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se obtuvieron resultados de interés para aquellos abordajes que involucren el estudio de la integridad, viabilidad o actividad metabólica de microorganismos basados en extracción de ácidos nucleicos y cuantificación por qPCR/RT-qPCR.

Asimismo, la información aquí provista es relevante para el diseño industrial de productos lácteos innovadores que impliquen la incorporación de compuestos vegetales u otras moléculas bioactivas relacionadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado mediante el proyecto PNAIyAV-1130043 de INTA y mediante el proyecto FONARSEC 0004 involucrando a INTA, al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT) y a Lácteos Capilla del Señor.

REFERENCIAS:

1. Martirosyan, D.M. (2011). Introduction to Functional Food Science. 2nd edition. Food Science Publisher.
2. Rondanelli, M.; Monteferrario, F.; Faliva, M.A.; Perna, S.; Antonello, N. (2013). Key points for maximum effectiveness and safety for cholesterol-lowering properties of plant sterols and use in the treatment of metabolic syndrome. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93:2605–2610.
3. Sohier, D.; Pavan, S.; Riou, A.; Combrisson, J.; Postollec, F. (2014). Evolution of microbial analytical methods for dairy industry needs. *Frontiers in Microbiology* 5:16.
4. Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. (2000). Institute of Medicine. Food and Nutrition Board Washington DC: National Academy Press.
5. Falentin, H.; Henaff, N.; Le Bivic, P.; Deutsch, S.M.; Parayre, S.; Richoux, R.; Sohier, D.; Thierry, A.; Lortal, S.; Postollec, F. (2012). Reverse transcription quantitative PCR revealed persistency of thermophilic lactic acid bacteria until the end of the ripening of Emmental cheese. *Food Microbiology* 29:132-140.
6. Ruggirello, M.; Dolci, P.; Cocolin, L. (2014). Detection and viability of *Lactococcus lactis* throughout cheese ripening. *PloS one*, 9(12), e114280.