

Avances y tendencias en la industria láctea

La contribución argentina
desde el INLAIN



Jorge Reinheimer
Editor

ediciones UNL





**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DEL LITORAL**

Rector **Enrique Mammarella**

Secretario de Planeamiento Institucional y Académico **Miguel Irigoyen**

Decano Facultad de Ingeniería Química **Adrian Bonivardi**

.....

Avances y tendencias en la industria láctea :
la contribución argentina desde el INLAIN / Jorge
Reinheimer ... [et al.] ; editado por Jorge Reinheimer.
—1a ed.— Santa Fe : Ediciones UNL, 2021.
Libro digital, PDF - (Ciencia y tecnología)

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-749-216-3

1. Industria Química. 2. Lácteos. 3. Bioquímica. I.
Reinheimer, Jorge II. Reinheimer, Jorge, ed.

CDD 540

.....

© Reinheimer, Ale, Audero, Bergamini,
Binetti, Briggiler Marcó, Burns, Candiotti, Capra,
Chiericatti, Costabel, Cuffia, Frisón, George, Giménez,
Guglielmotti, Hynes, Lloréns, Meinardi, Mercanti, Páez,
Peralta, Perotti, Pujato, Quiberoni, Rebechi, Suárez,
Vaudagna, Vélez, Vénica, Vinderola, Wolf, 2021.
Colaboradora: Ma. Sol Ortiz, 2021.

©  ediciones UNL, 2021

—
editorial@unl.edu.ar

www.unl.edu.ar/editorial

Consejo Asesor
Colección Ciencia y Tecnología

Graciela Barranco

Ana María Canal

Miguel Irigoyen

Luis Quevedo

Gustavo Ribero

Ivana Tosti

Alejandro R. Trombert

Dirección Ediciones UNL

Ivana Tosti

Coordinación editorial

María Alejandra Sadrán

Coordinación diseño

Alina Hill

Corrección

Félix Chávez

Diagramación interior y tapa

Nicolás Vasallo

—



Avances y tendencias en la industria láctea

La contribución argentina
desde el Instituto de Lactología
Industrial (INLAIN)

Jorge Reinheimer

Editor

Elisa Ale · Gabriela Audero · Carina Bergamini · Ana Binetti ·
Mariángeles Briggiler Marcó · Patricia Burns · Mario Candiotti ·
Ma. Luján Capra · Carolina Chiericatti · Luciana Costabel · Facundo
Cuffia · Laura Frisón · Guillermo George · Paula Giménez · Daniela
Guglielmotti · Erica Hynes · Desireé Lloréns · Carlos Meinardi ·
Diego Mercanti · Roxana Páez · Guillermo Peralta · Ma. Cristina
Perotti · Silvina Pujato · Andrea Quiberoni · Silvina Rebechi · Viviana
Suárez · Sergio Vaudagna · Ma. Ayelén Vélez · Claudia Vénica ·
Gabriel Vinderola · Irma Wolf



COLECCIÓN
CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Índice

Introducción / 6

LECHES FERMENTADAS / 7

1. Desarrollo de leches fermentadas con probióticos / 8

Gabriel Vinderola y Jorge Reinheimer

2. Funcionalización de leches fermentadas / 28

2.1. Yogur reducido en lactosa e incrementado
en galactooligosacáridos (GOS) prebióticos / 28

Claudia Vénica, Carina Bergamini, Verónica Wolf y Ma. Cristina Perotti

2.2. Yogur enriquecido en caseinofosfopéptidos (CPP) / 43

Carina Bergamini, Verónica Wolf y Ma. Cristina Perotti

2.3. Ácido linoleico conjugado (CLA) en yogur
y formulación de un ingrediente alto CLA / 51

Ayelén Vélez, Silvina Rebechi, Erica Hynes,

Leila Pozza, Verónica Wolf y Ma. Cristina Perotti

3. Mohos productores de gas y *Gluconobacter*: nuevos alterantes microbianos en yogures argentinos / 59

Ma. Luján Capra, Laura Frisón, Carolina Chiericatti,

Ana Binetti y Jorge Reinheimer

QUESOS / 70

1. Análisis crítico de la influencia de las etapas de elaboración quesera sobre el rendimiento y la calidad del producto / 71

Carlos Meinardi y Mario Candiotti

2. Caracterización de quesos típicos argentinos / 91

Verónica Wolf, Susana Palma, Carina Bergamini y Ma. Cristina Perotti

3. Estrategias tecnológicas para acelerar la maduración y diversificar el flavor de quesos duros / 106

3.1. Tratamientos físicos aplicados durante
el proceso de elaboración / 107

Ma. Ayelén Vélez, Ma. Cristina Perotti, Luciana Costabel, Mario Candiotti, Leila

Pozza, Susana Palma, Carlos Meinardi, Verónica Wolf,

Carina Bergamini y Erica Hynes

3.2. Tratamientos físicos aplicados durante
el proceso de maduración / 117

Luciana Costabel, Carina Bergamini, Erica Hynes y Sergio Vaudagna

3.3. Diseño de fermentos primarios y adjuntos / 124

Facundo Cuffia, Carina Bergamini, Verónica Wolf, Guillermo George, Erica Hynes y Ma. Cristina Perotti

4. Cultivos adjuntos de quesería

a partir de cepas de origen NSLAB / 135

Guillermo Peralta, Carina Bergamini, Verónica Wolf, Mario Candiotti, Ma. Gabriela Audero, Rosana Páez, Paula Giménez, Ma. Cristina Perotti y Erica Hynes.

5. Tendencias y desafíos en la producción de quesos frescos de pasta hilada / 149

Facundo Cuffia, Guillermo George, Jorge Reinheimer, Carlos Meinardi y Patricia Burns.

6. Exopolisacáridos (EPS) de *Lactobacillus fermentum*: nuevos ingredientes alimentarios con doble rol tecnológico y funcional para productos lácteos / 164

Elisa Ale, Jorge Reinheimer y Ana Binetti

7. Fosfatos como antimicrobianos y antivirales en la industria láctea. Uso como antifúngico en quesos de mediana y larga maduración / 179

Viviana Suárez, Jorge Reinheimer y Carlos Meinardi

8. Microorganismos alterantes en la industria láctea. Incidencia regional en los últimos 20 años / 196

Daniela Guglielmotti, Viviana Suárez, Ana Binetti, Diego Mercanti, Andrea Quiberoni, Desireé Lloréns, Mariángeles Briggiler Marcó, Ma. Luján Capra, Patricia Burns y Jorge Reinheimer

9. Fagos en la industria láctea: problemática actual y metodologías alternativas para disminuir su incidencia / 209

Diego Mercanti, Silvina Pujato, Ma. Luján Capra, Daniela Guglielmotti, Mariángeles Briggiler Marcó, Viviana Suárez y Andrea Quiberoni

10. Lechería ovina y producción de quesos como alternativa innovadora y generadora de alto valor agregado / 224

Carlos Meinardi, Mario Candiotti, Silvina Rebechi, Facundo Cuffia, Carina Bergamini y Susana Palma.

11. Nuevas tendencias en la industrialización de la leche bubalina / 234

Silvina Rebechi, Carlos Meinardi, Facundo Cuffia, Mario Candiotti y Guillermo George

OTROS / 245

Adulteración de leche y productos lácteos / 246

Silvina Rebechi, Susana Palma, Verónica Wolf y Ma. Cristina Perotti

Sobre los autores / 263

Introducción

La vinculación ciencia–industria, muy débil bastante tiempo atrás, ha evolucionado afortunadamente hasta la realidad cuando existe un acercamiento necesario y muy positivo entre ambos actores. Los investigadores que estuvimos desde un principio convencidos de que eso era posible, podemos hoy disfrutar de un vínculo que nos hace crecer a todos. Por supuesto, nadie conoce todo, pero si se suman los conocimientos y la realidad de unos y otros el estado que se alcanza es superador. Los investigadores del INLAIN, dedicados desde los años 70 a estudiar la problemática microbiológica, química y tecnológica de la industria láctea, hemos considerado que los conocimientos ganados podían volcarse a la realidad industrial; y eso hicimos. La industria se volvió receptiva de los mismos y esto determinó una especie de «alianza» para afrontar situaciones problemáticas. El INLAIN se acercó, y sigue haciéndolo, a la realidad industrial, desconocida para quienes permanecen solo en los laboratorios. La industria accede a conocimientos, opiniones y orientaciones que podemos dar en función de nuestra dedicación al estudio e interpretación de lo real.

En esta obra, continuación de otra publicada en 2006 por Ediciones UNL, decidimos reflejar los principales estudios que se llevaron a cabo para o con nuestras industrias lácteas en los últimos 12 años, así como ofrecer estudios en curso potencialmente aplicables. Los investigadores del INLAIN consideramos que este es el camino que indica qué hacer con el conocimiento. Lo dedicamos a nuestra industria y a los investigadores que compartan nuestra visión.

Leches fermentadas

1. Desarrollo de leches fermentadas con probióticos

Gabriel Vinderola y Jorge Reinheimer

Conceptos de microbiota intestinal y la necesidad de consumir microorganismos vivos

Históricamente se consideró al hombre (*Homo sapiens*) como un conjunto de células eucariotas, diferente de otras especies cercanas por su inteligencia. Actualmente estamos empezando a asumirnos como una asociación compleja entre células eucariotas humanas y microorganismos, cuya existencia de forma disociada sería inviable. En este contexto se acuñó el término «Holobionte», donde *holo* significa todo, y *bios* se refiere a la vida. Holobionte es, por lo tanto, un organismo multicelular complejo —el que llamábamos *Ser Humano*— y todos sus microorganismos asociados. Vivimos empapados en un mundo de microbios. Estamos tapizados por fuera (la piel, incluso la superficie de los ojos) y por dentro (las mucosas), por microbios. Incluso, hay restos microbianos en órganos internos que creíamos estériles, como el cerebro, los músculos y el corazón (Lluch y col., 2015).

El término «microbiota» hace referencia al conjunto de microorganismos que hospedamos, mientras que el término «microbioma» refiere al conjunto de genes de esos microorganismos. Si bien estos microorganismos pueden ser mohos, levaduras, bacterias, y virus, son las bacterias el grupo más abundante, estudiado y conocido hasta el momento. Más de

3 000 especies bacterianas pueden habitar el tracto intestinal de un individuo, más de 600 en la cavidad oral, 300 en el tracto respiratorio, 100 en la piel, 500 en el tracto urinario y casi 300 en la cavidad vaginal (Rojo y col., 2017). La glándula mamaria puede albergar una microbiota propia, incluso en mujeres sin historia de lactancia (Urbaniak et al., 2016). Se calcula que por cada gen humano hay entre 100 y 150 genes bacterianos (Qin et al., 2010). Dos individuos difieren en menos de 0,01 % de su material genético eucariota (cromosomas), pero pueden diferir en más del 50 % en términos de material genético microbiano.

Las acciones coordinadas de más del trillón de células microbianas que nos habitan son esenciales para la vida humana. Esta población de bacterias alcanza su máxima densidad en el intestino grueso, donde forman una comunidad compleja denominada microbiota intestinal, compuesta por microorganismos autóctonos o indígenas (heredados) y microorganismos alóctonos o transitorios, que consumimos con los alimentos. Es aquí donde entran en juego los yogures con probióticos, que veremos más adelante, como la fuente más abundante de microorganismos transitorios. Una minoría (en especies y en abundancia) de microorganismos patógenos (denominados «oportunistas») pueden ser miembros normales de la microbiota intestinal pero pueden convertirse en una amenaza para la salud del hospedador cuando el ecosistema intestinal está alterado. La composición de la microbiota intestinal puede verse afectada por factores diversos como el nivel de acidez y oxígeno, la disponibilidad de nutrientes, los alimentos y medicamentos que consumimos, numerosas patologías (incluidas la obesidad, la inflamación intestinal, la diarrea, los desórdenes del espectro autista, la desnutrición, cáncer, etc.), la edad y el nivel de estrés (Rojo et al., 2017).

Entre la microbiota y el hombre se establece una verdadera simbiosis. La principal función de ella es la fermentación del resto de alimentos que llegan al colon a fin de liberar nutrientes que le permitan proliferar y sobrevivir, mientras que el hombre se beneficia de los productos de la fermentación (principalmente ácidos grasos de cadena corta, vitaminas, etc.). Otras actividades de la microbiota intestinal es la promoción de la diferenciación celular del huésped, protegiéndolo de la colonización e infección de patógenos, y estimulando y modulando el sistema inmunológico de la mucosa intestinal. Numerosos estudios epidemiológicos han establecido ya una contundente correlación entre algunos de los factores que perturban a la microbiota intestinal y determinados trastornos inmunológicos y metabólicos (Tamburini et al., 2016). Esta toma de conciencia de la relación entre microbiota intestinal, su función y la salud, ha impulsado el desarrollo de estrategias para

influir en el desarrollo, la composición y las actividades de la microbiota mediante el uso de, por ejemplo, alimentos fermentados (yogures), bacterias probióticas y/o sustratos prebióticos.

Las bacterias aparecieron en la Tierra hace más de 3 500 millones de años, mientras que nuestra especie hace solo unos 200 000 a 300 000 años (Hershkovitz y col., 2018), por lo que evolucionamos en íntimo contacto con microorganismos a través de los alimentos y el ambiente. Los cambios en los estilos de vida humanos (vida urbana, uso de antisépticos y desinfectantes, menor consumo de alimentos fermentados) y en las prácticas médicas (uso irracional de antibióticos, mayor tasa de cesáreas, lactancia materna reducida) han perturbado la composición de la microbiota, disminuyendo su abundancia y diversidad. Se ha reducido nuestra exposición a las llamadas viejas infecciones y a los organismos del entorno natural con el que los seres humanos co-evolucionaron, instaurándose lo que se llama la «Teoría de la Higiene»: la aparición de enfermedades inflamatorias (síndrome metabólico, diabetes, sobrepeso, obesidad, enfermedad de Crohn) y desórdenes autoinmunes (alergias, asma, inflamación) como resultado de una menor exposición microbiana (Rook y col., 2017). Si comparamos la carga microbiana de una dieta altamente industrializada y una dieta que incorpora yogures, la cantidad de microorganismos vivos y benéficos que suministra la segunda es más de 1 000 veces mayor que la primera (Lang y col., 2014). Es interesante notar que si bien la pasteurización de los alimentos aseguró la inocuidad y estabilidad de los mismos, es aún posible «re-funcionalizarlos» con bacterias vivas, como es el caso de los yogures con probióticos. La leche se pasteuriza para evitar la proliferación de microorganismos patógenos y deteriorantes, pero seguido a esto se agregan microorganismos benéficos desde el punto de vista tecnológico y funcional. En este sentido, el yogur y el yogur con probióticos son de los pocos alimentos de la vida moderna (junto a otros alimentos fermentados pero que no son parte de nuestra cultura: kimchi, natto, miso) que nos devuelve el contacto natural y evolutivo que el *Homo sapiens* tuvo con los microorganismos.

La microbiota intestinal se establece, diversifica y madura de forma dinámica y gradual en los dos a tres primeros años de vida. En este período existe una sucesión de microbios que se van instalando y diversificando en el intestino del bebé, siendo un proceso determinado por numerosos factores (Koenig y col., 2011). Incluso es posible detectar restos microbianos (paredes celulares, ADN) antes de nacer en la placenta, el líquido amniótico, la membrana fetal, la sangre del cordón umbilical y luego en el meconio. Incluso se han detectado oligosacáridos de leche materna ya en el útero (Wise y col., 2018). Sin embargo, la primera exposición masiva del recién

nacido a los microbios ocurre durante el parto y depende en gran medida si es vaginal o por cesárea, siendo el primero el de preferencia ya que los recién nacidos se enriquecen con numerosas especies de *Lactobacillus*, habitantes naturales de la vagina materna (Tamburini y col., 2016). Más del 95 % de la microbiota en un canal vaginal saludable son lactobacilos. El uso de antibióticos posnatales puede perturbar el delicado ecosistema de la microbiota neonatal en establecimiento. Los cambios que los antibióticos inducen en la composición de la microbiota dependen del sitio anatómico considerado, del tipo y de la dosis utilizada (Tanaka y col., 2009). En muchos casos una administración de solo 4 días de antibióticos, reduce drásticamente los niveles de bifidobacterias en el intestino, y les toma de 2 a 3 meses en recuperar su población.

La leche materna es clave en el establecimiento de la microbiota intestinal debido a la enorme diversidad de microorganismos que aporta (Hunt y col., 2011). La lactancia, en particular, se asocia con numerosos beneficios para el niño tales como el aumento de la resistencia a infecciones, menor riesgo de obesidad y menor riesgo de alergias, y para la madre, la duración de la lactancia se asocia con un menor riesgo de hipertensión, hiperlipidemia, enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2. Las propiedades beneficiosas de la lactancia son mediadas por factores que son secretados en la leche materna, incluyendo inmunoglobina (Ig) A, lactoferrina y defensinas, además de bifidobacterias y lactobacilos (Tamburini y col., 2016). Cuando se introduzca el concepto de probióticos podremos pensar en la leche materna, por su contenido en lactobacilos y bifidobacterias, como un alimento naturalmente enriquecido con bacterias probióticas putativas. Otros factores relacionados positivamente al establecimiento adecuado de una microbiota intestinal diversa y funcional son el tamaño de la familia, la interacción con el medio ambiente, los hermanos, y la presencia de mascotas.

La combinación de parto vaginal, leche materna, interacción con el medio ambiente y la familia favorecen la instalación de una microbiota intestinal diversa y funcional, mientras que factores como el parto por cesárea, la administración de antibióticos a la madre y al hijo, el uso de leche de fórmula, la sanitización excesiva y, la falta de contacto con el medio ambiente, conducen en el sentido contrario (Toh y Allen–Vercoe, 2015). Este planteamiento es la base de la teoría de la higiene (Bach, 2002) la cual postula que un ambiente que permite una exposición natural a los microorganismos protege contra las enfermedades alérgicas y autoinmunes, y predispone menos al desarrollo de diabetes, sobrepeso, obesidad y enfermedades inflamatorias, mientras que un ambiente extremadamente aséptico aumenta la incidencia de estos trastornos. La base mecánica de este fenómeno sería la «edu-

cación» del sistema inmune asociado a la mucosa intestinal que realiza la microbiota intestinal cuando se instala y desarrolla en condiciones adecuadas. Es decir, nuestro organismo necesita del contacto temprano y sostenido con microorganismos para la educación y correcto funcionamiento de su sistema inmune, pero este contacto con microorganismos es también necesario a lo largo de la vida. En un estudio llevado a cabo por Olivares y col. (2006), se demostró que personas que consumían alimentos fermentados por más de 5 días a la semana y dejaban de hacerlo, experimentaban una depresión en su función inmunológica (disminución de defensas), la cual podía restituirse al reincorporar este tipo de alimentos.

El yogur: un alimento fermentado milenario, presente en nuestros días

El yogur, y de forma más general las leches fermentadas, ha sido parte de la dieta humana durante miles de años (Fisberg y Machado, 2015). Hace ya más de 100 años, el microbiólogo ucraniano Elie Metchnikoff estableció en su trabajo «La Prolongación de la Vida: Estudios Optimistas», que el consumo de yogur estaba relacionado con una mayor longevidad y la salud intestinal (Metchnikoff, 1907).

Entre los años 10 000 y 4 000 a.c. el hombre comenzó a fabricar utensilios, a desarrollar la agricultura, el pastoreo, la cría y domesticación de animales, obteniendo de ellos leche. El hombre comenzó así a tener excedente de alimentos y comenzó a desarrollar formas para conservarlos. La fermentación apareció entonces como un proceso tecnológico de transformación y conservación de alimentos. Mediante este proceso, un sustrato alimenticio es transformado por acción microbiana para convertirse en un producto más estable y con mejores características sensoriales: vino de las uvas, cerveza de la malta, pan del trigo y yogur de la leche. Por entonces, la leche recién ordeñada se colocaba en cuencos vegetales o en estómagos de mamíferos para su almacenamiento. La presencia ubicua de bacterias lácticas en estos contenedores, combinada con las altas temperaturas de las diferentes zonas geográficas donde estas prácticas tenían lugar (la antigua Mesopotamia, la cuenca de los ríos Éufrates y Tigris, las estepas asiáticas y el Cáucaso), desencadenaron la fermentación espontánea de la leche y su transformación en una leche fermentada: un producto ácido, viscoso, aromático, estable en el tiempo, resistente a la contaminación por microorganismos patógenos o deteriorantes y con propiedades que se fueron percibiendo, de forma anecdótica, como benéficas para la salud.

Las leches fermentadas se originaron simultáneamente en diferentes regiones geográficas, adoptando nombres diversos tales como yogur, kéfir, koumiss, täfil, filmjök, täetmjolk, längofilviili, dahi, eyran, busa, kissel, naja, urgotnic, leban, zabady, mast, dough, roba, mazun, katyk. Se trata siempre esencialmente del mismo alimento, con variaciones en el tipo de leche utilizada (vaca, búfala, cabra, oveja, camello), los microorganismos involucrados (bacterias, levaduras, o combinaciones de estos), las condiciones de fermentación (tiempo y temperatura) y el drenado parcial o no del suero, para hacerlas más espesas (Tamime y Robinson, 2000). Con la urbanización, las leches fermentadas artesanales ancestrales le fueron cediendo paulatinamente lugar al yogur comercial. No obstante, podemos afirmar que el yogur es producido industrialmente desde hace más de 100 años y vale la pena mencionar que en 2019 se cumple el primer centenario de la primera producción de yogur por parte de Danone, un verdadero sobreviviente de las leches fermentadas ancestrales (Aryana y Olson, 2017).

La vida moderna implica exponer a nuestro organismo, con su genoma ancestral, a una dieta moderna y occidentalizada, en lugar de a una dieta milenaria, la cual incluía una alta proporción de alimentos con microorganismos vivos. En este contexto, el consumo de yogur nos puede proveer de una cantidad tal de microorganismos que nos acerque al contacto de nuestro antiguo genoma con microorganismos viables. La presencia de microorganismos en el intestino no solo pone en funcionamiento el sistema inmune allí presente, sino que lo mantiene funcionando. Los ratones libres de gérmenes (sin microbiota intestinal) presentan una muy baja cantidad de células productoras de IGA, la principal inmunoglobulina del intestino encargada de las defensas, en comparación con animales convencionales, colonizados, los que presentan una alta tasa de proliferación de estas células en la lámina propia (Macpherson, 2006). Es decir, la presencia de bacterias pone al sistema inmune en funcionamiento y la ausencia de ellas deprime parcialmente su función. Gadotti y col. (2018) reportaron una correlación inversa entre el consumo de productos lácteos y los perfiles inflamatorios, indicando que el aumento del consumo de yogur podría tener un efecto protector sobre la inflamación, siendo a la vez el consumo de yogur un parámetro indicador de una mayor calidad de vida de las personas (Babio y col., 2017). Nuestra dieta occidentalizada se ha ido alejando progresivamente de los requerimientos del antiguo genoma humano, expuesto evolutivamente a una dieta con una significativa presencia de alimentos fermentados, entre otros. Una de las consecuencias de esta dieta occidentalizada es la escasa provisión de microorganismos vivos, necesarios para mantener en funcionamiento el sistema inmune de la mucosa intestinal. De estos ali-

mentos milenarios, el yogur es un actual sobreviviente, capaz de proveer en una sola porción una alta tasa de microorganismos benéficos y productos de fermentación también benéficos para la salud (ácido láctico, péptidos, exopolisacáridos, agentes antimicrobianos, etc.).

La definición de probióticos se gestó en Argentina

En octubre de 2001, un grupo de expertos internacionales se reunió en Córdoba por encargo de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) con el objetivo de analizar, debatir y adoptar una definición con relación a ciertos microorganismos con efectos sobre la salud demostrados a través de estudios clínicos. La definición propuesta estipula que los probióticos son «microorganismos vivos que cuando son administrados en dosis adecuadas ejercen un efecto benéfico sobre la salud». Esta definición ha tenido aceptación a nivel científico global, industrial y por parte de los entes reguladores de esta temática en numerosos países. En Argentina, el Instituto de Nacional de Alimentos (INAL), dependiente del ANMAT, la incorporó en el Código Alimentario Argentino en 2011. Si bien la definición dice «microorganismos» en un sentido amplio, en la práctica son bacterias, y en mucho menor medida ciertas levaduras, las que se han usado como probióticos en alimentos y suplementos dietarios. Las especies bacterianas más comúnmente empleadas como probióticos son *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, etc. Es pertinente aclarar que la capacidad probiótica es dependiente de la cepa y no es generalizable a una especie.

Alimentos utilizados como vehículos de probióticos

Según Euromonitor International, mientras en Estados Unidos el 29% del mercado de probióticos está representado por suplementos alimentarios, en América Latina es solo del 4%, siendo el resto vehiculizado en alimentos tipo yogur (www.euromonitor.com, fecha de último acceso 10 de abril de 2019). En forma general, en nuestro país a los probióticos los encontramos mayoritariamente en yogures o, en sentido más amplio, en las leches fermentadas. Si bien el mercado de alimentos probióticos está fuertemente dominado por los productos lácteos, yogures en particular, la industria ali-

mentaria internacional ha desarrollado una amplia gama de productos con probióticos, como quesos, bebidas basadas en suero de queso, postres lácteos y helados. Con relación a matrices no lácteas, se han incorporado en jugos de frutas, barras de chocolate, purés de frutas para bebés, frutas trozadas o jugos de fruta en polvo, embutidos, cereales fermentados o productos en base soja (Vijaya Kumar y col., 2015).

Leches fermentadas y yogures con probióticos

El artículo 576 (Resolución Conjunta SPRYRS y SAGPYA 33/2006 y 563/2006) del Código Alimentario Argentino define como Leches Fermentadas a los productos, adicionados o no de otras sustancias alimenticias, obtenidos por coagulación y disminución del pH de la leche o leche reconstituida, adicionada o no de otros productos lácteos, por fermentación láctica mediante la acción de cultivos de microorganismos específicos. Estos microorganismos específicos deben ser viables, activos y abundantes en el producto final durante su período de validez. En particular, entiende por yogur al producto cuya fermentación se realiza con cultivos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (llamados fermentos o cultivos iniciadores) a los que en forma complementaria pueden acompañar otras bacterias acidolácticas (probióticos, por ejemplo) que por su actividad contribuyen a la determinación de las características del producto terminado. En síntesis, el yogur es el producto de la fermentación de la leche con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Si bien estas bacterias tienen características probióticas, como la capacidad de reducir los síntomas de intolerancia a la lactosa, reconocidas por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1763>, fecha de último acceso 10 de abril de 2019) y pueden ser encontradas en heces luego del consumo de yogur (Elli y col., 2006), estas bacterias tienen relativamente poca capacidad de tolerar las condiciones ácidas del estómago, perdiendo significativamente viabilidad durante la digestión gastrointestinal (Morelli, 2017). En este sentido, las bacterias probióticas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, antes mencionadas, poseen en general una mayor resistencia a las condiciones adversas gastrointestinales (alta acidez, presencia de enzimas hidrolíticas y sales biliares con acción detergente sobre las membranas lipídicas de las bacterias) que las bacterias del fermento del yogur, esto garantiza su llegada al intestino en elevados niveles de células viables (Champagne, 2014). En este contexto, denominaremos bacterias del fermento o cultivos

iniciadores o acidificantes a las bacterias empleadas para la transformación de la leche en yogur: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, mientras que con el término probióticos, nos referiremos a las especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, para las cuales se identificaron cepas probióticas.

Argentina ha sido pionera en el desarrollo de leches fermentadas probióticas. Uno de los primeros productos con probióticos que llegaron al mercado, a mediados de la década del 90, fueron las llamadas «leches cultivadas», las cuales poseían en su formulación microbiológica a *S. thermophilus* y cepas probióticas de *L. acidophilus* y *B. bifidum*. Incluso antes de los años 90, el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, CONICET, Tucumán) fue pionero en el desarrollo junto a la empresa SanCor CUL de la leche fermentada probiótica denominada Leche SanCorBio, la cual poseía la cepa *L. casei* CRL 431, y que está aún presente en el mercado. La cepa *L. rhamnosus* GG fue incorporada en yogures en Argentina por La Serenísima en el año 1995. Años más tarde, los productos Actimel (2001) y Activia (2006) que incluyen las cepas probióticas *L. casei* DN114001 y *B. animalis* subsp. *lactis* DN173010, respectivamente, también llegaron a nuestro país. Es posible conseguir en Argentina y en Brasil, por ejemplo, la leche fermentada probiótica japonesa Yakult, conteniendo *L. casei* Shirota. Las cepas probióticas de Chr. Hansen, *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 y *L. acidophilus* LA5 fueron utilizadas en otras versiones de las llamadas leches cultivadas en los años 90. Con relación a los quesos, una colaboración establecida en 1997 entre la empresa Sucesores de Alfredo Williner SA (Rafaela, Santa Fe) y el Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET, Santa Fe) permitió el desarrollo del primer queso probiótico de Latinoamérica, el Bioqueso Ilolay Vita, lanzado al mercado en 1999. A principios de la década del 2010, la empresa La Serenísima lanzó al mercado un queso tipo Port Salut con la cepa *L. rhamnosus* GG.

Elaboración de yogures con probióticos

Para la elaboración de yogures con probióticos la industria láctea emplea a las bacterias del fermento y a los probióticos como cultivos concentrados congelados o liofilizados (deshidratados), y bajo la modalidad tecnológica denominada DVI (Direct VAT Inoculation), lo que significa el agregado directo de los fermentos y los probióticos al tanque de fermentación donde se fermenta la leche para producir el yogur (Farnworth y Champagne, 2016), habiéndose abandonado progresivamente la práctica de ini-

ciar la fermentación con una fracción del cultivo de una fabricación anterior. La disponibilidad de estos cultivos altamente concentrados y estandarizados implica la producción de biomasa, o de células viables de estas bacterias, en fermentadores hasta una alta densidad de células viables (más de 1×10^9 UFC/mL). Luego de la producción de esta biomasa de células, las mismas deben ser concentradas por centrifugación o mediante filtración por membranas, para luego ser adicionadas de ingredientes denominados crioprotectores (lactosa, glucosa, trehalosa, maltodextrina, sacarosa, leche descremada, proteínas de suero) que tendrán la función de proteger a las células para mantenerlas viables y activas durante el proceso de congelamiento o congelamiento/deshidratación, y posterior conservación. Luego del agregado de las sustancias protectoras, las células son congeladas rápidamente por goteo en una batea de nitrógeno líquido, lo que las convertirá instantáneamente en pequeñas esferas congeladas (5–10 mm de diámetro) que deben mantenerse a la menor temperatura posible (idealmente menos de 40°C bajo cero). Estos cultivos concentrados congelados presentan niveles de células viables generalmente mayores a 1×10^{10} UFC/g. Si el cultivo se comercializará en formato liofilizado, los pellets de células congeladas son sometidos a un proceso tecnológico adicional de remoción de agua a ultrabaja presión; este proceso se denomina liofilización e implica la sublimación del agua, es decir, el pasaje directo del estado sólido a vapor de la misma. Los cultivos así deshidratados se denominan cultivos liofilizados y suelen presentar un nivel de células viables cercanos o mayores a 1×10^{11} UFC/g (Farnworth y Champagne, 2016). Los cultivos DVI pueden tener una vida útil de entre 12 y 24 meses si se mantienen en las condiciones adecuadas de almacenamiento sugeridas por el fabricante.

Es posible distinguir *a priori* tres tipos de yogures: aquellos denominados «firmes», los cuales se reconocen por estar disponibles en potes y presentar una alta viscosidad, lo que hace que se deban consumir con cuchara, en contraposición a aquellos denominados «bebibles» y «líquidos», que se pueden beber directamente de la botella por ser más fluidos, es decir, más o menos líquidos según la formulación y el proceso tecnológico que le sigue a la fermentación. Para la elaboración de un yogur es necesario partir de una leche de buena calidad, es decir que posea una carga microbiana total moderada (la cual será reducida a niveles inocuos mediante dos tratamientos térmicos) y la ausencia de antibióticos, que podrían provenir de la producción primaria de la leche. La leche de buena calidad proveniente de los tambos es recibida en la planta industrial y tratada térmicamente para ser estabilizada. Es entonces parcial o totalmente descremada, adicionada de sólidos lácteos (leche descremada en polvo, por ejemplo), para elevar el contenido de sólidos totales

hasta 10–15% (p/v) y otros ingredientes (azúcares, almidón, gelatina, edulcorantes), seguido de un segundo tratamiento térmico para la inactivación de microorganismos patógenos y deteriorantes. Al proceso térmico le sigue otro de homogeneización, por el cual se logra reducir el tamaño de los glóbulos grasos de la leche y obtener un producto con una textura más suave y homogénea (Champagne, 2014). Llegado a este punto, la leche será inoculada en condiciones de extrema asepsia con las bacterias del fermento y, si se tratara de un yogur firme, con los probióticos, ya que en este tipo de yogures la fermentación de la leche tendrá lugar dentro del mismo contenedor o pote que llegará al consumidor, y no dentro de un tanque fermentador. En el caso de los yogures batidos o bebibles, la fermentación se lleva a cabo en grandes fermentadores de acero inoxidable, y el producto coagulado resultante sufre un proceso de quiebre de la cuajada y fluidificación mediante el paso por bombas especializadas, que dependiendo de la intensidad de este tratamiento se obtendrá un producto más o menos bebible (agitación suave) o líquido (agitación vigorosa). Los probióticos pueden ser entonces agregados en esta instancia, una vez enfriado parcialmente el producto. Cabe aclarar que la fermentación de la leche, es decir la acidificación desde el pH natural de la misma hasta el pH final del producto, cercano a pH 4,5, es una tarea llevada a cabo por las bacterias del fermento cuando la leche se termostatiza a 42–43 °C. *Streptococcus thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* establecen entre sí un fenómeno de mutua cooperación, denominado específicamente protooperación. Esta asociación hace que ambas especies crezcan en leche a mayor velocidad de que si lo hicieran por separado, debido a que cada especie produce metabolitos que son aprovechados por la otra. Esto permite reducir el pH de la leche en un período generalmente menor a las 5–6 h. Si los probióticos están presentes durante el proceso fermentativo, poco pueden aportar al mismo acidificando y creciendo, por lo que deben ser agregados a la leche en los niveles de células viables que se pretenden estén en el producto final. Durante la fermentación láctica de la leche las bacterias del fermento pueden llegar a niveles de $1 \times 10^{8-9}$ UFC/mL mientras que los probióticos serán adicionados a niveles de 10^7 UFC/mL, pudiendo alcanzar concentraciones de solo un orden logarítmico más (10^8 UFC/mL) en el caso de que sean capaces de desarrollarse durante la fermentación. Son en estos niveles de células viables en los que deben encontrarse tanto las bacterias del fermento como los probióticos, para que un yogur con probióticos ejerza su efecto benéfico sobre la salud. Numerosos metabolitos microbianos, no presentes en la leche antes de la fermentación, aparecen en el yogur como resultado de la actividad de las bacterias lácticas del fermento. Estos productos son el ácido láctico y otros ácidos orgánicos, los péptidos derivados de la acción hidrolítica de las bacte-

rias lácticas principalmente sobre la principal proteína de la leche (la caseína) (Korhonen, 2009), los exopolisacáridos o cadenas poliméricas de azúcares con efectos tecnológicos espesantes y funcionales sobre la salud (Harutoshi, 2013), compuestos antimicrobianos de diferente naturaleza (peróxido de hidrógeno, bacteriocinas) que, junto al ácido láctico, contribuyen a la estabilidad y seguridad microbiológica del yogur, e incluso galactooligosacáridos con propiedades prebióticas, provenientes de reacciones bioquímicas de la lactosa durante la fermentación (Martínez–Villauenga y col., 2008). Todos estos componentes no microbianos contribuyen a la acción benéfica de los probióticos en yogures.

Desde que en el Instituto de Lactología Industrial (UNL–CONICET) se comenzó a desarrollar la línea de investigación de probióticos en productos lácteos fermentados, a finales de 1995, se iniciaron una serie de estudios de carácter aplicado, tendientes a comprender las variables microbiológicas y tecnológicas puestas en juego en el desarrollo de este tipo de alimentos. Se estudió la sobrevivencia de bacterias lácticas y probióticas en los productos lácteos comerciales disponible en esa época (Biorollo y col., 2000; Vinderola y col., 2000a), la carbonatación de las leches fermentadas como estrategia tecnológica para aumentar la sobrevivencia de los probióticos, en colaboración con el Instituto de Productos Lácteos de Asturias (Vinderola y col., 2000b; Gueimonde y col., 2006), las interacciones entre bacterias lácticas y probióticas (Vinderola y col., 2002a), la influencia de los ingredientes utilizados en leches fermentadas y quesos en la sobrevivencia de probióticos (Vinderola y col., 2002b), la resistencia de estos microorganismos a las barreras biológicas (Vinderola y Reinheimer, 2003) o la sobrevivencia según el tipo de inoculación (Burns y col., 2014). En este período se desarrolló también el primer queso de Latinoamérica con bacterias probióticas junto a la empresa santafesina Sucesores de Alfredo Williner (Vinderola y col., 2000a), con estudios de funcionalidad en animales (Medici y col., 2004). En los años posteriores se comenzaron a realizar estudios *in vivo*, en animales de laboratorio, sobre los efectos de las leches fermentadas y los probióticos sobre la respuesta inmunológica de la mucosa intestinal (Vinderola y col., 2004a, 2004b, 2005a, 2005b, 2005c, 2006a, 2006b, 2006c) y la capacidad de prevenir infecciones por patógenos intestinales (Medici y col., 2005; Vinderola y col., 2007). Otros tratamientos tecnológicos, como la homogenización por alta presión, fueron explorados junto a un grupo de investigación italiano, como estrategia para modificar las propiedades funcionales de bacterias probióticas (Patrignani y col., 2009; Tabanelli y col., 2012, 2013, 2014, 2015). Desde 2008 se comenzó a trabajar en el aislamiento y caracterización de bacterias probióticas autóctonas a partir de leche materna, lográndose desarrollar

un cultivo probiótico, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 (Zacarías y col., 2011, 2014, 2017, 2018; Vinderola y col., 2012; Burns y col., 2017), el cual ha sido temporalmente cedido en préstamo en 2018 y por dos años, al grupo francés Pileje para el desarrollo de un suplemento dietario probiótico.

Recuento de células viables de probióticos en yogures

Fue con esta temática que se inició la investigación científica en probióticos en el Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET) a mediados de los años 90, lográndose la primera publicación en el tema hacia fines de esa década (Vinderola y Reinheimer, 1999). La definición de probióticos indica que estos microorganismos deben estar viables y en cantidades adecuadas al momento de ser administrados. Para los probióticos en yogures, esto implica que las cepas benéficas deben tolerar el proceso industrial de producción de este alimento y mantenerse viables a lo largo del período de vida útil, el cual comprende un tiempo que puede ir más allá del mes. Durante este período, el producto debe ser mantenido en refrigeración (5–8 °C), lo cual favorece la sobrevivencia del probiótico. Si bien no existe un estándar internacional ni una dosis efectiva de probióticos para todas las cepas disponibles, los estudios de revisión sistemática y meta-análisis indican que un consumo de aproximadamente 1×10^9 células totales de probióticos por día serían suficiente para garantizar un efecto benéfico en la salud (Ouweland). Esta cantidad de bacterias se logra si la porción de 100 mL de yogur presenta un nivel de células viables cercano a 1×10^7 UFC/mL, como mínimo.

Si bien existen metodologías de biología molecular o basadas en citometría de flujo independientes del cultivo para determinar el nivel de células viables de un probiótico en una matriz alimentaria, estas son costosas en términos de reactivos, requieren equipamiento altamente específico y personal muy calificado. Por lo tanto, no son de fácil acceso para los organismos públicos de control o para las pequeñas y medianas industrias que quieren colocar en el mercado un producto probiótico con niveles satisfactorios de células viables. En este contexto, el recuento de bacterias probióticas sigue siendo dependiente de la disponibilidad de medios de cultivos agarizados que permitan distinguir a los probióticos de las bacterias del fermento (medios de cultivo diferenciales) o que permitan hacer el recuento selectivo de los probióticos presentes en el producto (medios de cultivos selectivos). El recuento de probióticos en un alimento puede resultar un gran desafío, dependiendo de la complejidad microbiológica del producto en cuestión, es decir, de la cantidad de especies/cepas presentes. El caso más simple podría

suponer el recuento de *L. casei* Shirota en la leche fermentada Yakult, ya que al ser el único microorganismo presente bastará hacer diluciones seriadas de la muestra en un medio líquido apropiado y el plaqueamiento, en superficie, en agar MRS, seguido de una incubación a 37 °C por 48 h. En el caso del BioQueso Ilolay Vita, primer queso probiótico de Latinoamérica y que llegó al mercado argentino en 1999 (Vinderola y col., 2003), el mismo presentaba 3 cepas probióticas (de las especies *L. casei*, *L. acidophilus* y *B. bifidum*) y 2 cepas del fermento (*S. thermophilus* y *Lactococcus lactis*). Para llevar a cabo el control de calidad microbiológica de este queso se tuvieron que diseñar especialmente un grupo de medios de cultivos selectivos y diferenciales (Vinderola y Reinheimer, 2000). Para tal fin, se adicionó al agar MRS de agentes selectivos como sales biliares, cloruro de litio y propionato de sodio (Vinderola y Reinheimer, 1999, 2000), capaces de inhibir a las bacterias del fermento, sin afectar el desarrollo de los probióticos, los cuales aparecían con morfologías de colonia claramente distinguibles según la especie.

Es necesario aclarar que el término probiótico no engloba una categoría homogénea de microorganismos como podrían ser los psicrotróficos, termodúricos o microorganismos totales en leche cruda, para los cuales se han desarrollado metodologías estandarizadas de recuento. El término tampoco representa géneros específicos como *Salmonella*, *Escherichia* o *Clostridium* para los cuales existen metodologías estandarizadas y/o medios de cultivos comerciales específicos para hacer un recuento selectivo seguro. Los lactobacilos y bifidobacterias usados como probióticos pueden tener requerimientos metabólicos muy diferentes entre sí, pero a la vez cercanos a las bacterias lácticas del fermento, por lo cual es difícil intentar favorecer el crecimiento de unos mientras se intenta inhibir el desarrollo de otros cuando se diseñan medios de cultivos selectivos o diferenciales. Por el momento no existen metodologías estandarizadas ni medios de cultivos específicos que garanticen un recuento cierto de probióticos, este es siempre una solución a medida del producto y de las cepas presentes. En 2006 fue publicada una norma ISO (<https://www.iso.org/standard/35292.html>, fecha de último acceso 10 de abril de 2019) para la enumeración presuntiva de *L. acidophilus* en un medio selectivo mediante recuento en placa, y en 2010 fue propuesta una norma equivalente para bifidobacterias (<https://www.iso.org/standard/45765.html>, fecha de último acceso 10 de abril de 2019). Sin embargo, las limitaciones de ambas normas hacen que el recuento sea solo presuntivo y no pueda asegurarse *a priori* que se obtendrá una adecuada respuesta para todas las cepas de bifidobacterias o *L. acidophilus* presentes. Además, no se ha abordado con una norma el recuento de cepas de las especies *L. casei* y *L. rhanmosus*, sin dudas las especies más intensivamente usadas en yogures con probióticos. Por lo

tanto, el recuento de probióticos es una solución a medida que debe ponerse a punto para cada producto en particular, teniendo en cuenta las cepas utilizadas, donde el objetivo es utilizar medios de cultivos selectivos que permitan una recuperación adecuada del probiótico y a la vez inhibir, o poder diferenciar, a las bacterias del fermento. En este sentido, se ha propuesto una gran cantidad de medios de cultivo posibles (Ashraf y Shah, 2011; Zielińska y col., 2018). Sin embargo, la elección del medio y condiciones de cultivo para el recuento microbiológico deben ajustarse en cada caso, para lo cual se requiere una adecuada formación microbiológica en el campo de las bacterias lácticas y las bifidobacterias.

Conclusiones

La microbiota intestinal es un complejo y dinámico conjunto de microorganismos, principalmente bacterias, que nos habitan y controlan numerosas funciones (digestión de alimentos, estimulación inmunológica, síntesis de vitaminas y neurotransmisores). El proceso de establecimiento y desarrollo de la microbiota está sujeto a numerosos factores (edad gestacional al momento del nacimiento, tipo de parto y alimentación, administración de antibióticos, tamaño familiar, cuestiones genéticas, entre otros), los cuales son claves durante los dos primeros años de vida para garantizar el establecimiento de una microbiota diversa y abundante, capaz de educar inmunológicamente a las células del sistema inmune de la mucosa para desarrollar la tolerancia oral. Sin embargo, la combinación de numerosos factores de la vida moderna (aumento del índice de partos por cesárea, lactancia materna reducida, dieta occidentalizada pobre en alimentos fermentados, higiene excesiva, vida urbana, familias de tamaño pequeño, etc.) han sido correlacionados con un aumento de patologías autoinmunes y de base inflamatoria, en lo que se ha dado en llamar «Teoría de la Higiene».

Desde que el hombre abandonó su carácter de nómada, descubrió en la fermentación de los alimentos un medio para proporcionar mayor palatabilidad, valor nutritivo, capacidad de conservación y propiedades benéficas para la salud a sustratos como los vegetales, la carne y la leche. De los numerosos alimentos fermentados, es el yogur un verdadero sobreviviente de estas prácticas ancestrales, el cual se elabora en nuestros días prácticamente como antaño. La fermentación de la leche con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* transforma profunda y benéfica-mente la composición de la misma, haciendo a la lactosa más fácilmente digerible, liberando al medio péptidos potencialmente bioactivos, haciendo

que el calcio esté más biodisponible y convirtiendo al producto yogur en un alimento estable y seguro debido al contenido de ácido láctico. Actualmente los yogures pueden ser portadores de otros microorganismos benéficos denominados probióticos. Estos microorganismos, bacterias en su mayoría pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, tienen la capacidad de proporcionar efectos positivos sobre la salud cuando son consumidos en cantidades adecuadas y de forma periódica.

La presencia de bacterias probióticas en alimentos en el cono sur está fuertemente representada por los productos lácteos, principalmente los yogures. Una conjunción de factores justifican este hecho: el proceso tecnológico relativamente simple de elaboración de yogur, una matriz fisicoquímica y condiciones de almacenamiento del producto que garantizan la viabilidad del probiótico hasta el momento del consumo, una percepción del yogur como alimento saludable por parte del consumidor, y una alta frecuencia de ingesta del producto, compatible con lo que necesita un probiótico para ejercer su efecto benéfico. La industria láctea incorpora probióticos a sus yogures desde mediados de los años 90. El haber transitado este camino le permitió conocer y dominar las variables que garantizan la viabilidad de estos microorganismos en este alimento, no siendo actualmente la viabilidad un tema de preocupación para los tecnólogos y microbiólogos alimentarios. Aunque es siempre necesario estar atentos a la respuesta de nuevos cultivos probióticos que van apareciendo en el mercado e incorporándose a yogures, donde el recuento selectivo y diferencial es siempre una solución a medida del producto que le garantice al consumidor la presencia en el mismo de la cantidad necesaria de células viables para cumplir el efecto benéfico sobre la salud.

Desde la incorporación de la temática «bacterias probióticas» en el Instituto de Lactología Industrial, esta línea de investigación se ha mantenido cerca de las necesidades de la industria láctea local, colaborando a lo largo de más de 25 años con la mayoría de las empresas lácteas del país en el abordaje científico del tema, en el desarrollo de productos, controles de calidad, resolución de problemáticas particulares, capacitación de profesionales que se desarrollan en estas empresas, en la formación de nuevos recursos humanos, en la transferencia al sector productivo, en la redacción de artículos científicos y en actividades de docencia y difusión en general, constituyéndose, junto a otros institutos del país, en un referente en la temática.

Referencias bibliográficas

- Aryana, K.J. y Olson, D.W. (2017).** A 100-Year Review: Yogurt y other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9987–10013.
- Ashraf, R. y Shah, N.P. (2011).** Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt. A review. *Int J Food Microbiol*, 149(3), 194–208.
- Babio, N.; Mena-Sánchez, G. y Salas-Salvadó, J. (2017).** Beyond the nutritional value of yogurt: a diet quality indicator? *Nutrición Hospitalaria*, 34(Suppl 4), 26–30.
- Bach, J.F. (2002).** The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *New England Journal of Medicine*, 347, 911–920.
- Biorollo, G.A.; Reinheimer, J.A. y Vinderola, C.G. (2000).** Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Research International*, 33, 799–805.
- Burns, P., Lafferriere, L., Vinderola, G. y Reinheimer, J. (2014).** Dairy practices influence the capacity of probiotic bacteria to overcome simulated gastric digestion. *International Journal of Dairy Technology* 67, 448-457.
- Burns, P.; Patrignani, F.; Tabanelli, G.; Vinderola, G.; Siroli, L.; Reinheimer, J.; Gardini, F. y Lanciotti, R. (2015).** Potential of High Pressure Homogenization on probiotic Caciotta cheese quality and functionality. *Journal of Functional Foods*, 13, 126–136.
- Burns, P.; Alard, J.; Hrdy, J.; Boutillier, D.; Pot, B.; Páez, R.; Reinheimer, J.; Vinderola, G. y Grangette, C. (2017).** Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk-derived *Bifidobacterium lactis* strain on acute and chronic colitis in mice. *Scientific Reports*, 7, 43211.
- Champagne, C. (2014).** Development of Fermented Milk Products Containing Probiotics. In *Dairy Microbiology and Biochemistry. Recent Developments*, CRC Press, Taylor y Francis.
- Elli, M.; Callegari, M.L.; Ferrari, S.; Bessi, E.; Cattivelli, D.; Soldi, S.; Morelli, L.; Goupil Feuillerat; N., Antoine, J.M. (2006).** Survival of Yogurt Bacteria in the Human Gut. *Appl Environ Microbiol*, 72(7), 5113–5117.
- Farnworth, E.R. y Champagne, C.P. (2016).** Production of Probiotic Cultures and Their Incorporation into Foods. En Watson, R.R. y Preedy, V.R. (Eds.). *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Bioactive Foods in Health Promotion*, Academic Press.
- Fisberg, M. y Machado, R. (2015).** History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutrition Reviews*, 73(Suppl 1), 4–7.
- Gadotti, T.N.; Norde, M.M.; Rogero, M.M.; Fisberg, M.; Fisberg, R.M.; Oki, E. y Martini, L.A. (2018).** Dairy consumption and inflammatory profile: A cross-sectional population-based study, São Paulo, Brazil. *Nutrition*, 48, 1–5.
- Gueimonde, M.; Kalliomäki, M.; Isolauri, E.; Salminen, S. (2006).** Probiotic intervention in neonates—will permanent colonization ensue? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 42(5), 604–606.
- Harutoshi, T. (2013).** Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. En Kongo, M. (Ed.). *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: Lactic Acid Bacteria – R&D for Food, Health and Livestock Purposes*. Londres: IntechOpen, 515–538.
- Hershkovitz, I.; Weber, G.W.; Quam, R.; Duval, M.; Grün, R.; Kinsley, L.; Ayalon, A.; Bar-Matthews, M.; Valladas, H.; Mercier, N.; Arsuaga, J.L.; Martiñón-Torres, M.; Bermúdez de Castro, J.M.; Fornai,**

- C., Martín-Francés, L.; Sarig, R.; May, H.; Krenn, V.A.; Slon, V.; Rodríguez, L.; García, R.; Lorenzo, C.; Carretero, J.M.; Frumkin, A.; Shahack-Gross, R.; Bar-Yosef Mayer, D.E.; Cui, Y.; Wu, X.; Peled, N.; Groman-Yaroslavski, I.; Weissbrod, L.; Yeshurun, R.; Tsatskin, A.; Zaidner, Y. y Weinstein-Evron, M. (2018).** The earliest modern humans outside Africa. *Science*, 359(6374), 456–459.
- Hunt, K.M.; Foster, J.A.; Forney, L.J.; Schütte, U.M.; Beck, D.L.; Abdo, Z.; Fox, L.K.; Williams, J.E.; McGuire, M.K. y McGuire, M.A. (2011).** Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One*, 6(6), e21313.
- Koenig, J.E.; Spor, A.; Scalfone, N.; Fricker, A.D.; Stombaugh, J.; Knight, R.; Angenent, L.T.; Ley, R.E. (2011).** Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108 Suppl 1, 4578–4585.
- Korhonen, H. (2009).** Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1, 177–187.
- Lang, J.M.; Eisen, J.A. y Zivkovic, A.M. (2014).** The microbes we eat: abundance and taxonomy of microbes consumed in a day's worth of meals for three diet types. *PeerJ*, 2, e659.
- Lluch, J.; Servant, F.; Païssé, S.; Valle, C.; Valière, S.; Kuchly, C.; Vilchez, G.; Donnadieu, C.; Courtney, M.; Burcelin, R.; Amar, J.; Bouchez, O. y Lelouvier, B. (2015).** The Characterization of novel tissue microbiota using an optimized 16S metagenomic sequencing pipeline. *PLoS One*, 10(11), e0142334.
- Macpherson, A.J. (2006).** IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in the intestine. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 308, 117–136.
- Martínez-Villaluenga, C.; Cardelle-Cobas, A.; Corzo, N. y Olano, A. (2008).** Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 540–544.
- Medici, M.; Vinderola, G., y Perdígón, G. (2004).** Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresco cheese. *International Dairy Journal* 14(7), 611–618.
- Medici, M.; Vinderola, G.; Weill, R. y Perdígón, G. (2005).** Effect of fermented milk in the prevention of an enteroinvasive *Escherichia coli* infection in mice. *Journal Dairy Research*, 72(2), 243–249.
- Metchnikoff, E. (1907).** *The Prolongation of life: Optimistic studies*. Sir Peter Chalmers Mitchell (editor). Paris: Putnam.
- Morelli, L. (2017).** Bacteria in yoghurt and strain-dependent effects on gut health. En Shah, N. (Ed.). *Yoghurt in health and disease prevention*. New York: Academic Press.
- Olivares, M.; Paz-Díaz-Ropero, M.; Gómez, N.; Sierra, S.; Lara-Villoslada, F.; Martín, R.; Miguel Rodríguez, J. y Xaus, J. (2006).** *Journal of Dairy Research*, 73(4), 492-498.
- Ouweland, A.C. (2017).** A review of dose-responses of probiotics in human studies. *Beneficial Microbes*, 8, 143–151.
- Patrignani, F.; Burns, P.; Serrazanetti, D.; Vinderola, G.; Reinheimer, J.; Lanciotti, R. y Guerzoni, M.E. (2009).** Suitability of high pressure-homogenized milk for the production of probiotic fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Research*, 76(01), 74–82.
- Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K.S.; Manichanh, C. y Wang, J. (2010).** A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65.
- Rojo, D.; Méndez-García, C.; Raczowska, B.A.; Bargiela, R.; Moya, A.; Ferrer, M. y Barbas, C. (2017).** Exploring the human microbiome from multiple perspectives: factors altering its composition and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(4), 453–478.
- Rook, G.; Bäckhed, F.; Levin, B.R.; McFall-Ngai, M.J. y McLean, A.R. (2017).** Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity. *Lancet*, 390(10093), 521–530.
- Tabanelli, G.; Burns, P.; Patrignani, F.; Gardini, F.; Lanciotti, R.; Reinheimer, J. y Vinderola, G. (2012).** Effect of a non-lethal High Pressure Homogenization treatment on the in vivo response of probiotic lactobacilli. *Food Microbiology*, 32, 302–307.
- Tabanelli, G.; Patrignani, F.; Vinderola, G.; Reinheimer, J.A.; Gardini, F. y Lanciotti, R. (2013).** Effect of sub-lethal High Pressure Homogenization treatments on the in vitro functional and biological properties of lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 580–586.

- Tabanelli, G.; Patrignani, F.; Gardini, F.; Vinderola, G.; Reinheimer, J.; Grazia, L.; Lanciotti, R. (2014).** Effect of a sub-lethal High Pressure Homogenization treatment on the fatty acid membrane composition of probiotic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 58, 109–117.
- Tamburini, S.; Shen, N.; Wu, H.C. y Clemente, J.C. (2016).** The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nature Medicine*, 22(7), 713–722.
- Tamime, A.Y. y Robinson, R.K. (2000).** Tamime and Robinson's Yoghurt 3rd Edition Science and Technology. Londres: Woodhead Publishing.
- Tanaka, S.; Kobayashi, T.; Songjinda, P.; Tateyama, A.; Tsubouchi, M.; Kiyohara, C.; Shirakawa, T.; Sonomoto, K. y Nakayama, J. (2009).** Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 56(1), 80–87.
- Toh, M.C. y Allen-Vercoe, E. (2015).** The human gut microbiota with reference to autism spectrum disorder: considering the whole as more than a sum of its parts. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 26309.
- Urbaniak, C.; Gloor, G.B.; Brackstone, M.; Scott, L.; Tangney, M. y Reid, G. (2016).** The microbiota of breast tissue and its association with breast cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(16), 5039–5048.
- Vijaya Kumar, B.; Vijayendra, S.V. y Reddy, O.V. (2015).** Trends in dairy and non-dairy probiotic products – a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6112–6124.
- Vinderola, G. y Reinheimer, J.A. (1999).** Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria (1999). *International Dairy Journal*, 9(8), 497–505.
- . (2000). Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 10(4), 271–275.
- . (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative «in vitro» study of probiotic characteristics and biological barriers resistance. *International Dairy Journal*, 36(9/10), 895–904.
- Vinderola, G.; Prosello, W.; Ghiberto, D. y Reinheimer, J. (2000a).** Viability of probiotic- (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non-probiotic microflora in Argentinian Fresco Cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 1905–1911.
- Vinderola, G.; Gueimonde, M.; Delgado, T.; Reinheimer, J. y González de los Reyes-Gavilán, C. (2000b).** Characteristics of carbonated fermented milk and survival of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 10(3), 213–220.
- Vinderola, G.; Prosello, W.; Ghiberto, D. y Reinheimer, J.A. (2000c).** Viability of probiotic- (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian Fresco Cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 1905–1911.
- Vinderola, G.; Mocchiutti, P. y Reinheimer, J.A. (2002a).** Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, 85(4), 721–729.
- Vinderola, G.; Costa, G.; Regenhardt, S. y Reinheimer, J.A. (2002b).** Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 12(7), 579–589.
- Vinderola, G.; Perdígón, G.; Reinheimer, J.A.; Médici, M.; Prosello, W. y Ghiberto, D. (2003).** Bioqueso Iloley Vita: un nuevo queso probiótico con alta respuesta sobre el sistema inmune. *Industrias Lácteas Españolas (ILE)*, Dic., 34–48.
- Vinderola, G.; Medici, M. y Perdígón, G. (2004).** Relationships between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell-wall protein profiles in lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 96(2), 230–243.
- Vinderola, G.; Duarte, J.; Thangavel, D.; Perdígón, G.; Farnworth y E. y Matar, C. (2005a).** Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, 72(2) 195-202.
- . (2005b). Distal mucosal site stimulation by kefir and duration of the immune response by kefir. *European Journal of Inflammation*, 3(2) 63–73.
- Vinderola, G.; Matar, C. y Perdígón, G. (2005c).** Role of intestinal epithelial cells in the immune effects mediated by Gram (+) probiotic bacteria. Involvement of Toll-like receptors. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(9), 1075–1084.

- Vinderola, G.; Perdigón, G.; Duarte, J.; Farnworth, E. y Matar, C. (2006a).** Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology*, 211(3), 149–156.
- Vinderola, G.; Perdigón, G.; Duarte, J.; Farnworth, E. y Matar, C. (2006b).** Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on the immune stimulation. *Journal of Dairy Research*, 73(4), 472–479.
- Vinderola, G.; Matar, C. y Perdigón, G. (2007).** Milk fermented by *L. helveticus* R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Immunobiology*, 212(2), 107–118.
- Vinderola, G.; Zacarías, M.F.; Bockelmann, W.; Neve, H.; Reinheimer, J. y Heller, K. (2012).** Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. *Food Microbiology*, 30, 274–280.
- Wise, A.; Robertson, B.; Choudhury, B.; Rautava, S.; Isolauri, E.; Salminen, S. y Bode, L. (2018).** Infants are exposed to human milk oligosaccharides already in utero. *Frontiers in Pediatrics*, 6, 270.
- Zacarías, M.F.; Binetti, A.; Laco, M.; Reinheimer, J.A. y Vinderola, G. (2011).** Preliminary technological and potential probiotic characterization of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. *International Dairy Journal*, 21, 548–555.
- Zacarías, M.F.; Reinheimer, J.A.; Forzani, L.; Grangette, C.; y Vinderola, G. (2014).** Mortality and translocation assay to study the protective capacity of *Bifidobacterium lactis* INL1 against *Salmonella Typhimurium* infection in mice. *Beneficial Microbes*, 5(4), 427–436.
- Zacarías, M.F.; Souza, T.C.; Zaburlín, N.; Cara, D.C.; Reinheimer, J.A.; Nicoli, J.R. y Vinderola, G. (2017).** Influence of technological treatments on the functional performance of the breast milk-derived *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1. *Journal of Food Science*, doi 10.1111/1750-3841.13852.
- Zacarías, M.F.; Binetti, A.; Bockelmann, W.; Reinheimer, J.A.; Heller, K. y Vinderola, G. (2018).** Safety, functional properties and technological performance in whey-based media of probiotic candidates from human breast milk. *International Microbiology*, <https://doi.org/10.1007/s10123-018-00046-0>
- Zielińska, D., Ołdak, A., Rzepkowska, A. y Zieliński, K. (2018).** Enumeration and Identification of Probiotic Bacteria in Food Matrices. En *Advances in Biotechnology for Food Industry*, 167–196.

2. Funcionalización de leches fermentadas

2.1. Yogur reducido en lactosa e incrementado en galactooligosacáridos (GOS) prebióticos

Claudia Vénica, Carina Bergamini,
Verónica Wolf y Ma. Cristina Perotti

Concepto de intolerancia a la lactosa

El rol principal de la dieta es proporcionar los nutrientes suficientes según los requerimientos metabólicos, los cuales producen en el consumidor una sensación de saciedad. Los nuevos hallazgos en ciencias de la nutrición se han desviado del objetivo establecido en el pasado: la supervivencia y la satisfacción del hambre. El creciente interés por la salud y bienestar, y la prevención de enfermedades observado en las últimas décadas ha estimulado el consumo de alimentos saludables y suplementos dietarios, siendo la función gastrointestinal uno de los principales objetivos, específicamente en relación con la digestión y absorción de carbohidratos (Ferreira–Lazarte y col., 2018; Suri y col., 2019). En particular, en los últimos 50 años ocurrieron cambios significativos en el conocimiento y enfoque científico de la intolerancia a la lactosa (Harrington y Mayberry, 2008; Fassio y col., 2018). La leche es un componente fundamental de la dieta de los mamíferos y es su única fuente de nutrientes al momento del nacimiento. El alto valor nutricional de la leche es ampliamente reconocido; sin embargo, no

todos los individuos pueden tolerar este alimento, sobre todo en la edad adulta (Fassio y col., 2018).

La lactosa (O-β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranososa, C₁₂H₂₂O₁₁), disacárido compuesto de galactosa y glucosa, es prácticamente el único carbohidrato encontrado exclusivamente en la leche de los mamíferos, de allí que se la denomina comúnmente «azúcar de leche». Su concentración es variable dependiendo del origen; la leche humana tiene un elevado contenido de aproximadamente 7,5 g/100 g suministrando casi la mitad de las calorías requeridas por el neonato, mientras que en la leche bovina, caprina y ovina su nivel es inferior, 4,1–4,8 g/100 g (Schaafsma, 2008; Fox, 2009). Si bien la lactosa es un componente común en la nutrición humana, a menudo olvidamos cuán «exótica» es. Aparte de la leche, podemos encontrarla solamente en especies de plantas extremadamente raras (Fassio y col., 2018). La digestión de la lactosa requiere de actividad lactasa (específicamente lactasa-florizina hidrolasa, EC 3.2.1.108, que pertenece a la familia de las enzimas β-galactosidasas y que es diferente de las β-galactosidasas de origen microbiano) ubicada en las vellosidades intestinales de las células epiteliales del intestino delgado (órgano donde se produce la mayor parte de la digestión de los alimentos y absorción de los nutrientes), para hidrolizar el enlace entre los dos monosacáridos constituyentes, los cuales son absorbidos y transportados al hígado para ser utilizados finalmente como fuente de energía; la mayor actividad lactasa se encuentra en el yeyuno medio (Brown-Esters y col., 2012). Esta enzima ya está presente en el feto durante la segunda mitad del embarazo, alcanzando su máxima actividad poco después del nacimiento, cuando la leche es el principal alimento. Luego, puede producirse una deficiencia de lactasa o hipolactasia que se la clasifica en primaria o secundaria. Dentro de la hipolactasia primaria pueden mencionarse dos casos: en el primero se produce una pérdida progresiva de actividad de la enzima a lo largo de la vida, que se puede iniciar en la infancia, adolescencia o en la edad adulta y se lo denomina «lactasa no persistente»; en el segundo, la enzima falta desde el nacimiento, lo que no es muy común, y se denomina «deficiencia de lactasa congénita» o «alactasia» (Fassio y col., 2018; Gotteland, 2018). Este último síndrome conduce a la lactosuria debido a la absorción anormal de la lactosa intacta, produciendo vómitos, falta de crecimiento, deshidratación, acidosis tubular renal y aminoaciduria (Harrington y Mayberry, 2008). De esta manera, la disminución de lactasa es la condición normal mientras que la persistencia representa la variante. Por su parte, la hipolactasia secundaria es una disminución reversible o deficiencia transitoria de la capacidad de producir lactasa, que es causada por daños en la mucosa intestinal provocados por virus, infecciones bacterianas o parasitarias, diarreas infecciosas, enfermedad celíaca,

ingesta excesiva de alcohol, tratamientos con antibióticos y terapia con radiaciones. Tiene una relevancia clínica significativa entre los niños, especialmente en áreas de enfermedades y desnutrición (Harrington y Mayberry, 2008; Brown–Esters y col., 2012).

El mecanismo molecular que causa el mantenimiento o disminución de lactasa aún no está dilucidado por completo. El control de este mantenimiento enzimático parece deberse a polimorfismos genéticos de un solo nucleótido; varios de estos polimorfismos han sido identificados. La persistencia de la enzima está determinada genéticamente, varía entre las diferentes razas y grupos étnicos y también existe una variabilidad intraindividual (Brown–Esters y col., 2012). En particular, en los caucásicos como las poblaciones de Europa del norte y central, islas británicas, Australia y Nueva Zelanda los niveles de lactasa en la adultez son similares a los encontrados en la infancia debido a una mutación estimulada por el gran consumo de leche (normolactasia o lactasa persistente); por el contrario, la no persistencia de lactasa alcanza el 70 % en América Latina y asciende hasta el 100 % en el sur de África, China y Japón (Saxelin y col., 2003; Schaafsma, 2008; Gotteland, 2018).

La malabsorción o maldigestión de lactosa describe una baja capacidad para hidrolizar la lactosa, causada por hipolactasia primaria o secundaria, sin experimentarse síntomas (Domínguez–Jiménez y col., 2017). Ocurre cuando la cantidad de lactosa que llega al intestino delgado excede la cantidad compatible con la actividad de la enzima. Por otro lado, la malabsorción sintomática de la lactosa recibe el nombre de «intolerancia a la lactosa» (Fassio y col., 2018). La malabsorción no siempre se traduce en el desarrollo de síntomas de intolerancia; de hecho, solamente entre un tercio y la mitad de los pacientes con malabsorción son intolerantes (Domínguez–Jiménez y col., 2017). Si bien no se considera una verdadera dolencia, es una condición, situación patofisiológica o síndrome clínico de uno o varios síntomas o desórdenes que afectan negativamente la calidad de vida (Suri y col., 2019). Muchas veces se confunde los términos «intolerancia a la lactosa» y «alergia a la leche», si bien pueden compartir síntomas similares, son condiciones completamente diferentes; la intolerancia a la lactosa es un problema digestivo, mientras que la alergia a la leche afecta al sistema inmunológico (Szilagyi y Ishayek, 2018).

La lactosa no digerida en el intestino delgado alcanza el intestino grueso, atrae fluidos vía ósmosis y es fermentada por la microbiota colónica produciendo ácidos orgánicos de cadena corta (acético, propiónico, butírico) y gases (dióxido de carbono, hidrógeno y metano). El fluido, los metabolitos de la fermentación y la velocidad con la que se producen contribuyen a los síntomas observados: dolor abdominal, borborismos, diarrea, náuseas, fla-

tulencias, pérdida de apetito, distensión o hinchazón abdominal, tránsito gastrointestinal acelerado y presión colónica (Brown–Esters y col., 2012; Gotteland, 2018). La sintomatología es variable de individuo a individuo dependiendo de la actividad de la lactasa intestinal, sensibilidad individual a la fermentación de la lactosa, habilidad de la flora colónica para fermentar la lactosa, dosis de lactosa consumida, frecuencia de consumo, forma de consumo (dilución de lactosa con otros nutrientes), velocidad de vaciamiento gástrico y tiempo de tránsito gastrointestinal. De hecho, algunos adultos son capaces de digerir grandes cantidades de leche, mientras que otros presentan síntomas de malabsorción tras la ingesta de pequeñas cantidades. Muchos estudios han abordado estos aspectos (Brown–Esters y col., 2012; Szilagyi y Ishayek, 2018).

Tratamiento de la intolerancia a la lactosa

Uno de los métodos más simples para tratar la intolerancia a la lactosa es la restricción dietaria, es decir excluir parcial o totalmente de la dieta la leche y los productos lácteos. Sin embargo, una de las mayores preocupaciones de las principales instituciones de salud, como el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (American National Institute of Health), es que las personas con intolerancia a la lactosa no reciben suficientes nutrientes esenciales, tales como el calcio y la vitamina D, requeridos para el crecimiento y mantenimiento de los huesos en niños y adultos. Los lácteos suministran más calcio, proteínas, magnesio, potasio, cinc y fósforo, por caloría, que cualquier otro alimento en la dieta de los adultos, por lo que encontrar un sustituto a la leche no resulta una tarea fácil. Además, la disponibilidad y el bajo costo relativo de los productos lácteos hacen que su consumo sea conveniente (Brown–Esters y col., 2012; Szilagyi y Ishayek, 2018).

Por la evidencia recopilada hasta el momento se recomienda no restringir el consumo de lácteos en individuos con mala digestión de lactosa, sino más bien regularlo; la mayoría de los intolerantes puede tolerar 12–15 g de lactosa por día. Se sugiere beber leche regularmente durante un período prolongado de tiempo ya que la adaptación de la flora colónica también mejora la tolerancia. Una estrategia ideal para controlar la intolerancia a la lactosa es consumir regularmente leche en pequeñas cantidades (por ej. 30–60 mL por día) junto con otros alimentos y aumentar gradualmente las cantidades, según la tolerancia, hasta una taza (250 mL). La leche fluida con mayor contenido de grasa y los lácteos sólidos (yogur, queso) pueden ser mejor tolerados debido al tránsito intestinal más lento (Brown–Esters y col., 2012;

Szilagyi y Ishayek, 2018). Es por ello que los consumidores deben ser educados sobre las diferencias nutricionales entre los productos lácteos y los sustitutos no lácteos y deben guiarse en las elecciones saludables. La industria alimentaria también puede hacer su parte mejorando las etiquetas de los productos, indicando el contenido de lactosa y evitando las declaraciones engañosas. La legislación alimentaria nacional (Código Alimentario Argentino, CAA, 2018) define los «alimentos de contenido bajo en lactosa» (cuando no contiene más de 5% de la proporción de lactosa del alimento corriente correspondiente) y «alimento de contenido reducido» (cuando no contiene más del 30% de la proporción del alimento corriente correspondiente), y no hace referencia a la definición de alimentos «sin lactosa» ni contempla utilizar la frase «contiene lactosa».

Aunque la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) establece el límite del contenido residual de lactosa para productos etiquetados como «sin lactosa» en 1 g/L, muchas compañías lácteas han establecido un valor inferior (0,1 g/L) como característica de calidad (Trani y col., 2017). Por otra parte, el empleo de preparaciones orales de enzimas β -galactosidasas, disponibles en diferentes formatos (geles, líquidos, cápsulas o tabletas), que se ingieren previamente o junto con el alimento, constituye otra opción (Mlichová y Rosenberg, 2006; Ferreira-Lazarte y col., 2018). Si bien se ha documentado que este tratamiento provoca una disminución o alivio de los síntomas, la efectividad de las diferentes enzimas disponibles en el mercado es variable (Szilagyi e Ishayek, 2018).

Otro tratamiento que se ha propuesto es el consumo de alimentos lácteos fermentados, tales como yogur y queso, que se producen por fermentación bacteriana de la lactosa con producción de ácido láctico y otros metabolitos (Szilagyi e Ishayek, 2018). En los quesos madurados el nivel de lactosa es despreciable. Por el contrario, en el caso del yogur y otras variedades de quesos (por ej. procesados) es habitual la incorporación durante la manufactura de ingredientes lácteos fuente de lactosa, entre otros componentes, teniéndose niveles de lactosa en el producto final similares al encontrado en la leche o incluso superiores (Walther y col., 2008; Gille y col., 2018). Por otro lado, se ha sugerido el consumo de alimentos adicionados de bacterias probióticas como un tratamiento adyuvante para personas con intolerancia a la lactosa (Fassio y col., 2018). Recientemente se publicó una revisión sistemática sobre la eficacia de diferentes cepas probióticas, y si bien se ha demostrado la mejora de las condiciones intestinales por su consumo, lo que favorecerían el tratamiento de la intolerancia, se detectó que la eficacia clínica depende de la concentración de probióticos, la preparación y la actividad β -galactosidasa del cultivo (Oak y Jha, 2018).

Aparte de las alternativas mencionadas, la solución más efectiva y conveniente para tratar el problema de la intolerancia consiste en consumir lácteos reducidos o libres de lactosa, que son nutricionalmente idénticos a los lácteos regulares (Mlichová y Rosenberg, 2006; Szilagyi y Ishayek, 2018). Si bien los primeros productos reducidos en lactosa se lanzaron en la década del 70, las tecnologías han ido avanzando en los últimos 20 años. Este sector de la industria alimentaria ha ganado cada vez más espacio en el mercado y popularidad a nivel mundial, con un portafolio de productos que se ha ampliado enormemente, sustentado por el mayor conocimiento y conciencia de los consumidores por la salud (Saxelin y col., 2003; Shakeel–Ur–Rehman, 2009; Suri y col., 2019). En Argentina, se ha observado esta misma tendencia; en efecto, hace unos años, solo una industria láctea producía leches reducidas en lactosa UHT y en polvo, y en los últimos tiempos se han incorporado otros actores que producen este tipo de productos, y también se ha diversificado la oferta (yogur, bebidas lácteas y quesos procesados).

Consideraciones para el desarrollo de alimentos lácteos reducidos o libres de lactosa

Varios métodos pueden emplearse para reducir o eliminar en su totalidad la lactosa presente en la leche y los productos lácteos (Shakeel–Ur–Rehman, 2009; Harju y col., 2012). Uno de los procesos biotecnológicos más antiguos y difundidos es la hidrólisis de la lactosa con la enzima β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) en forma soluble o fijada a un soporte, es decir para procesos *batch* con enzima libre o continuos con enzima inmovilizada, respectivamente. Se han publicado muchos estudios referentes al efecto de diferentes enzimas y condiciones de proceso (dosis de enzima, concentración de lactosa, pH, temperatura/tiempo, etc.) en el grado de hidrólisis (Troise y col., 2016; Xavier y col., 2018). La lactosa se hidroliza a glucosa y galactosa, obteniéndose productos más dulces, ya que el dulzor relativo de lactosa, glucosa y galactosa es de 0,4; 0,6 y 0,7, respectivamente, en comparación con el de la sacarosa, que es igual a 1 (Tamime y Robinson, 2007).

Por otro lado, dependiendo de las condiciones del proceso, en este tipo de tecnologías no solo se consigue reducir la lactosa sino que también se pueden obtener productos enriquecidos en GOS prebióticos; este aspecto se profundiza más adelante. El concepto de prebiótico, carbohidrato no absorbido que altera selectivamente la flora bacteriana intestinal de una manera beneficiosa, fue introducido por primera vez por Gibson y Roberfroid (1995).

Otras tecnologías incluyen la separación de la lactosa por métodos físicos como la ultrafiltración y la cromatografía. La ultrafiltración es un método de separación por membranas que permite la eliminación de una fracción de la lactosa; sin embargo, durante este proceso parte de los minerales valiosos, como el calcio, también se pierden, por lo que resulta conveniente su reposición (Vyas y Tong, 2003; Solanki y Gupta, 2014). Por su parte, la cromatografía permite la eliminación selectiva de la lactosa de la leche y el suero por resinas de intercambio catiónico fuertes; la separación se basa en los diferentes efectos de exclusión de iones y tamaños de minerales y proteínas, y probablemente también sobre la capacidad de la lactosa para formar complejos con cationes ligados a las resinas. En 2001, una empresa finlandesa desarrolló y patentó una metodología que combina el tratamiento enzimático con la cromatografía consiguiendo obtener una leche libre de lactosa (niveles < 0,01 %) y con el mismo sabor que la leche sin tratar. Posteriormente, se han desarrollado y patentado nuevos métodos de producción de leche libre de lactosa más fáciles de adoptar en las plantas lácteas y de licenciar la tecnología. Los mismos se basan en una combinación de técnicas de membrana y procesos enzimáticos (Tossavainen y Sahlstein, 2003; Harju y col., 2012).

Galactooligosacáridos: definición, propiedades benéficas y síntesis

Los GOS son carbohidratos no digeribles, constituidos por un número variable de unidades de galactosa unidas entre sí y usualmente con una unidad de glucosa terminal. Estos compuestos adquirieron notoriedad a partir del conocimiento de sus efectos beneficiosos sobre la salud. El aspecto más sobresaliente es su rol prebiótico, produciendo efectos positivos: reducción de los niveles de colesterol en sangre, prevención del cáncer de colon, alivio de la constipación y estimulación de la absorción de calcio (Park y Oh, 2010; Sangwan y col., 2011). La leche humana contiene naturalmente una elevada concentración de oligosacáridos de galactosa (5–20 g/L), constituyendo el tercer componente más abundante y formando parte de estructuras químicas complejas: al menos se han identificado 20 clases o estructuras diferentes (Crisà, 2013). Por el contrario, en las leches de rumiantes (vaca, cabra, oveja) los niveles detectados son muy bajos (Playne, 2003). Dado los efectos benéficos reconocidos, se agregan ingredientes enriquecidos en GOS en las fórmulas infantiles con el fin de mimetizar lo más posible la leche materna (Chirido y col., 2011). El uso de este ingrediente se ha extendido a otros alimentos como helados, panificados y bebidas (Gänzle, 2011).

Las preparaciones comerciales de GOS para su uso como ingrediente se obtienen a partir de la lactosa por acción de enzimas β -galactosidasas (EC 3.2.1.23) en una reacción de transgalactosilación que ocurre simultáneamente con la reacción de hidrólisis (Park y Oh, 2010). Específicamente, la enzima se acopla a una molécula de lactosa, se libera una unidad glucosilo y se forma un enlace covalente entre la enzima y el resto galactosilo. A partir de esta etapa, se pueden dar ambas reacciones: hidrólisis o transgalactosilación, dependiendo del aceptor galactosilo disponible en el medio y de la capacidad intrínseca de la enzima para transgalactosilar; esta actividad es secundaria a la actividad principal de hidrólisis que todas las enzimas poseen (Xavier y col., 2018). La hidrólisis tiene lugar si el aceptor galactosilo es agua, liberándose una molécula de galactosa; si el aceptor es un sacárido (glucosa, galactosa, lactosa o GOS) se produce la transgalactosilación, es decir, la condensación de unidades de galactosa y eventualmente glucosa. El resultado final es la obtención de una mezcla heterogénea y compleja de diferentes tipos de GOS en cuanto a grado de polimerización (GP: 2 a 10 unidades monoméricas), tipos de enlaces glicosídicos entre las unidades (β -1-4, β -1-6) y peso molecular (Gosling y col., 2010; Park y Oh, 2010; Sangwan y col., 2011). La naturaleza de los GOS sintetizados y su concentración depende de varios factores: origen de la preparación enzimática (procedente de levaduras, mohos, bacterias), grado de pureza (extracto celular crudo de microorganismos, enzima aislada y purificada), enzima libre o inmovilizada en un soporte, enzima individual o una combinación de enzimas, concentración de lactosa, naturaleza del sustrato fuente de lactosa y condiciones de reacción (pH, temperatura y tiempo, concentración de iones); abundante información hay publicada con relación a estos aspectos (Fischer y Kleinschmidt, 2018; Mano y col., 2018).

Con relación a resultados propios del INLAIN, se estudió el efecto de la concentración de lactosa, empleando solución patrón y una mezcla de suero parcialmente desmineralizado y leche, y de la dosis de una enzima β -galactosidasa comercial de alta pureza procedente de *Kluyveromyces lactis*, en la producción y rendimiento de GOS y en el tiempo de reacción en alcanzar el máximo rendimiento del mismo. Particularmente, para la base suero-leche se aplicó el método de Superficie de Respuesta (MSR) para modelar el comportamiento de las variables estudiadas. Asimismo, se compararon las actividades hidrolíticas y transgalactosidasas de seis enzimas β -galactosidasa comerciales que se incubaron (3 h/42 °C) en una matriz láctea adecuada para la elaboración de un yogur batido (leche entera fluida, 2,00 g/100 ml) concentrado de proteínas de suero (WPC), y 2,25 g/100 ml de leche en polvo descremada (LPD). El rendimiento de GOS mejoró con la concentración de lactosa, y el incremento de la dosis de enzima condujo a mayores rendimientos

en menor tiempo de reacción. También se observó una ligera degradación de los GOS después del máximo alcanzado, hecho que fue más notorio para los ensayos con baja concentración de lactosa inicial; la enzima hidroliza los GOS formados cuando el contenido de lactosa en el medio de reacción es bajo (Vénica y col., 2015). El efecto combinado de la dosis de enzima y del nivel de lactosa modelado con MSR a partir de las mezclas de suero-leche, demostró que esta herramienta estadística es adecuada para predecir la concentración y el rendimiento máximo de GOS y el tiempo de reacción necesario para alcanzar dichos máximos; las concentraciones de GOS obtenidas oscilaron entre 0,65 y 2,78 g/100 g, correspondiendo a rendimientos de 10 a 18 % [GOS (g/100 g)/lactosa inicial (g/100 g) x 100], respectivamente (Vénica y col., 2017). Las seis enzimas comerciales demostraron poseer similares actividades hidrolíticas y transgalactosidasa en las condiciones ensayadas. Los porcentajes de hidrólisis al final de la incubación estuvieron entre 73 y 80 %. Los niveles máximos de GOS (0,46 – 0,49 g/100 g) se alcanzaron a las 2 h, observándose en la mayoría de los casos una leve disminución a las 3 h (entre el 2 y 8 %). Resultados similares fueron reportados por otros autores (Fischer y Kleinschmidt, 2018; Mano y col., 2018).

Yogur funcional: reducido en lactosa y enriquecido en GOS

En el INLAIN se llevaron a cabo estudios a diferentes escalas (5, 40 y 100 L) que condujeron a desarrollar un prototipo de yogur reducido en lactosa y enriquecido en GOS, a partir de diferentes formulaciones de la leche base que corresponden a las variedades de yogures tipo bebible y batido, natural y endulzado, y simbióticos (con probióticos y prebióticos), muy comercializadas en la actualidad. Una validación a escala industrial (4000 L) confirmó los hallazgos obtenidos. Estos resultados se presentaron en el Concurso Nacional de Innovaciones INNOVAR 2017, obteniéndose el primer premio en la categoría «Alimentos». Además, se corroboró la funcionalidad del producto obtenido, lo que podría representar una herramienta de gran utilidad para las industrias lácteas a la hora de evaluar la factibilidad de lanzar al mercado nuevos productos con características funcionales.

Se analizó el efecto del momento de adición de la enzima (YNL-2, GODO) en relación con el agregado del fermento de yogur (YF-L811, con y sin preincubación por 30 minutos), la dosis de enzima (0,16–0,40 g/L), la formulación de la leche base: leche entera y parcialmente descremada (3 y 1,5 g de grasa/100 mL), adición de LPD (1,10 y 2,25 g/100 mL) y WPC (1,0 y 2,0 g/100 mL), sacarosa (8,0 y 10 g/100 mL), aspartamo (0,3 g/L),

inulina (1,0 g/100 mL), y la incorporación de una bacteria probiótica comercial (*L. acidophilus* La-5), en el proceso fermentativo, mediante el análisis de acidez, perfiles de carbohidratos y ácidos orgánicos (por HPLC-IR-UV) y compuestos volátiles (por SPME-GC/FID/MS), y en la producción de GOS (por HPLC-IR). También se evaluó el impacto de las variables estudiadas sobre estos parámetros durante el almacenamiento de los yogures en condiciones de refrigeración (28 días/5 °C); en todos los casos, las fermentaciones experimentales (E) fueron contrastadas en paralelo con fermentaciones controles (C) en las que la enzima estuvo ausente. La hipótesis de trabajo planteada fue que el cambio en los patrones de carbohidratos debido a la incorporación de la enzima podría afectar la actividad metabólica del fermento y por lo tanto el proceso fermentativo, impactando finalmente en las características fisico-químicas y sensoriales del producto (Vénica y col., 2013, 2014, 2015a, 2015b, 2016, 2018; Wolf y col., 2015).

Sobre la base de los resultados obtenidos se corroboró que el agregado simultáneo de la enzima y el fermento fue adecuado ya que el grado de hidrólisis de la lactosa fue similar a las experiencias en que se incluyó la etapa de preincubación con la enzima. La enzima no afectó el proceso de acidificación, la evolución de pH fue similar en las fermentaciones experimentales en relación con los controles, y los tiempos de proceso en ambos casos fueron comparables (aprox. 4 h). Menores valores de acidez titulable se detectaron en los yogures E hacia el final del almacenamiento, diferencia que se acentuó con el agregado de sacarosa y con mayores dosis de enzima. Estos resultados se correlacionaron con menores niveles de ácido láctico, principal producto de la fermentación láctica, aunque no se observaron cambios apreciables para los restantes ácidos orgánicos detectados (cítrico, acético, orótico, hipúrico y butírico).

Desde el inicio del proceso los niveles de lactosa disminuyeron acentuadamente en las fermentaciones experimentales, mientras que se incrementaron los valores de glucosa y galactosa por acción hidrolítica de la enzima. El grado de hidrólisis alcanzado en los yogures frescos y durante su almacenamiento se encontró entre el 70 y 93%, que correspondieron a concentraciones residuales de lactosa de entre 0,4 y 1,5 g/100 g, dependiendo de la dosis de enzima y la formulación. Estos productos se enmarcan dentro de la categoría de alimentos reducidos en lactosa según el CAA, como se indicó anteriormente. Las concentraciones de glucosa y galactosa oscilaron entre 1,5 y 2,4 g/100 g y los niveles de glucosa fueron menores a los de galactosa en todos los casos. En efecto, es conocido que en general los microorganismos del fermento utilizan mayormente la glucosa como fuente de energía. Por su parte, los yogures C presentaron niveles de lactosa de entre 3,2 y 5,5 g/100 g, dependiendo de la variedad, los valores de glucosa fueron menores a 0,2 g/100 g y los de galactosa menores a 0,8 g/100 g.

Se observó la formación de GOS desde el inicio de la fermentación en los yogures E por la actividad transgalactosidasa que posee la enzima, y los niveles se mantuvieron estables durante el almacenamiento; los contenidos fueron más elevados en los yogures con agregado de ingredientes lácteos (batidos) versus los yogures con ausencia de los mismos (bebible) ya que a mayor contenido del sustrato (lactosa) en la formulación se favoreció su síntesis. Estos resultados se correlacionaron con los hallados en las soluciones patrones de lactosa y mezclas de leche-suero. Las concentraciones variaron desde 0,36 hasta 0,70 g/100 g para los yogures bebibles y batidos, respectivamente. Estos niveles son similares a los reportados en formulas infantiles en los cuales los GOS se adicionan como ingrediente funcional para mimetizar la leche materna (Chirido y col., 2011). Por otro lado, las bacterias que componen el fermento y La-5 no manifestaron la capacidad de sintetizar GOS en las condiciones ensayadas, hecho que se contrapone con lo hallado por otros autores (Martínez-Villaluenga y col., 2008).

En los distintos yogures se identificó un total de 22 compuestos volátiles, los cuales se han reportado como característicos del aroma de diferentes variedades; sin embargo, para simplificar la interpretación de los resultados la discusión se focalizó en los compuestos que derivan del metabolismo de los azúcares y en los reportados como los principales contribuyentes del aroma (un total de 10 compuestos que incluyeron a los compuestos carbonílicos y los alcoholes). En particular, al comienzo de la fermentación, los niveles de acetaldehído, propanona y butanona, diacetilo y ácidos acético, butanoico y hexanoico fueron significativamente mayores en E versus C. Esta tendencia se mantuvo a medida que la fermentación avanzó solamente para los ácidos, y un efecto contrario se observó para acetaldehído, 2,3-pentanodiona y acetoina. Al final de la fermentación, solamente el acetaldehído se encontró en niveles incrementados en E respecto a C, mientras que la 2,3-pentanodiona y el ácido hexanoico mostraron un comportamiento opuesto. El acetaldehído es el compuesto más típico del aroma del yogur, siendo responsable de la nota fresca-frutal. Tres vías metabólicas han sido reportadas para su formación: metabolismo de la glucosa, degradación del ADN y catabolismo de la treonina. El acetaldehído es un compuesto intermediario que puede ser convertido a otros compuestos: se puede reducir a etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa (Tamime y Robinson, 2007). En este estudio, esta conversión no se produjo ya que el acetaldehído aumentó a lo largo de la incubación, mientras que el etanol sufrió una disminución temprana y luego se mantuvo sin cambios. De esta manera, la acumulación de acetaldehído en los yogures sugirió que las actividades enzimáticas para su formación prevalecieron frente a aquellas involucradas en su conversión a etanol. Ott y col. (2000) propusieron que las dicetonas 2,3-butanodiona (diacetilo) y 2,3-

pentanodiona se producen por decarboxilación espontánea de sus precursores (2-acetolactato y 2-acetohidroxitirato, respectivamente) compuestos intermediarios derivados de la glucosa para la formación de diacetilo, y de la treonina y glucosa para la 2,3-pentanodiona. De esta manera, teniendo en cuenta que la glucosa es el principal sustrato para la generación de estas dicetonas, fue razonable esperar mayores niveles en los yogures E vs C; sin embargo, este hecho no pudo verificarse. En efecto, similar comportamiento fue obtenido por Baranowska (2006) en yogures adicionados de lactosa y glucosa, demostrando que las bacterias lácticas pueden utilizar tanto la lactosa como la glucosa para sintetizar dicetonas. Durante el almacenamiento, los niveles de acetaldehído y 2,3-pentanodiona en los yogures E superaron los encontrados en C, mientras que el ácido acético mostró un comportamiento opuesto. En cuanto a la evolución de estos compuestos durante los 28 días de almacenamiento, se observó que el acetaldehído se mantuvo sin cambios, el diacetilo y la 2,3-pentanodiona experimentaron un incremento a los 7 días y luego se mantuvieron constantes, y que el acético mostró un aumento paulatino en todos los yogures. La misma tendencia fue reportada por varios autores (Fernández-García y McGregor, 1994; Kaminarides y col., 2007).

Los perfiles sensoriales percibidos por los panelistas fueron similares para los yogures E en los que se disminuyó el contenido de sacarosa agregada en un 20% en comparación a la formulación del yogur C, lo que resulta en una ventaja desde el punto de vista nutricional.

Finalmente, el prototipo de yogur reducido en lactosa y enriquecido en GOS se sometió a un ensayo *in vivo* en un modelo experimental de ratas en crecimiento (Wistar macho recién destetadas). Este trabajo se realizó en la cátedra de Bioquímica General y Bucal de la Facultad de Odontología (UBA). Se observó un aumento en el número de colonias de lactobacilos fecales en las heces de los animales alimentados con la dieta de yogur experimental comparativamente a los animales alimentados con el yogur control desde la primera semana de la experiencia hasta su finalización (30 días), el pH cecal fue significativamente menor en el primer grupo versus el segundo (5,2 vs 6,8), mayor producción de ácidos de cadena corta fueron detectados (propiónico: 14,59 vs 4,33 mg, butírico: 14,45 vs 2,76 mg) y el contenido mineral óseo (CMO) y la densidad mineral ósea (DMO) medidos por densitometría fueron mayores (CMO: 1,258 vs 1,195 g y DMO: 0,317 vs 0,309 g/cm²) al final de la experiencia. De esta manera se corroboró la funcionalidad del producto obtenido ya que se encontraron mejoras de los parámetros evaluados evidenciando un efecto beneficioso sobre la microbiota intestinal y la salud ósea durante el crecimiento (Seijo y col., 2018).

Referencias bibliográficas

- Baranowska, M. (2006).** Intensification of the synthesis of flavor compounds in yogurt by milk enrichment with their precursors. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 15/56(S1 1), 5–11.
- Brown-Esters, O.; Mc Namara, O. y Savaiano, D. (2012).** Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. *International Dairy Journal*, 22, 98–103.
- Chirido, F.G.; Menéndez, A.M.; Pita Martín de Portela, M.L.; Sosa, P.; Toca, M.; Trifone, L. y Vecchiarelli, C. (2011).** Prebióticos en salud infantil. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 109, 49–55.
- Crisà, A. (2013).** Milk and dairy products in human nutrition. Production, composition and health. En Park Y.W. and Haenlein, G.F.W. (Coords.), *Milk carbohydrates and oligosaccharides*. USA: Wiley-Blackwell, 129–141.
- Di Rienzo, T.; D'Angelo, G.; D'Aversa, F.; Campanale, M.C.; Cesario, V.; Montalto, M.; Gasbarrini, A. y Ojetti, V. (2013).** Lactose intolerance: from diagnosis to correct management. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(2), 18–25.
- Domínguez-Jiménez J. y Fernández-Suárez, A. (2017).** Diagnosis of lactose intolerance. *Medicina Clínica (Barcelona)*, 148(6), 262–264.
- Fassio, F.; Facioni, M. y Guagnini, F. (2018).** Lactose maldigestion, malabsorption, and intolerance: a comprehensive review with a focus on current management and future perspectives. *Nutrients*, 10, 1–12.
- Fernández-García, E. y McGregor, J. (1994).** Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yogurt. *Journal of Dairy Science*, 77, 2934–2939.
- Ferreira-Lazarte, A.; Moreno, J. y Villamiel, M. (2018).** Application of a commercial digestive supplement formulated with enzymes and probiotics in lactase non-persistence management. *Food & Function*, doi: 10.1039/c8fo01091a
- Fischer, C. y Kleinschmidt, T. (2018).** Combination of two β -galactosidases during the synthesis of galactooligosaccharides may enhance yield and structural diversity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 506, 211–215.
- Fox, P. (2009).** Lactose: Chemistry and properties. En: McSweeney, P.; Fox, P.; Eds. *Advances dairy chemistry*. Volume 3. Lactose, water, salts and minor constituents. 3rd ed. United States: Springer; 1–13.
- Gänzle, M. (2011).** Galacto-oligosaccharides. En Fuquay, J.; Fox, P. y McSweeney, P. (Eds.). *Encyclopedia of dairy science*. Volume 3. Academic Press, London, Reino Unido, 209–216.
- Gibson, G. y Roberfroid, M. (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125, 1401–1412.
- Gille, D.; Walther, B.; Badertscher, R.; Bosshart, A.; Brügger, C.; Brühlhart, M.; Gauch R.; Noth, P.; Vergeres, G. y Egger, L. (2018).** Detection of lactose in products with low lactose content. *International Dairy Journal*, 83, 17–19.
- Gosling, A.; Stevens, G.W.; Barber, A.R.; Kentish, S.E. y Gras, S.L. (2010).** Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 121(2), 307–318.
- Gotteland, M. (2018).** ¿Desde cuándo y por qué tomamos leche? Tolerantes vs intolerantes a la lactosa. Simposio Leche y Productos Lácteos, Valdivia (Chile).
- Harju, M.; Kallioinen, H. y Tossavainen, O. (2012).** Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: technological aspects. *International Dairy Journal*, 22, 104–109.
- Harrington, K.L. y Mayberry, J.F. (2008).** A re-appraisal of lactose intolerance. *International Journal of Clinical Practice*, 62(10), 1541–1546.
- Heyman, M. (2006).** Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. *Pediatrics*, 118(3), 1279–1286.
- Kaminarides, S.; Stamou, P. y Massouras, T. (2007).** Comparison of the characteristics of set type yoghurt made from ovine milk of different fat content. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1019–1028.
- Mano, M.C.R.; Paulinob, B.N. y Pastore, G.M. (2018).** Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. *Food Research International*, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.019>.

- Martínez-Villaluenga, C.; Cardelle-Cobas, A.; Corzo, N. y Olano, A. (2008).** Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 540–544.
- Mlichová, Z. y Rosenberg, M. (2006).** Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45(2), 47–54.
- Oak, S.J. and Jha, R. (2019).** The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(11), 1675–1683.
- Ott, A.; Germond, J.-E. y Chaintreau, A. (2000).** Vicinal diketone formation in yogurt: 13C precursors and effect of branched-chain amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 724–731.
- Park, A.-R. y Oh, D.-K. (2010).** Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1279–1286.
- Playne, M. (2003).** Galacto-oligosaccharides. En: H. Roginski, Fuquay, J. y Fox, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Science* (1151–1158). London, Reino Unido: Academic Press.
- Sangwan, V.; Tomar, S.K.; Singh, R.R.B.; Singh, A.K. y Ali, B. (2011).** Galactooligosaccharides: Novel components of designer foods. *Journal of Food Science*, 76(4), 103–111.
- Saxelin, M.; Korpela, R. and Mäyrä-Mäkinen, A. (2003).** Functional dairy products. En Smit, G. (Ed.), *Dairy processing. Improving Quality*, 229–244. Washintong: CRC Press
- Schaafsma, G. (2008).** Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18(5), 458–465.
- Seijo, M.; Vénica, C.; Pita Martin De Portela, M.L.; Bergamini, C.; Wolf, I.; Perotti, M.C. y Zeni, S. (2018).** La densidad mineral ósea y la microbiota colónica en ratas en crecimiento alimentadas con un yogur que contiene galactooligosacáridos, generado a partir de la acción enzimática de la beta-galactosidasa en la leche entera. 17 Congreso Internacional de Medicina Interna del Hospital de Clínicas de Buenos Aires. Buenos Aires.
- Shakeel-Ur-Rehman. (2009).** Reduced lactose and lactose-free dairy products. En: McSweeney P, Fox P, Eds. *Advances dairy chem*. Vol. 3 Lactose, water, salts and minor constituents. 3° ed. (98–103). USA: Springer.
- Solanki P. y Gupta V.K. (2014).** Manufacture of low lactose concentrated ultrafiltered-diafiltered retentate from buffalo milk and skim milk. *Journal of Food Science and Technology*, 51(2), 396–400.
- Suri, S.; Kumar, V.; Prasad, R.; Tanwar, B.; Goyal, A.; Kaur, S.; Gat, Y.; Kumar, A.; Kaur, J. y Singh, D. (2019).** Considerations for development of lactose-free food. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 15, 27–34.
- Szilagyi, A. y Ishayek, N. (2018).** Lactose intolerance, dairy avoidance, and treatment options. *Nutrients*, 10, 1994.
- Tamime, A.Y. y Robinson, R.K. (2007).** Tamime and Robinson's yoghurt: science and technology. Boca Ratón, USA: CRC Press, 535–607.
- Trani, A.; Gambacorta, G.; Loizzo, P.; Cassone, A.; Fasciano, C.; Zambrini, A.V. y Faccia, M. (2017).** Comparison of HPLC-RI, LC/MS-MS and enzymatic assays for the analysis of residual lactose in lactose-free milk. *Food Chemistry*, 233, 385–390.
- Troise, A.; Bandini, E.; De Donno, R.; Meijer, G.; Trezzi, M. y Fogliano V. (2016).** The quality of low lactose milk is affected by the side proteolytic activity of the lactase used in the production process. *Food Research International*, 89, 514–525.
- Tossavainen, O. y J. Sahlstein. (2003).** Process for producing a lactose-free milk product. WO 03/094623.
- Vénica, C.; Acosta, S.; Sabbag, N. y Perotti, M. (2015a).** Yogur funcional y reducido en lactosa: Características físicoquímicas y sensoriales. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 87, 38–42.
- Vénica, C.; Bergamini, C. y Perotti, M. (2017).** Response surface methodology as a tool for modeling the galactooligosaccharides production. *Journal of Dairy Research*, 84(4), 464–470.
- Vénica, C.; Bergamini, C.; Rebecchi, S. y Perotti, M. (2015b).** Galacto-oligosaccharides formation during manufacture of different varieties of yogurt. Stability through storage. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 198–205.

- Vénica, C.; Wolf, I.; Bergamini, C. y Perotti, M. (2016).** Influence of lactose hydrolysis on galacto-oligosaccharides, lactose, volatile profile and physicochemical parameters of different yogurt varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(15), 4929–4939.
- Vénica, C.; Bergamini, C.; Zalazar, C. y Perotti, M. (2013).** Effect of lactose hydrolysis during manufacture and storage of drinkable yogurt. *Journal of Food and Nutritional Disorders*, 2, 5.
- Vénica, C.; Perotti, M. y Bergamini, C. (2014).** Organic acids profiles in lactose-hydrolyzed yogurt with different matrix composition. *Dairy Science and Technology*, 94(6), 561–580.
- Vyas, H.K. y Tong, P.S. (2003).** Process for calcium retention during skim milk ultrafiltration. *Journal of Dairy Science*, 86, 2761–2766.
- Walther, B.; Schmid, A.; Sieber, R. y Wehrmuller, K. (2008).** Cheese in nutrition and health. *Dairy Science and Technology*, 88, 389–403.
- Wolf, I.; Vénica, C. y Perotti, M. (2015).** Effect of reduction of lactose in yogurts by addition of β -galactosidase enzyme on volatile compound profile and quality parameters. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 1076–1082.
- Xavier, J.R.; Ramana, K.V. y Sharma R.K. (2018).** β -galactosidase: Biotechnological applications in food processing. *Journal of Food Biochemistry*, 42, 1–15.

2.2. Yogur enriquecido en Caseinofosfopéptidos (CPP)

Carina Bergamini, Verónica Wolf, Ma. Cristina Perotti

Caseinofosfopéptidos. Definición y características

Las proteínas lácteas (caseínas y proteínas de suero) son precursoras de una gran variedad de péptidos bioactivos que presentan diversas actividades biológicas tales como antimicrobiana, antihipertensiva, inmunomoduladora, antitrombótica, opiácea, antioxidante, anticariogénica, etc. Estos péptidos corresponden a fragmentos inactivos dentro de la proteína precursora pero que pueden ejercer actividades biológicas específicas luego de su liberación *in vivo* durante la digestión gastrointestinal, *in vitro* mediante la acción de enzimas específicas o *in situ* durante la elaboración del alimento (Korhonen y Pihlanto, 2006; Korhonen, 2009; Phelan y col., 2009).

Dentro de la amplia gama de péptidos bioactivos, los péptidos fosforilados derivados de las α_{s1} , α_{s2} y β -caseínas, caseinofosfopéptidos (CPP, por sus siglas en inglés) han demostrado actividad anticariogénica y antioxidante, y además tienen influencia en el metabolismo de varios minerales mejorando su biodisponibilidad y absorción a nivel intestinal. Muchos de estos péptidos comparten la característica de presentar en su secuencia tres residuos fosfoseril, seguidos por dos residuos de ácido glutámico, es decir –SerP–SerP–SerP–Glu–Glu– (Reynolds, 1998; Silva y Malcata, 2005). Esta zona de alta carga negativa es responsable de la unión de los CPP a distintos minerales, formando complejos

solubles, lo que constituye la razón de su efecto sobre la absorción de los mismos y de su actividad anticariogénica (Cross y col., 2005).

Actividad anticariogénica de los CPP

Entre las propiedades bioactivas de los CPP, la actividad anticariogénica ha sido la más estudiada, para la cual se han propuesto diferentes mecanismos de acción. Los CPP tienen la capacidad de estabilizar el fosfato de calcio en una solución metaestable formando complejos solubles con el fosfato de calcio amorfo (ACP) a través de los múltiples enlaces con los residuos fosfoserina de su estructura (CCP-ACP). El mecanismo de acción anticariogénica supone la incorporación inicial del complejo CPP-ACP dentro de la placa dental. Se ha sugerido, además, que el complejo CPP-ACP constituye un reservorio de calcio y fosfato amorfo tanto en la saliva como dentro de la placa, el cual actúa decreciendo la velocidad de pérdida de calcio desde la placa durante un ataque ácido y amortiguando la acidez a través de una acción buffer. Este efecto contrarresta el descenso de pH causado por las bacterias acidogénicas, inhibe la desmineralización y/o incrementa la remineralización de lesiones del esmalte. En contraste con esta teoría, en los últimos años ha surgido la hipótesis de que la acción de los CPP sería más pasiva y actuaría protegiendo la superficie dental a través de la formación de un recubrimiento estable por un proceso de adsorción físico-químico (Reynolds, 1998; Cross y col., 2005; Kanekanian y col., 2008).

Es importante destacar que los productos lácteos presentan de por sí propiedades anticariogénicas, las que han sido atribuidas a diferentes componentes de la leche como calcio y fósforo, caseína, proteínas de suero y fracción proteasa-peptona, además de los CPP, que han sido los más estudiados. Hay estudios que indican una asociación entre la ingesta de productos lácteos (leche, queso y yogur) y una menor incidencia en la aparición de caries (Grenby y col., 2001; Warner y col.; Herod, 2009).

Estrategias tecnológicas para obtener alimentos enriquecidos en CPP

La presencia natural de CPP en productos lácteos se ha atribuido a la producción *in situ* de los mismos por la acción de enzimas proteolíticas nativas de la leche como la plasmina o de origen microbiano de los cultivos utilizados en los productos fermentados. Asimismo, los CPP se pue-

den producir *in vivo* durante la digestión enzimática del alimento lácteo por acción de proteasas pancreáticas tales como tripsina y quimotripsina (Chianese y col., 2003; Ardö y col., 2007; Silva y Malcata, 2005). Además, diversas estrategias se han aplicado para lograr un incremento de CPP en alimentos. Por un lado, estos péptidos pueden ser incorporados como aditivos alimentarios. Esto implica la obtención de los mismos a escala industrial mediante hidrólisis enzimática de suspensiones concentradas de caseinato utilizando las enzimas mencionadas previamente (tripsina y quimotripsina) así como otras enzimas proteolíticas (pepsina, termolisina, papaína, pancreatina, etc.). Productos patentados tales como Recaldent™, CE90CPP y Capolac se comercializan para tal fin. La primera incursión del uso de CPP en alimentos la realizó la empresa de golosinas Cadbury Adams, que lo incorporó a la goma de mascar Trident, que en Argentina se comercializa con la marca Beldent. También se adicionan a bebidas (Kotsu calcium, Tekkotsu Inryou) o productos de higiene y cuidado bucal (Prospec MiPaste™, GC Tooth Mousse™, Gum White) (Reynolds, 1991; Ellegård y col., 1999; Reynolds, 2002 y 2005; Korhonen, 2009). La adición de complejos de CPP-ACP en productos lácteos y de confitería produjo un incremento de la remineralización del esmalte, que fue dependiente de la dosis de CPP-ACP adicionada (entre 2 y 5 g/L). Además, se ha comprobado que la adición de CPP-ACP en productos azucarados inhibió la progresión de lesiones del esmalte dental, aún más que en los mismos productos libres de azúcar (Walker y col., 2009, 2010).

Otra de las estrategias utilizadas para el incremento de CPP en yogur ha sido la adición de un fermento probiótico, que demostró una mayor producción de CPP en el producto. En ensayos *in vitro*, se demostró que un extracto de este yogur probiótico produjo un incremento de la remineralización y disminución de la desmineralización del esmalte dental (Chianese y col., 2003; Ferrazano y col., 2008).

Por otro lado, otros investigadores plantearon el incremento de CPP en yogur mediante su producción *in situ* durante la elaboración aplicando una hidrólisis previa de la leche con tripsina. Si bien se obtuvieron yogures enriquecidos en CPP, se observó que esta estrategia afectó negativamente la textura del producto ya que incrementó su sinéresis y disminuyó su viscosidad (Lorenzen, 2004; Lorenzen y Meisel, 2005). Otra posible desventaja de este proceso de hidrólisis es la aparición de sabores indeseables debido a la formación de determinados péptidos amargos (péptidos de naturaleza hidrofóbica), lo que depende de la enzima y de las condiciones de hidrólisis utilizadas (Brule y col., 1994). En el INLAIN se evaluó esta estrategia para la obtención de distintos tipos de yogures enriquecidos en CPP. Los

resultados obtenidos en relación con la composición, acidificación, proteólisis, niveles de CPP en los yogures, así como la actividad anticariogénica, se presentan a continuación.

Yogures enriquecidos en CPP y evaluación de la actividad anticariogénica

En experiencias a escala laboratorio (400 mL) se elaboraron tres tipos de yogures: con adición del cultivo probiótico *L. acidophilus* La-5 (P), con inclusión de la enzima tripsina (T) y control (C). En las elaboraciones se utilizó como mezcla base leche entera fluida adicionada de leche en polvo descremada (LPD). Con relación al uso de tripsina, se evaluó la hidrólisis previa de la leche de elaboración (2 h/40 °C) utilizando una relación enzima: sustrato de 1:9000. Luego se procedió al tratamiento térmico, que en los yogures T sirvió también para desnaturalizar la enzima, y se inició el proceso fermentativo (42 °C) con la adición del fermento.

La hidrólisis previa de la leche con tripsina produjo un retraso de 40 minutos en la fermentación en comparación con los yogures C y P. La posacidificación durante el almacenamiento (5 °C/14 días) fue similar en todos los yogures. En los perfiles electroforéticos de la fracción insoluble a pH 4,6 se pudo comprobar la desaparición de las bandas correspondientes a las β -y α S1-CN y una disminución de la α S2-CN. Asimismo, en los perfiles peptídicos de la fracción soluble a pH 4,6 obtenidos por HPLC-RP, se observó la presencia de CPP solamente en los yogures T. La identificación de los CPP se realizó por comparación de los perfiles peptídicos de los yogures con los perfiles de CPP. En este sentido, en experiencias preliminares se aisló una fracción de péptidos mediante precipitación selectiva con cloruro de calcio y etanol en frío a partir de un hidrolizado de caseinato de sodio con tripsina, ajustado a pH 3,5. Se ha reportado que en estas condiciones se recuperan los péptidos con la secuencia -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-, a los que se les atribuyó propiedad anticariogénica. El pH es una variable muy importante en la recuperación de los péptidos de interés ya que a otros valores precipitan también péptidos mono y difosforilados, los cuales no tienen actividad anticariogénica (Reynolds y col., 1994). Una mayor sinéresis se tuvo en los yogures T comparativamente a C y P. Teniendo en cuenta estos resultados, en un segundo estudio se evaluó el incremento del nivel de sólidos a través de la adición de sacarosa y polvos lácteos con múltiples propósitos: potenciar la síntesis de CPP por un incremento del nivel del sustrato de la reacción, reducir los defectos de textura y enmascarar el sabor amargo aportados

por algunos péptidos. Para ello, se elaboraron yogures naturales y endulzados con sacarosa, con y sin adición de tripsina (experimentales T y controles C) (a escala de 3 L), empleando como materia prima diferentes mezclas de leche fluida, LPD y caseinato de calcio (CaCN). Se verificó que la proteólisis inicial de la leche producida por el tratamiento con tripsina (1 h/40 °C) afectó negativamente la actividad metabólica del fermento, aunque solamente en los yogures con sacarosa, ya que se produjo un retraso en la fermentación. Por el contrario, los yogures T sin sacarosa presentaron el mismo tiempo de fermentación que los controles. Lorenzen y Meisel (2005) reportaron un retardo en la fermentación de aproximadamente 30 minutos y una menor producción de ácido láctico en yogures elaborados con leche hidrolizada con tripsina en comparación a los yogures no tratados. Por otro lado, la presencia de CaCN produjo una demora en el proceso fermentativo, lo que puede ser atribuido a un mayor efecto buffer causado por el caseinato. Los perfiles peptídicos de los yogures T fueron más complejos, presentando una gran cantidad de picos, identificándose entre ellos los correspondientes a los CPP. Se observó que las áreas de estos picos fueron mayores en los yogures hidrolizados preparados con leche fortificada con caseinato, lo que se atribuyó a la mayor concentración del sustrato caseínico. Por otro lado, algunos defectos fueron detectados en los yogures T: menor consistencia y cremosidad, y mayor sinéresis y sabor amargo. El sabor amargo puede ser atribuido a péptidos hidrofóbicos producidos durante la hidrólisis de la caseína (Brule y col., 1994). Sin embargo, se verificó que el agregado de sacarosa minimizó los defectos de textura, asociado al incremento del contenido de sólidos de la matriz (Chandan y O'Rell, 2006) y disminuyó la percepción de los sabores amargo y ácido. Otra alternativa que se propone para corregir los defectos de textura y sabor es el empleo de estabilizantes y saborizantes, entre otros.

La anticariogenicidad de los yogures de la última experiencia se evaluó a través de un ensayo *in vitro* de desmineralización, el cual emplea hidroxipatita (HA) como modelo dental. El ensayo se basa en poner en contacto la HA con un extracto de yogur, de modo que los componentes anticariogénicos se adhieran a la superficie del material. Luego de una etapa de lavado, la HA se expone un cierto tiempo a la acción de un buffer de pH ácido, que simula la solución erosiva. Finalmente, se separa la HA por centrifugación y en el sobrenadante se analiza el Ca y P proveniente de la disolución de la HA por el ácido. Por comparación de los niveles de Ca y P solubilizados para muestras de yogur y aquéllos liberados en ausencia de la muestra de yogur (HA+buffer), se calculó la protección porcentual de la desmineralización de la HA ejercida por los componentes anticariogénicos presentes en los yogures (Kanekanian y col., 2008).

Todos los yogures, tanto controles como hidrolizados, mostraron un efecto protector, que osciló entre 50 y 75%. Esto refleja que más allá de la presencia de CPP, únicamente presente en los yogures T, otros componentes de la matriz láctea ejercieron una protección a la erosión ácida de la HA, tal como se ha reportado en varios trabajos (Grenby y col., 2001; Warner y col., 2001; Herod, 2009).

En particular, en el caso de los yogures con LPD, se observó que el efecto protector en la liberación de Ca y P por parte de los yogures naturales T fue 15 y 10% mayor, respectivamente, que para los correspondientes yogures C, tanto al final de la elaboración como a los 14 días de almacenamiento. En el caso de los yogures con sacarosa, los yogures T ejercieron un efecto protector en la liberación de Ca que fue 11% superior a los respectivos yogures C al final de la elaboración, mientras que a los 14 días, este valor alcanzó niveles de 18%. El efecto en la liberación de P en los yogures azucarados fue similar al observado en los naturales.

En el caso de los yogures elaborados a partir de la mezcla con LPD y CaCN, los yogures T presentaron un nivel de protección hacia el Ca 14% mayor en comparación a los respectivos yogures C recién elaborados y luego de 14 días de almacenamiento. En relación a la liberación de P, el incremento en la protección de los yogures T respecto a los yogures C fue de 9 y 14% al final de la elaboración y a los 14 días, respectivamente. Los valores de protección mostraron la misma tendencia en los productos naturales y con sacarosa.

Los resultados obtenidos para los distintos tipos de yogures mostraron un claro incremento en la protección de la HA contra la erosión producida por el ácido por acción de los CPP presentes en los yogures experimentales. Estos resultados indican que dichos compuestos compiten más eficazmente con los iones H^+ por los sitios de enlace a la HA y reduce su solubilización. Por otra parte, se evidenció que los valores obtenidos de la protección de la HA por la presencia de los productos hidrolizados no dependió de la composición de la matriz (contenido de caseínas y azúcares). Además, el tiempo de almacenamiento de los yogures no afectó el efecto anticariogénico.

Referencias bibliográficas

- Ardö, Y.; Lilbæk, H.; Kristiansen, K.; Zakora, M. y Otte, J. (2007).** Identification of large phosphopeptides from β -casein that characteristically accumulate during ripening of the semi-hard cheese Herrgård. *International Dairy Journal*, 17, 513–524.
- Brule, G.; Roger, L.; Fauquant, J. y Piot, M. (1994).** Nutrient composition containing non-phosphorylated peptides from casein-based material. Patent N° 5334408.
- Chandan, R. y O'Rell, K. (2006).** Ingredients for yogurt manufacture. En Chandan R. (Ed.), *Manufacturing yogurt and fermented milks*. Iowa: Blackwell Publishing, 179–194.
- Chianese, L.; Caira, S.; Pissolongo, F.; Rusi, P.; Cagnano, P. y Addeo, F. (2003).** Production of probiotic yoghurt with increased levels of bioactive peptides. *Proceeding of the IDF Seminar on Aroma and Texture of Fermented Milk* organized by International Dairy Federation.
- Cross, K.; Huq, N.; Palamara, J.; Perich, J. y Reynolds, E. (2005).** Physicochemical characterization of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 15, 15362–15369.
- Ellegård, K.; Gammelgård-Larsen, C.; Sørensen, E. y Fedosov, S. (1999).** Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of tryptic bioactive casein phosphopeptides. *International Dairy Journal*, 9, 639–652.
- Ferrazano, G. F.; Cantile, T.; Quarto, M.; Ingenito, A.; Chianese, L. y Addeo, F. (2008).** Protective effect of yogurt extract on dental enamel demineralization *in vitro*. *Australian Dental Journal*, 53, 314–319.
- Grenby, T.; Andrews, A.; Mistry, M. y Williams, R. (2001).** Dental caries protective agents in milk and milk products: investigations *in vitro*. *Journal of Dentistry*, 29, 83–92.
- Herod, E. (2009).** The effect of cheese on dental caries: A review of the literature. *Australian Dental Journal*, 36, 120–125.
- Kanekanian, A.D.; Williams, R.J.H.; Brownsell, V.L. y Andrews, A.T. (2008).** Caseinophosphopeptides and dental protection: Concentration and pH studies. *Food Chemistry*, 107, 1015–1021.
- Korhonen H. (2009).** Milk-derived bioactive peptides: from science to application. *Journal of Functional Foods*, 1, 177–187.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. (2006).** Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945–960.
- Leclerc, P.-L.; Gauthier, S. F.; Bachelard, H.; Santure, M. y Roy, D. (2002).** Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, 12, 995–1004.
- Lorenzen, P. (2004).** Plasmin-induced release of caseinophosphopeptides in yogurt milk. *Milchwissenschaft*, 59, 638–640.
- Lorenzen, P.C. y Meisel, H. (2005).** Influence of trypsin action in yogurt milk on the release of caseinophosphopeptide-rich fractions and physical properties of the fermented products. *International Journal of Dairy Technology*, 58(2), 119–124.
- Phelan, M.; Aherne, A.; Fitzgerald, R.J. y O'Brien, N.M. (2009).** Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, 19, 643–654.
- Reynolds, E. (1991).** Anticariogenic phosphopeptides. Patente N° 5015628.
- . (1998). Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: A review. *Special Care in Dentistry*, 18(1), 8–16.
- . (2005). Calcium phosphopeptide complexes. Patent Application Publication N° US 2005/0037948A1.
- Reynolds, E.C. (2002).** Production of phosphopeptides from casein. Patente US 6448374B1.
- Reynolds, E.; Riley, P. y Adamson, N. (1994)** A selective precipitation purification procedure for multiple phosphoserine-containing peptides and methods for their identification. *Analytical Biochemistry*, 217, 277–284.
- Silva, S.V. y Malcata, X. (2005).** Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15(1), 1–15.

Walker, G.D.; Cai, F.; Shen, P.; Adams, G.G.; Reynolds, C. y Reynolds, E.C. (2010). Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate incorporated into sugar confections inhibits the progression of enamel subsurface lesions *in situ*. *Caries Research*, 44(1), 33–40.

Walker, G.D.; Cai, F.; Shen, P.; Bailey, D.L.; Yuan, Y.; Cochrane, N.J.; Reynolds, C. y Reynolds, E.C. (2009). Consumption of milk with added casein

phosphopeptide-amorphous calcium phosphate remineralized enamel subsurface lesions *in situ*. *Australian Dental Journal*, 54, 245–249.

Warner, E.; Kanekanian, A. y Andrews A. (2001). Bioactivity of milk proteins: 1. Anticariogenicity of whey proteins. *International Journal of Dairy Technology*, 54(4), 151–153.

2.3. Ácido linoleico conjugado (CLA) en yogur y formulación de un ingrediente alto CLA

Ma. Ayelén Vélez, Silvina Rebecchi, Erica Hynes, Leila Pozza, Verónica Wolf y Ma. Cristina Perotti

Definiciones y características

El ácido linoleico conjugado, denominado comúnmente CLA por sus siglas en inglés (Conjugated Linoleic Acid), es un término genérico usado para describir la mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico (LA, C₁₈:2 9c,12c) con dobles enlaces conjugados. Se ha descrito que los dobles enlaces pueden encontrarse entre las posiciones 6 y 15 de la cadena carbonada y con 4 isomerías geométricas (trans, trans; cis, trans; trans, cis y cis, cis), dando un total de 28 isómeros posibles (Roach y col., 2002). Sin embargo, los isómeros más importantes desde el punto de vista biológico son 9c,11t (conocido como ácido ruménico) y 10t,12c.

Efectos benéficos para la salud

Entre los posibles efectos beneficiosos se pueden citar la reducción del contenido de grasa corporal y aumento de masa muscular, prevención de arterioesclerosis, reducción del colesterol plasmático, estimulación del sistema inmune, inhibición del inicio de carcinogénesis y posiblemente activi-

dad antioxidante, efectos que se han evidenciado en innumerables experimentos *in vitro* y en algunos casos *in vivo*, aunque los mecanismos de acción no se han establecido por completo (Pariza y col., 2000; Hur y col., 2007; Abbas y col., 2014; Kim y col., 2016; Fuke y Nornberg, 2017; Koronowicz y Banks, 2018). Las más recientes investigaciones sugieren que algunos de los efectos fisiológicos resultarían de múltiples interacciones entre los dos isómeros biológicamente activos; sin embargo, en algunos casos estos isómeros podrían actuar en oposición (Bhattacharya y col., 2006; Park, 2009). Algunos autores proponen niveles de ingesta diaria con el fin de conseguir los efectos positivos mencionados (Berg y col., 1995; Parodi, 2004; Sieber y col., 2004; Whigham y col., 2007); otros señalan que se necesita investigación adicional para clasificar los niveles requeridos en humanos según el efecto biológico (Fontecha y Juárez, 2017). Se encuentran disponibles en el comercio suplementos dietarios (Tonalin de Natrol®, YourLife®, VitaminWorld®) en forma de cápsulas, compuestos por aceites ricos en CLA con una concentración total de 60–90% y conteniendo principalmente los isómeros 9c,11t y 10c,12t (Larsen y col., 2003; Rodríguez-Alcalá y Fontecha, 2007).

Origen de CLA. Alimentos lácteos como fuente de CLA

El CLA está presente naturalmente en los tejidos animales, predominantemente en el tejido graso de rumiantes y en menor proporción de animales no rumiantes, y es un componente habitual de la leche de rumiantes. Se origina en el rumen por acción microbiana (principalmente por la bacteria anaerobia estricta *Butirovibrio fibrisolvens* y también por *Megasphaera elsdenii*) mediante reacciones de isomerización y biohidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) aportados por la alimentación, principalmente ácidos linoleico y linolénico (LNA, C18:3 9c, 12c,15c), y también por la desaturación del ácido vaccénico (C18:1 11t) por la enzima $\Delta 9$ desaturasa en la glándula mamaria de vacas lactantes (Sieber y col., 2004; Parodi, 2004; Wang y Lee, 2015). Un requisito para que se produzca la síntesis de CLA es la presencia de los ácidos grasos (principalmente LA) en estado libre, por lo cual es necesario que se produzca previamente una hidrólisis enzimática de los triacilgliceroles, fosfolípidos y glicolípidos. La biohidrogenación ruminal es un proceso complejo y no completamente dilucidado; otras isomerasas podrían participar de este proceso influenciadas por diferentes factores tales como la dieta del animal, el sistema de producción, las condiciones medioambientales, la región geográfica, la raza del animal, etc., lo que explicaría la presencia

de los otros isómeros además de los mayoritarios mencionados y la amplia variabilidad en los valores de concentración encontrados (Parodi, 2004; Collomb y col., 2006). Asimismo, las condiciones de procesamiento del alimento también contribuyen a las diferencias observadas. En efecto, el nivel naturalmente presente en leche y productos lácteos es relativamente bajo y se ubica entre 0,6 y 15,0 mg/100 g de grasa; en muchos casos estos valores están debajo de los niveles que se consideran adecuados para ejercer los efectos saludables (Akalin y col., 2007; Oliveira y col., 2009; Korhonen, 2009; Koronowicz y Banks, 2018). Datos acerca del nivel de CLA de los alimentos lácteos que consumimos en nuestro país son prácticamente inexistentes; en nuestro Instituto se han analizado muestras de yogures comerciales de diferentes variedades y encontramos niveles que oscilan entre 0,50 y 1,15 mg/100 g de grasa (Rebechi y col., 2018).

Estrategias para incrementar los niveles de CLA en alimentos lácteos fermentados

Varios desarrollos se han orientado a incrementar el contenido de CLA en matrices lácteas. En algunos países se comercializan leche fluida, leche en polvo, yogur y quesos enriquecidos en CLA (Rodríguez-Alcalá y Fontecha, 2007). En nuestro país, los alimentos enriquecidos en CLA son prácticamente inexistentes.

La alternativa más antigua y una de las más ensayadas para producir una leche «naturalmente» enriquecida en CLA es la manipulación de la dieta del animal, a través del incremento de los niveles de los precursores necesarios para la síntesis ruminal. Por otro lado y debido al hecho que la formación de CLA tiene un origen microbiano, como se indicó anteriormente, esto condujo a la hipótesis de que otros microorganismos, incluidas bacterias lácticas, podrían sintetizarlo. Varios estudios *in vitro* han permitido identificar microorganismos productores, y muchos de ellos fueron incluidos como cultivos *starter* en la manufactura de alimentos lácteos fermentados (Lin y col., 1999; Sieber y col., 2004; Ogawa y col., 2005; Akalin y col., 2007; Dahiya y Puniya, 2018). Sobre estas dos estrategias, algunos estudios fueron abordados por grupos de investigación nacionales (Gagliostro y col., 2006; Van Nieuwenhove y col., 2007; Taboada y col., 2015). Otra opción para conseguir un alimento enriquecido en CLA, consiste en incorporar un ingrediente de CLA durante su fabricación (www.foodnavigator-usa.com/Markets, 2013). Sobre este desafío tecnológico se ha realizado un importante avance desde el INLAIN, que se profundizará a continuación.

Preparación de un ingrediente rico en CLA

El diseño de alimentos enriquecidos en CLA presenta varios desafíos, como por ejemplo la protección de los isómeros frente al deterioro químico durante el procesamiento y el almacenamiento del alimento, la incorporación de cantidades significativas en el producto final y la mejora de la biodisponibilidad de los biocompuestos. Una opción novedosa para hacer frente a estos retos consiste en aplicar métodos de encapsulación. La encapsulación implica el diseño o formulación de un sistema en el que el compuesto de interés es recubierto dentro de una matriz que lo protege de los tratamientos aplicados durante el procesamiento y almacenamiento del alimento, los que podrían afectar negativamente a dicho componente y, además, mejorar su biodisponibilidad en el tracto gastrointestinal (Joye y col., 2014). La biodisponibilidad refiere a la fracción del compuesto de interés que alcanza la circulación sistémica y se encuentra disponible para ejercer su acción beneficiosa en el organismo (Carbonell–Capella y col., 2014; Vélez y col., 2017a).

Dentro de las técnicas de encapsulación, la tecnología liposomal es una estrategia muy innovadora que tiene características beneficiosas, como la biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y capacidad de encapsular compuestos lipo e hidrofílicos. Los liposomas son estructuras típicamente esféricas auto ensambladas formadas principalmente por lípidos polares (fosfolípidos) estructurados en forma de una o más bicapas (lamelas) y que encierran medio acuoso en su interior. En la actualidad existen numerosos métodos de preparación de liposomas. El principio que subyace a la formación de las vesículas es la interacción entre las moléculas de lípidos y el agua (interacciones hidrofóbicas, de Van der Waals, electrostáticas). El suministro de energía (por ejemplo, a través de la homogeneización, sonicación, agitación, etc.) da lugar a la disposición de las moléculas lipídicas en forma de bicapa logrando un equilibrio en la fase acuosa (Mozafari, 2005). La bicapa lipídica que forma estas estructuras es similar a la porción lipídica de membranas biológicas, lo cual las hace capaces de transportar compuestos hidrofóbicos o hidrofílicos. El tamaño de las vesículas puede variar desde 20 nm a varios micrones, dependiendo de las condiciones de preparación. Los nano liposomas son partículas de tamaño nanométrico, generalmente menor a 200 nm (Livney, 2015). Estas partículas tienen muchas similitudes fisicoquímicas con liposomas convencionales pero tienen los beneficios de ser nanotransportadores, así como posee una gran superficie y un mejor potencial de penetración (Jafari, 2017). El tamaño y la lamelaridad de las vesículas influyen en la vida media y por lo tanto, estabilidad, y en la eficiencia de encapsulación de los compuestos target.

Para aplicaciones alimentarias, es importante que los componentes que se elijan como material encapsulante sean de grado alimenticio, biodegradables y capaces de aislar u ofrecer una barrera entre la fase interna y el medio que rodea la vesícula (Nedovic y col., 2011). En este sentido, en el INLAIN se propuso generar conocimiento novedoso sobre dichas estructuras, tendiente a mejorar el desempeño de las vesículas para transportar y entregar CLA, dando lugar a numerosas potenciales aplicaciones. Se desarrollaron liposomas sobre la base de fosfatidil colina de soja por ser un compuesto ampliamente utilizado en el sector agroalimentario con diferentes propósitos (por ej.: aditivo alimentario emulsionante). Se trabajó con el método de inyección etanólica ya que ofrece ventajas en cuanto a su factibilidad para el escalado, es simple, no requiere la utilización de solventes peligrosos y en general conduce a la formación de liposomas oligolamelares sin requerimientos técnicos excesivos (Wagner y col., 2002; Jahn y col., 2004; Gharib y col., 2016). Las formulaciones estudiadas en las que se varió la proporción molar de fosfatidil colina de soja y CLA (2:0,4 y 2:1) mostraron una alta estabilidad (30 días/4°C) y capacidad para proteger al CLA, con una eficiencia de encapsulación determinada por cromatografía de gases mayor al 80%. En todos los casos, el tamaño medio de las vesículas, caracterizado por dispersión dinámica de la luz, fue inferior a 300 nm, siendo mayor en las suspensiones con CLA. Las imágenes de la microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostraron evidencia de la presencia de vesículas oligolamelares. Respecto a la fluidez de membrana analizada por resonancia paramagnética electrónica (EPR), se distinguieron dos comportamientos en la bicapa: el CLA en las dos formulaciones desordenó la zona externa incrementando su fluidez, pero la formulación con mayor proporción de CLA ocasionó una disminución de la fluidez en el interior de la membrana; estos resultados podrían tener implicancias en el desempeño de las suspensiones liposomales durante el pasaje gastrointestinal (Vélez y col., 2017c). Estos resultados se presentaron en la Feria INNOVAR 2017 (Vélez y col., 2017b). Hasta el momento, según nuestro conocimiento, no existen antecedentes publicados, ni tampoco lácteos alto CLA disponibles comercialmente, con la tecnología de encapsulación en liposomas. Además, se encontró que las suspensiones liposomales con CLA resistieron exitosamente el secado por liofilización (Vélez y col., 2019). El polvo obtenido luego del proceso se rehidrató en un simulante de leche (pH > 5) y las vesículas se caracterizaron. Los liposomas con CLA liofilizados y rehidratados presentaron mayor estabilidad que los liposomas controles (ausencia de sedimentación), menor tamaño medio (< 600 nm) y menor índice de polidispersión, lo cual indica una dispersión de tamaño homogénea. La eficiencia de encapsulación se mantuvo estable

(70%) durante 30 días. La microscopía TEM corroboró la presencia de vesículas (Fig. 1), y la fluidez de membrana verificada en las suspensiones frescas no se modificó durante el proceso de secado.

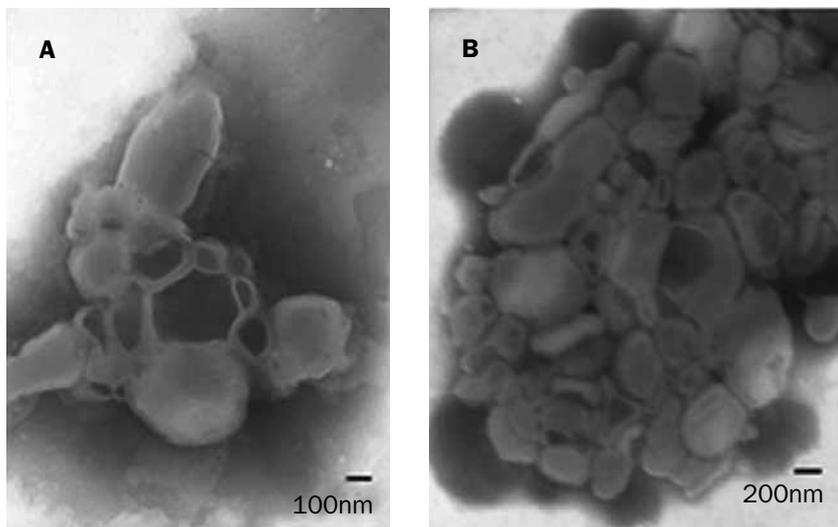


Figura 1. Microfotografías (TEM) de liposomas liofilizados y rehidratados, a 3 días de almacenamiento. A y B: liposomas controles y con CLA, respectivamente (Adaptación de Vélez y col., 2019)

El próximo paso fue evaluar el impacto de la incorporación del ingrediente en polvo en la tecnología de yogur. No se produjo una modificación en el tiempo de fermentación por dicho agregado, no hubo diferencias de pH y acidez y se evidenció una menor sinéresis al final del almacenamiento (21 días 4 °C) comparado con los yogures sin el agregado del ingrediente. El proceso de elaboración y almacenamiento no afectó al CLA contenido en los liposomas ya que muy altos porcentajes de recuperación (> 95%) se obtuvieron para los yogures adicionados respecto de los yogures sin adición. Esto indicaría el éxito de las estructuras desarrolladas para proteger al biolípido de su degradación, con las que se consiguió un yogur en el que se triplicó el nivel de CLA respecto al nivel basal presente en la leche de partida.

Referencias bibliográficas

- Abbas, H.; Shahein, N.; AbdRabou, N.; Kassem, J.; Youssef, Y. (2014).** Conjugated linoleic acid: Biosynthesis, benefits for human health and its contents in milk and milk products. *Life Science Journal*, 11(2s), 215–227.
- Akalın, A.S.; Tokuşoğlu, Ö.; Gönç, S. y Aycan, Ş. (2007).** Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *International Dairy Journal*, 17(9), 1089–1095.
- Berg, J.J.V.; Cook, N.E. y Tribble, D.L. (1995).** Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids*, 30, 599–605.
- Bhattacharya, A.; Banu, J.; Rahman, M.; Causey, J. y Fernandes, G. (2006).** Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, 789–810.
- Carbonell-Capella, J.M.; Buniowska, M.; Barba, F.J.; Esteve, M. J. y Frígola, A. (2014).** Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171.
- Collomb, M.; Schmid, A.; Sieber, R.; Wechsler, D. y Ryhänen, E.L. (2006).** Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *International Dairy Journal*, 16(11), 1347–1361.
- Dahiya, D.K. y Puniya, A.K. (2018).** Optimisation of fermentation variables for conjugated linoleic acid bioconversion by *Lactobacillus fermentum* DDHI27 in modified skim milk. *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 46–55.
- Fontecha, J. y Juárez, M. (2017).** Chapter 19 – Recent Advances in Dairy Ingredients and Cardiovascular Diseases With Special Reference to Milk Fat Components. En R.R. Watson, R.J. Collier y V.R. Preedy (Coords.). *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan*. Cambridge: Academic Press, 251–261.
- Fuke, G. y Nornberg, J.L. (2017).** Systematic evaluation on the effectiveness of conjugated linoleic acid in human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(1), 1–7.
- Gagliostro, G.A.; Rodriguez, A.; Pellegrini, P.A.; Gatti, P.; Muset, G.; Castañeda, R.A., Colombo, D. y Chilliard, Y. (2006).** Efectos del suministro de aceite de pescado solo o en combinación con aceite de girasol sobre las concentraciones de ácido linoleico conjugado (CLA) y omega 3 (n-3) en leche de cabra. *Revista Argentina de Producción Animal*, 26, 71–87.
- Gharib, R.; Greige-Gerges, H.; Jraj, A.; Auezova, L. y Charcosset, C. (2016).** Preparation of drug-in-cyclodextrin-in-liposomes at a large scale using a membrane contactor: Application to trans-anethole. *Carbohydrate Polymers*, 154, 276–286.
- Hur, S.J.; Park, G.B. y Joo, S.T. (2007).** Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. *Livestock Science*, 110(3), 221–229.
- Jafari, S.M. (2017).** Chapter 1 - An Introduction to Nanoencapsulation Techniques for the Food Bioactive Ingredients. En S.M. Jafari (Coord.), *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients*. Cambridge: Academic Press, 1–62.
- Jahn, A.; Vreeland, W.N.; Gaitan, M. y Locascio, L.E. (2004).** Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing. *Journal of the American Chemical Society*, 126(9), 2674–2675.
- Joye, I.J.; Davidov-Pardo, G. y McClements, D.J. (2014).** Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 40(2), 168–182.
- Kim, J.H.; Kim, Y.; Kim, Y.J. y Park, Y. (2016).** Conjugated Linoleic Acid: Potential Health Benefits as a Functional Food Ingredient. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 221–244.
- Korhonen, H.J. (2009).** Bioactive Components in Bovine Milk. In Y.W. Park (Ed.). *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Hoboken: Wiley-Blackwell, 13–42.
- Koronowicz, A.A. y Banks, P. (2018).** Antitumor Properties of CLA-Enriched Food Products. *Nutrition and Cancer*, 70(4), 529–545.
- Larsen, T.M.; Toubro, S. y Astrup, A. (2003).** Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity: evidence from animal and human studies. *J Lipid Res*, 44(12), 2234–2241.

- Lin, T.Y., Lin, C.W. y Lee, C.H. (1999).** Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chemistry*, 67(1), 1–5.
- Livney, Y.D. (2015).** Nanostructured delivery systems in food: Latest developments and potential future directions. *Current Opinion in Food Science*, 3, 125–135.
- Mozafari, M.R. (2005).** Liposomes: An overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10(4), 711–719.
- Nedovic, V.; Kalusevic, A.; Manojlovic, V.; Levic, S. y Bugarski, B. (2011).** An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806–1815.
- Ogawa, J.; Kishino, S.; Ando, A.; Sugimoto, S.; Mihara, K. y Shimizu, S. (2005).** Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(4), 355–364.
- Oliveira, R.P.S.; Florence, A.C.R., Silva, R.C.; Perego, P.; Converti, A.; Gioielli, L.A. y Oliveira, M.N. (2009).** Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 467–472.
- Pariza, M.W., Park, Y. y Cook, M.E. (2000).** Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 223(1), 8–13.
- Park, Y. (2009).** Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad trans fat? *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, S4–S12.
- Parodi, P.W. (2004).** Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology*, 59(1), 3–59.
- Rebecchi, S.R.; Vélez, M.A.; Pozza, L.; Wolf, I.V. y Perotti, M.C. (2018).** Composición de ácidos grasos y contenido de CLA en yogures comerciales. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 101, 40–45.
- Roach, J.A.G.; Mossoba, M.M.; Yurawecz, M.P. y Kramer, J.K.G. (2002).** Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Analytica Chimica Acta*, 465(1/2), 207–226.
- Rodríguez-Alcalá, L.M. y Fontecha, J. (2007).** Hot Topic: Fatty Acid and Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomer Composition of Commercial CLA-Fortified Dairy Products: Evaluation After Processing and Storage. *Journal of Dairy Science*, 90(5), 2083–2090.
- Sieber, R.; Collomb, M.; Aeschlimann, A.; Jelen, P. y Eyer, H. (2004).** Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products - A review. *International Dairy Journal*, 14(1), 1–15.
- Taboada, N.; Van Nieuwenhove, C.; Alzogaray, S.L. y Medina, R. (2015).** Influence of autochthonous cultures on fatty acid composition, esterase activity and sensory profile of Argentinean goat cheeses. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 86–94.
- Van Nieuwenhove, C.; Oliszewski, R.; González, S.N.; Pérez Chaia, A.B. (2007).** Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. *Letters in Applied Microbiology*, 44(5), 467–474.
- Vélez, M. A.; Cristina Perotti, M.; Santiago, L.; María Gennaro, A. y Hynes, E. (2017a).** 6 – Bioactive compounds delivery using nanotechnology: design and applications in dairy food. En Grumezescu, A.M. (Coord.). *Nutrient Delivery*. Cambridge: Academic Press, 221–250.
- (2017b). Proyecto 20773. Novedoso ingrediente funcional con ácido linoleico conjugado. En Acosta (Coord.). *Décimo Tercera Edición INNOVAR concurso nacional de innovaciones*. Buenos Aires: Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, 143.
- (2017c). Soy PC liposomes as CLA carriers for food applications: Preparation and physicochemical characterization. *Journal of Food Engineering*, 212, 174–180.
- (2019). Effect of lyophilization on food grade liposomes loaded with conjugated linoleic acid. *Journal of Food Engineering*, 240, 199–206.
- Wagner, A.; Vorauer-Uhl, K.; Kreismayr, G. y Katinger, H. (2002).** The crossflow injection technique: An improvement of the ethanol injection method. *Journal of Liposome Research*, 12(3), 259–270.
- Wang, T. y Lee, H.G. (2015).** Advances in research on cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid: a major functional conjugated linoleic acid isomer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition is a food science*, 55(5), 720–731.
- Whigham, L.D.; Watras, A.C. y Schoeller, D.A. (2007).** Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: A meta-analysis in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(5), 1203–1211.

3. Mohos productores de gas y *Gluconobacter*: nuevos alterantes microbianos en yogures argentinos

Ma. Luján Capra, Laura Frisón, Carolina Chiericatti,
Ana Binetti y Jorge Reinheimer

Este escrito presenta como casos notables en las producciones de yogur en Argentina, muestras en las que se detectaron microorganismos alterantes no previamente reportados como tales en leches fermentadas (mohos productores de gas y bacterias del género *Gluconobacter*).

El deterioro microbiológico de los alimentos constituye un problema sustancial para los consumidores y la industria alimentaria, ya que conduce a productos no aptos, al descarte de los mismos y a muy importantes pérdidas económicas. Durante su almacenamiento, los alimentos frescos representan nichos atractivos para la supervivencia y crecimiento de microorganismos indeseables.

En productos lácteos, la presencia y efecto de bacterias alterantes y/o patógenas se encuentra mejor documentada en comparación con la información disponible en tal sentido sobre mohos y levaduras (Garnier y col., 2017b). Los lácteos son menos susceptibles al deterioro por mohos que otros productos tales como frutas y verduras. Esto se debe a que deben conservarse en almacenamiento refrigerado, generalmente se elaboran a partir de leche tratada térmicamente, contienen naturalmente ácidos orgánicos y en el caso de alimentos fermentados, cuentan con microbiota dominante la cual acidi-

fica el medio. Sin embargo, incluso quesos y yogures son susceptibles frente a mohos (Garnier y col., 2017a; Buehler y col., 2018) siendo el yogur considerado entre los productos lácteos más perecederos frente al deterioro fúngico (Gougouli y Koutsoumanis, 2017), aunque debe aclararse que los organismos alterantes «clásicos» fueron siempre levaduras.

Mohos como alterantes de yogur

Un número significativo de especies fúngicas puede sobrevivir e incluso crecer en productos lácteos gracias a su habilidad de metabolizar diferentes compuestos presentes en tales alimentos. Más aún, ciertas especies son xerofílicas, ácido-tolerantes y/o psicotolerantes, pudiendo incluso en cierta medida sostener el crecimiento en presencia de conservantes químicos adicionados para extender la vida útil en estos alimentos (Sørhaug, 2011; Garnier y col., 2017a).

El deterioro producido por mohos y levaduras en los yogures puede evidenciarse a través del crecimiento (colonia o talo) en la superficie del producto, así como también por presencia de sabores y/u olores desagradables causados por la producción de metabolitos (etanol, compuestos orgánicos volátiles) y/o de enzimas lipolíticas o proteolíticas, por alteraciones del color y/o textura y por producción de CO₂ gaseoso (Foschino y col., 1993; Garnier y col., 2017a, b). Principalmente, la presencia de levaduras en yogur se debe a contaminaciones pos pasteurización, aunque ciertas especies muestran elevada resistencia térmica (Garnier y col., 2017a). Los mohos responsables de alteraciones en productos lácteos son diversos en género (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Thamnidium*) y especie. Han sido aislados mayormente de quesos con alteraciones aunque pueden también contaminar productos tratados térmicamente. Análogo a lo explicitado para levaduras, generalmente son debido a contaminaciones pos proceso térmico o en algunos casos, por presencia de esporos fúngicos termorresistentes.

Exceptuando la producción de micotoxinas —algunas especies de *Penicillium* y *Aspergillus spp.* pueden producir bajas concentraciones de micotoxinas u otros metabolitos tóxicos en quesos (Sørhaug, 2011)— el deterioro del producto es la principal preocupación asociada al crecimiento de los mohos en un alimento. Sin embargo, y a pesar de que no se las tiene en cuenta como un riesgo biológico, ciertas especies usualmente consideradas comensales pueden comportarse como patógenos oportunistas en situaciones especiales (Russell y col., 2017; Snyder y Worobo, 2018). De modo que el problema debe contemplarse también desde aspectos de seguridad alimentaria y no solo desde la inconveniencia del reclamo del consumidor, su insatisfacción por el producto y su pérdida de confianza por la marca.

A partir del análisis de muestras de yogur enviadas al Instituto de Lactología Industrial por presentar defectos, fue posible aislar microorganismos diferentes a levaduras, responsables de deterioro.

Mohos gasógenos

Una industria envió muestras provenientes de tres producciones durante el verano de 2016–2017. Las mismas fueron yogures bebibles y batidos, de sabor vainilla o frutilla con valores de pH y presencia de microbiota láctica normales en todos los casos. Sin embargo, el análisis de varias de ellas evidenció presencia de altos recuentos de diferentes tipos de contaminantes: variedad de levaduras (algunas gasógenas) (10^3 – 10^6 UFC/ml), un moho usualmente aislado como contaminante ambiental (*Aspergillus niger*, 10 UFC/ml) y, lo más notable, la presencia de mohos gasógenos pertenecientes al orden Mucorales (*Mucor racemosus* y *Mucor circinelloides*) (10^2 – 10^4 UFC/ml). Para un par de muestras de este grupo los envases se encontraban visiblemente hinchados/abombados; para otra, colapsado (Fig. 1). Con respecto a la producción de gas CO_2 , se verificó en caldo MRS con campana de *Dürham* para ciertos aislamientos de levaduras y los aislamientos fúngicos correspondientes a *Mucor* (Fig. 2).



Figura 1. Aspecto que presentaron las muestras con evidentes alteraciones gasógenas (muestras 4, 5 y 6 de derecha a izquierda)

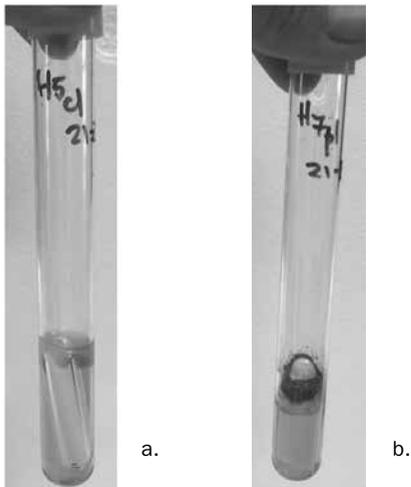


Figura 2. Cultivos en caldo MRS con campana de Dürham de los mohos a) *Mucor circinelloides* y b) *Aspergillus niger* (con y sin producción de gas, respectivamente), incubados a 34 °C por 72 h

Las tres muestras presentaron aroma y sabor desagradables. Las muestras 4 y 5 mostraron recuentos de 10^4 UFC/ml de mohos productores de gas. La muestra 6 reveló un recuento de 10^5 UFC/ml de levaduras.

En un muestreo adicional se analizaron 5 muestras, a tres de las cuales se le había adicionado sorbato de potasio como conservante. Solo en una de las muestras no fue posible detectar mohos ni levaduras; mientras que en otras dos se detectaron levaduras en concentraciones de 7×10^4 y 10^5 UFC/ml sin y con adición del conservante, respectivamente. Para las restantes muestras, ambas con sorbato adicionado, se detectó la presencia de mohos en baja concentración (10^2 UFC/ml). Incluso, en una de ellas se aislaron los dos géneros de mohos mencionados (*Aspergillus* y *Mucor*). Evidentemente, el sorbato de potasio no inhibe completamente a los mohos ni a las levaduras presentes.

Uno de los contaminantes más comunes asociados a yogur es el *Aspergillus niger* y su prevalencia es crítica para la vida útil del producto ya que es capaz de crecer abundantemente en la interfase yogur-aire si las condiciones le son propicias (Gougouli y Koutsoumanis, 2017), siendo en general ambiental el origen de la contaminación.

Los mohos pertenecientes al orden Mucorales se han encontrado en yogures y son capaces de alternar entre dos fases de crecimiento (dimorfismo). Su forma de crecimiento predominante es filamentosa, pero bajo condiciones específicas (por ejemplo, baja tensión de oxígeno) pueden crecer como

levadura (Pitt y Hocking, 2009; Vellanki y col., 2018). Es en esta fase de crecimiento levaduriforme en la que ocurre la producción de CO_2 que conduce a la efervescencia detectada en yogures y al abombamiento de los envases (Snyder y col., 2016). En la Fig. 3 se aprecian imágenes del aspecto macroscópico de las colonias y observaciones microscópicas de los mohos gasógenos aislados en nuestro estudio a partir de las muestras contaminadas. Estas últimas mostraron las características de crecimiento típico observados para las especies de *Mucor*, es decir hifas no septadas, aéreas, decoradas con esporangios conteniendo miles de esporangiosporos (esporos asexuales).

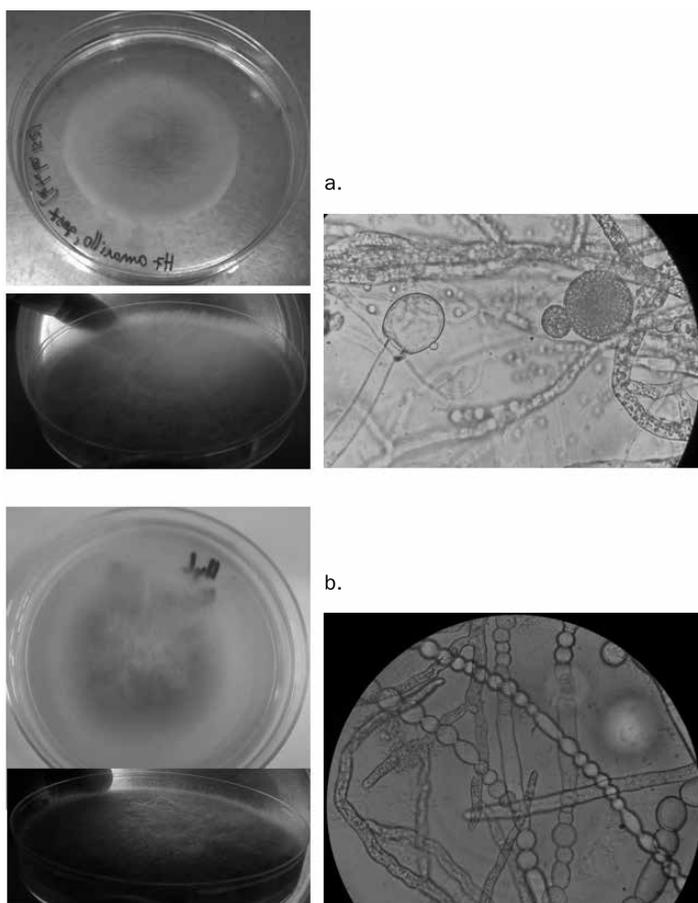


Figura 3. Aspecto macroscópico de la colonia (izquierda) y observación microscópica (1000x) de contraste de fases (derecha) de los mohos a) *Mucor racemosus* y b) *Mucor circinelloides* en agar glucosa cloranfenicol a los 2 y 5 días de incubación a 28 °C

El género *Mucor* es reconocido como agente causal de deterioro de alimentos pero no es usualmente considerado patógeno alimentario ya que su ingestión no se asocia con enfermedades gastrointestinales, especialmente entre individuos sanos (Snyder y col., 2016). *M. circinelloides* es un moho filamentoso por naturaleza, aunque dimórfico, mayormente presente en el suelo, plantas y frutos en descomposición (manzanas, peras y frutillas).

En 2013 se produjo en Estados Unidos un brote relacionado con el consumo de un producto comercial contaminado con *Mucor circinelloides*. Se observaron potes hinchados y presencia de burbujas en un yogur tipo Griego debido al CO₂ producido por el moho contaminante (Snyder y col., 2016). Según reportó la FDA (*Food and Drug Administration*), más de 200 consumidores se quejaron de malestares digestivos, incluyendo calambres abdominales, vómitos, náuseas y diarrea por lo que el lote fue retirado del mercado. Estos autores indicaron que es muy poco probable que *M. circinelloides* sobreviva a la pasteurización, sino que más bien su presencia se deba a contaminaciones pos tratamiento térmico. Luego, ya en el envase y debido a los metabolitos generados por la fermentación de las bacterias lácticas en el yogur, puede disponerse para un crecimiento levaduriforme con producción de CO₂.

M. circinelloides es reconocido como patógeno oportunista y es uno de los agentes etiológicos causales de mucormicosis, una infección potencialmente fatal en humanos y animales inmunocomprometidos (Lazar y col., 2014; Snyder y col., 2016, Vellanki y col., 2018).

Fuentes de contaminación

Mohos y levaduras pueden crecer en ambientes húmedos de las plantas lácteas y establecerse en diferentes áreas, superficies, equipamientos, si los mismos no son adecuadamente higienizados y sanitizados. Pueden ingresar también junto con los ingredientes y materias primas usadas, en los envases e incluso, por el personal. El aire es una vía de ingreso y un vehículo muy importante fundamentalmente para la dispersión de esporos fúngicos. Particularmente en yogur, las preparaciones de fruta pueden ser fuente de ingreso de mohos y levaduras (Sørhaug, 2011; Garnier y col., 2017b; Dijksterhuis, 2018; Snyder y Worobo, 2018).

Control y prevención

Para el control de mohos y levaduras es necesario identificar en la línea de producción de cada planta los puntos de exposición del producto lácteo que

se elabora. Esa información permitirá el desarrollo de estrategias de control y prevención combinadas a fin de disminuir el riesgo de contaminación y deterioro microbiológico de los alimentos.

Como métodos preventivos —con los que se intenta evitar la contaminación durante el procesamiento del producto— se incluyen envasado aséptico, aplicación de sistemas de filtración de aire y de presión positiva en ambientes críticos, y buenas prácticas de manufactura, con especial énfasis en la aplicación de buenas prácticas de limpieza y sanitización de la planta y los equipos a fin de reducir el nivel de esporos fúngicos en el ambiente. La elección de sanitizantes parece ser crítica, en donde el cloro es el más efectivo frente a mohos en comparación con el ácido peracético o peróxidos. Las estrategias de prevención incluyen además programas de monitoreo ambiental.

Entre los métodos de control, cuyo fin es enlentecer o inhibir el crecimiento de microorganismos indeseados, se mencionan la adición de conservantes químicos, envasado en atmósferas modificadas, bajas temperaturas de almacenamiento, aplicación de calor o tratamientos de alta presión, entre otros.

El control de la temperatura es crítico para la calidad y vida útil de los productos lácteos, aunque las bajas temperaturas y aun la conservación por congelación no eliminan a los microorganismos. Gougouli y col. (2011) encontraron diferencias en la capacidad de crecimiento para 12 especies fúngicas durante el almacenamiento refrigerado de yogur, siendo los aislamientos correspondientes a *Penicillium commune* (7,6 °C) y *Aspergillus niger* (9,6 °C) los que mostraron crecimiento a menores temperaturas. Las especies del género *Mucor* crecen adecuadamente a temperaturas de refrigeración y en condiciones de muy baja tensión de oxígeno (Sørhaug, 2011).

Algunos métodos más recientes implican el uso de cultivos bioprotectores (bacterias lácticas o propiónicas con actividad antifúngica demostrada) o de sus productos de fermentación (metabolitos antifúngicos adicionados como ingredientes) con el objeto de disminuir el uso de conservantes químicos en respuesta a la demanda creciente de los consumidores por productos con rotulados limpios (Garnier y col., 2017a; Buehler y col., 2018).

El deterioro de yogures por contaminación con *M. circinelloides* representa un evento de alteración inusual. La mayoría de los Mucorales son saprófitos que se encuentran en la materia orgánica en descomposición. *M. circinelloides* comúnmente produce la descomposición de frutas frescas y vegetales, siendo poco frecuente como alterante en productos procesados. Los procesos de contaminación y deterioro de productos alimenticios para este moho han sido muy pobremente estudiados en comparación con muchos de los miembros de *Ascomycetes* (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*), los cuales son corrientemente asociados con alteraciones de alimentos.

***Gluconobacter* como alterante de yogur**

Como ya se mencionó, las levaduras son los alterantes habituales del yogur. Sin embargo, en el INLAIN se recibieron a mediados de 2018 muestras de yogur (batido con colchón de frutas, batido con pulpa y bebible) con evidente alteración de los caracteres organolépticos (olor intenso con fondo desagradable, sabor amargo y color naranja óxido, sin evidencia de producción de gas) sospechosas de contener alterantes de origen microbiano. Los pH resultaron ligeramente ácidos para este tipo de muestras, oscilando entre 3,68 y 3,98. A partir de los recuentos microbianos rutinarios fue posible detectar la presencia de bacterias capaces de desarrollar en Agar YCG, un medio adecuado para detectar mohos y levaduras e inhibir el desarrollo bacteriano (por la presencia de 0,1 g/L de cloranfenicol). Estas bacterias resistentes a acidez (pH < 4) y a cloranfenicol resultaron bacilos cortos, móviles, agrupados en cadenas y diplos o aislados, catalasa (+) y gram negativas y se encontraban presentes en altos niveles en las muestras de yogur (10^6 – 5×10^7 UFC/g) (Fig. 4). Luego de su aislamiento y extracción del ADN, mediante amplificación (PCR) y posterior secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S, pudieron identificarse como pertenecientes al género *Gluconobacter* con un elevado grado de similitud (mayor a 97%).

Gluconobacter es un género integrante del grupo de las bacterias del ácido acético (BAA). Son bacilos acidófilos (resisten elevados valores de acidez), gram negativos, aerobios estrictos, estrechamente relacionados con la vida humana. Pertenecen a la familia *Acetobacteriaceae* que incluye actualmente

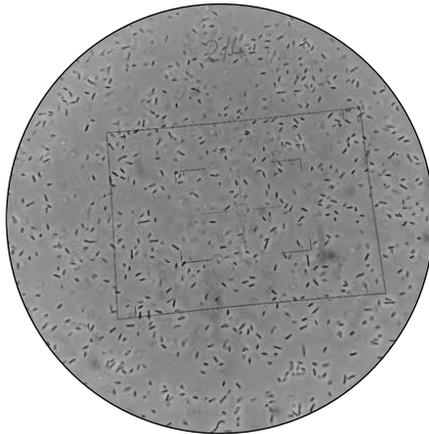


Figura 4. Observación microscópica (100x) de contraste de fases de *Gluconobacter* sp. aislado a partir de muestras de yogur alteradas

12 géneros, siendo *Gluconobacter* y *Acetobacter* los de mayor relevancia industrial. Naturalmente se encuentran en ambientes con alta disponibilidad de azúcares, como frutas, miel de abejas y flores, o en alimentos como bebidas (sidra, cerveza, vino o vinagre). Se caracterizan por la oxidación rápida e incompleta de una amplia gama de azúcares, alcoholes y ácidos (como D-glucosa, glicerol, D-sorbitol, etanol, ácido D-glucónico) a partir de la cual acumulan grandes cantidades de productos de oxidación en el medio de cultivo. Algunos ejemplos de este metabolismo son la producción de ácido acético a partir de etanol o ácido glucónico a partir de D-glucosa. La mayoría de las reacciones oxidativas son catalizadas por dehidrogenasas unidas a la membrana. Esto implica que el transporte de los sustratos al interior de la célula no es necesario y que la acumulación de productos de oxidación en el medio es muy rápida y casi cuantitativa. Por estas características metabólicas, las BAA se utilizan ampliamente en la industria alimentaria para aplicaciones como la producción de vinagre y la fermentación de granos de cacao. *Acetobacter aceti* es la especie más relevante, capaz de oxidar completamente el ácido acético a dióxido de carbono y agua. *Gluconobacter* participa en la producción de L-sorbosa a partir de D-sorbitol, ácido D-glucónico a partir de D-glucosa, y dihidroxiacetona a partir de glicerol. Sin embargo, su relevancia industrial se debe a la participación en la industria del vinagre, ya que produce grandes concentraciones de ácido acético a partir de etanol (Sengun y Karabiyikli, 2011; Saichana y col., 2015).

En ciertas regiones del Cáucaso se consume un yogur con baja acidez y una elevada viscosidad, que contiene cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc* sp. y *Gluconobacter* sp. o *Acetobacter orientalis* (Kiryu y col., 2009). Este yogur se fermenta artesanalmente a baja temperatura (25–30 °C) y, debido a su fácil forma de preparación, fue introducido en los últimos años en Japón para preparación y consumo doméstico, dando lugar al conocido como «Yogur del Mar Caspio» que ha logrado una rápida aceptación por parte de la población.

Debido a su metabolismo, las BAA son causantes de contaminación habituales en ciertos alimentos. Suelen estar presentes en la superficie de las frutas dañadas, lo que resulta en la rancidez de las mismas, la contaminación del vino y su consecuente deterioro, además de desencadenar otras reacciones adversas que contribuyen a pérdidas en la industria alimentaria. También pueden influir en la calidad de los alimentos como ingredientes causantes de alteraciones como rancidez en la cerveza y otras bebidas alcohólicas. El yogur es un alimento ancestralmente popular y su consumo ha aumentado en los últimos años debido principalmente a sus reconocidos beneficios para la salud. Sin embargo, el yogur contaminado con BAA puede causar grandes pérdidas a la industria. En esta matriz láctea, las

BAA pueden producir ácido acético principalmente al consumir los nutrientes del yogur y oxidar completamente el ácido acético a dióxido de carbono y agua. En consecuencia, pueden causar alteraciones significativas generando rancidez, decoloración, hinchazón del envase (por acumulación de CO₂) y sabores desagradables (Sengun y Karabiyikli, 2011; Zhou y col., 2017). Estas modificaciones se pusieron de manifiesto en las muestras analizadas, sin llegar a ponerse en evidencia la presencia de gas, posiblemente debido a que el ácido acético formado no llegó a oxidarse completamente.

Fuentes de contaminación

En yogur, una posible fuente de ingreso de BAA al proceso productivo son los ingredientes utilizados como frutas, que representan hábitat normal de estos microorganismos. De este modo, un adecuado control de las pulpas de frutas que se utilizan podría evitar serias pérdidas económicas.

Control y prevención

Si bien la presencia de BAA no representa una contaminación habitual en yogures, de estar presentes podrían proliferar debido a las características del ambiente que se genera en el alimento (acidez, presencia de oxígeno), por lo que su detección oportuna y efectiva en yogur durante la producción evita graves pérdidas económicas.

Conclusiones

Las alteraciones en yogur causadas por mohos gasógenos y bacterias del género *Gluconobacter* son eventos novedosos, al menos en la realidad argentina, vinculados a la diversidad microbiana que amenaza a los procesos y productos (leches fermentadas). En yogures, han sido siempre considerados como alterantes microbianos tradicionales las levaduras fermentadoras de lactosa, que producen cambios de aroma, sabor y aspecto. Sin embargo, en nuestros trabajos hemos demostrado que los defectos gasógenos pueden ser atribuidos también a mohos que probablemente provienen del ambiente, y que ciertos cambios de color y sabor pueden ser originados por la actividad de gluconobacterias, cuya fuente sea probablemente las frutas agregadas al yogur.

Referencias bibliográficas

- Buehler, A.J.; Martin, N.H.; Boor, K.J. y Wiedmann, M. (2018).** Evaluation of biopreservatives in Greek yogurt to inhibit yeast and mold spoilage and development of a yogurt spoilage predictive model. *Journal of Dairy Science*, 101, 1–16. doi:10.3168/jds.2018-15082
- Dijksterhuis, J. (2018).** Fungal spores: Highly variable and stress-resistant vehicles for distribution and spoilage. *Food Microbiology* (en prensa). Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.006>
- Foschino, R.; Garzaroli, C. y Ottogalli, G. (1993).** Microbial contaminants cause swelling and inward collapse of yoghurt packs. *Lait*, 73, 395–400. Recuperado de https://lait.dairy-journal.org/articles/lait/pdf/1993/04/lait_73_1993_4_37.pdf
- Garnier, L.; Valence, F. y Mounier, J. (2017a).** Review Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update. *Microorganisms*, 5(42), 1–33. doi:10.3390/microorganisms5030042
- Garnier, L.; Valence, F.; Pawtowski, A.; Auhustsinava-Galerie, L.; Frotté, N.; Baroncelli, R.; Deniel, F.; Cotona, E. y Mounier, J. (2017b).** Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *Journal of Food Microbiology International*, 241, 191–197.
- Gougouli, M. y Koutsoumanis, K.P. (2017).** Risk assessment of fungal spoilage: A case study of *Aspergillus niger* on yogurt. *Food Microbiology*, 65, 264–273. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.009>
- Gougouli, M.; Kalantzi, K.; Beletsiotis, E. y Koutsoumanis, K.P. (2011).** Development and application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in yoghurt production. *Food Microbiology*, 28, 1453–1462.
- Kiryu, T.; Kiso, T.; Nakano, H.; Ooe, K.; Kimura, T. y Murakami, H. (2009).** Involvement of *Acetobacter orientalis* in the production of lactobionic acid in Caucasian yogurt («Caspian Sea yogurt») in Japan. *Journal of Dairy Science*, 92, 25–34.
- Lazar, S.P.; Lukaszewicz, J.M.; Persad, K.A. y Reinhardt, J.F. (2014).** Rhinocerebral *Mucor circinelloides* infection in immunocompromised patient following yogurt ingestion. *Delaware medical journal*, 86(8), 245–248.
- Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (2009).** Fungi and Food Spoilage. 3rd Ed. London: Blackie Academic & Professional, 519.
- Russell R.; Paterson, M. y Lima, N. (2017).** Review Filamentous Fungal Human Pathogens from Food Emphasising *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucor*. *Microorganisms*, 5(44), 1–9. doi:10.3390
- Saichana, N.; Matsushita, K.; Adachi, O.; Frébort, I. y Frebortova, J. (2015).** Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 33, 1260–1271.
- Sengun, I. y Karabiyikli, S. (2011).** Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, 22, 647–656.
- Snyder, A.B. y Worobo, R.W. (2018).** Mini-Review Fungal Spoilage in Food Processing. *Journal of Food Protection*, 81(6), 1035–1040.
- Snyder, A.B.; Churey, J.J. y Worobo, R.W. (2016).** Characterization and control of *Mucor circinelloides* spoilage in yogurt. *International Journal of Food Microbiology*, 228, 14–21. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.008>
- Sørhaug, T. (2011).** Spoilage Molds in Dairy Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 4, 780–784.
- Vellanki, S.; Navarro-Mendoza, M.I.; García, A.E.; Murcia, L.; Perez-Arques, C.; Garre, V.; Nicolas, F.E. y Lee, S.C. (2018).** *Mucor circinelloides*: Growth, maintenance, and genetic manipulation. *Current Protocols in Microbiology* e53, 49, 1–19. doi: 10.1002/cpmc.53
- Zhou, W.; Zhang, Y.; Wang, S.; Li, Y.; Zhang, J.; Zhang, C.; Wang, Z. y Zhang, Z. (2017).** LAMP, PCR, and real-time PCR detection of *Acetobacter aceti* in yogurt. *Food Science and Biotechnology*, 26(1), 153–158.

Quesos

1. Análisis crítico de la influencia de las etapas de elaboración quesera sobre el rendimiento y la calidad del producto

Carlos Meinardi y Mario Candiotti

Principios de la transformación de la leche a queso: conceptos teóricos

El queso es uno de los alimentos más antiguos que se conoce. Si bien existen muchas historias acerca de su origen, puede decirse que este se remonta a unos 8 000 años durante la llamada «Revolución Agrícola», cuando el hombre, organizado en comunidades, aprende a domesticar y usufructuar ciertos animales y plantas en la zona del «Creciente Fértil», entre los ríos Tigris y Éufrates (actualmente Iraq), en donde esencialmente surge como una forma natural de preservación de los nutrientes de la leche (Fox, 2011).

Básicamente, la elaboración de un queso consiste en producir una concentración selectiva de los principales componentes de la leche (caseína y materia grasa) con el objeto de provocar una reducción en la actividad acuosa (a_w), que permita prolongar su conservación manteniendo sus cualidades nutricionales.

Según la tecnología empleada, estos componentes estarán acompañados por una parte más o menos importante de otros constituyentes de la leche, conformando una composición fisicoquímica estable dentro de los valores establecidos legalmente para cada tipo de queso.

Actualmente, en el mundo existe una enorme variedad de quesos cuyas diferencias radican, principalmente, en la naturaleza de la leche y la tecnología de elaboración empleada. Si bien algunos autores sugieren que han sido reconocidos más de 1000 tipos de quesos (Fox, 2011), este número se reduce cuando se consideran como criterios de clasificación el contenido de humedad, de materia grasa, los agentes coagulantes, las características reológicas o las variables tecnológicas y microbiológicas (Ottogalli, 2005).

Teniendo en cuenta que un queso es un producto concentrado y biológicamente activo, en su interior tendrá lugar un complejo proceso conocido como maduración, que modificará sus características fisicoquímicas y organolépticas para transformarse en un alimento que, además de poseer cualidades nutritivas excepcionales, presenta sabores y aromas agradables que hacen placentero su consumo. Dada su importancia, la evolución de las transformaciones bioquímicas que intervienen en la maduración es muy estudiada, pudiéndose encontrar muchos trabajos importantes al respecto (Cuffia y col., 2015; Fox y col., 2017a).

Por sus características, el queso es un alimento que contribuye a satisfacer una parte importante de la demanda diaria de vitaminas y minerales (calcio, fósforo, etc.) como también de nutrientes, especialmente por sus proteínas de alto valor biológico (Eck et Gillis, 2003). En este sentido, según un reciente informe presentado por la Dirección de Industria Alimentaria y Agroindustrias del Ministerio de Producción de la Nación, el queso es considerado un producto que responde perfectamente a las modernas tendencias del consumo debido a que:

- Es un alimento saludable y completo por cuanto, además de su valor proteico, posee un nivel de grasa aceptable y es fuente de calcio, fósforo, vitaminas A, B y D.
- Puede consumirse en forma directa o como ingrediente de diferentes tipos de alimentos, donde encuentra múltiples aplicaciones.
- Sus características organolépticas resultan sumamente agradables al consumidor.

Indudablemente, la inmensa gama de variedades de queso existente, como así también su amplia diversidad de empleos posibles, han transformado a estos productos en uno de los alimentos más versátiles y de mayor difusión a escala global, tal como lo demuestra el sostenido aumento en su ingesta, que actualmente se verifica tanto en los países desarrollados como en los denominados «en vías de desarrollo», a lo que se suma su creciente integración en las culturas orientales como parte del fenómeno de «occidentalización» de la dieta y el auge de las comidas rápidas (Schaller, 2009).

Etapas básicas

A nivel industrial, la fabricación de la mayoría de los quesos comprende una serie de etapas que son comunes a cualquier tecnología. Sin embargo, las variaciones en una o más de estas etapas durante la elaboración, produce quesos con diferentes texturas y características organolépticas.

1. Pretratamiento de la leche

Es la primera etapa que se realiza en la planta elaboradora y consiste en un tratamiento térmico y una estandarización de la composición (ajuste de la relación grasa/proteína requerida según el tipo de queso).

2. Pasteurización

Es un tratamiento térmico en el que la leche se somete a una determinada temperatura durante un cierto tiempo, a los efectos de destruir la totalidad de los microorganismos patógenos eventualmente presentes, alterando lo menos posible la estructura física y química del resto de los componentes. Empero, dado que también se reduce la carga microbiana total, la pasteurización permite utilizar leches con elevados recuentos que, de otra manera, podrían afectar la calidad de los quesos elaborados a partir de estas. Aun cuando en el mundo se elaboran quesos con leche cruda, reconocidos por su calidad y tradición, especialmente en Europa (Gunasekaran y Ak, 2003), en nuestro país la reglamentación vigente (CAA art. 605) permite utilizar leche sin pasteurizar sólo cuando los quesos son madurados por más de 60 días a una temperatura superior a los 5°C. Por ende, para aquellos quesos cuyo período de maduración es menor al referido, es obligatorio implementar una higienización y pasteurización de la leche a fin de garantizar la inocuidad del producto.

La industria mediana y grande emplea el sistema de pasteurización conocido como de alta temperatura/corto tiempo o HTST (acrónimo del inglés High Temperature/Short Time) en el que, mediante un Intercambiador de Calor a Placas, la leche se trata a 73–75°C durante 15 s. Por el contrario, tanto en las pequeñas industrias como en los establecimientos artesanales, aún se utiliza una pasteurización baja o discontinua o STLT (acrónimo del inglés Low Temperature/Long Time), donde la leche se calienta en la misma tina de elaboración a 63°C durante 30 minutos manteniendo una agitación constante y luego se enfría hasta la temperatura de coagulación. En este caso, es primordial evitar la formación de espuma dado que ésta siempre se encuentra a menor temperatura que el líquido y, por lo tanto, los gérmenes patógenos que pudiese contener no serán destruidos. Cabe aclarar que la espuma apa-

rece como consecuencia de la incorporación de aire en la leche, que propician el bombeo (en la zona de succión) y la agitación. Por otro lado, teniendo en cuenta que las bacterias lácticas son microaerofilicas, una leche saturada de aire disuelto retardará el desarrollo del fermento, lo cual facilitará el desarrollo de microorganismos aeróbicos, que podrían afectar la calidad del producto.

La pasteurización es fundamental cuando la leche es de calidad microbiológica dudosa o el tiempo de almacenamiento de la misma a baja temperatura, previo a su industrialización, es mayor a 48 h (Gauna, 2005). No obstante, debe tenerse en cuenta que aunque la pasteurización de la leche destruye parcialmente la microflora nativa, lo cual mejora su calidad microbiológica, también afecta ciertas características fisicoquímicas que tienen un impacto directo en su aptitud quesera. En efecto, se ha comprobado que con una leche pasteurizada, además de producirse un incremento en el tiempo de coagulación, se obtienen coágulos con menor dureza y mayor retención de suero. Asimismo, mediante este tratamiento se inactivan, parcial o totalmente, ciertas enzimas propias de la leche que son cruciales en la fabricación de quesos con Denominación de Origen Controlada (DOC) como, por ejemplo, la lipoproteína lipasa por lo que, en estos casos, siempre se emplea leche sin pasteurizar (Fox y col., 2017b).

2.1. Tratamiento térmico superior a la pasteurización

Si bien se sabe que el calentamiento de la leche a temperaturas superiores a la de pasteurización baja (63 °C) afecta su calidad casearia (incrementa el tiempo de coagulación, disminuye la consistencia del coágulo y dificulta su desuerado) es una metodología empleada para acrecentar el rendimiento en quesos frescos y semicocidos sin ojos. Esto se debe a que, con el calentamiento, se desnaturalizan las proteínas mayoritarias del suero (β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina) lo cual promueve su acomplejamiento con la κ -caseína a través de uniones disulfuro e interacciones hidrofóbicas. De este modo, en el proceso de coagulación, estas proteínas quedan incorporadas a la cuajada y, por ende, al queso (Candioti y col., 2004). Estudios realizados en el INLAIN indican que un calentamiento a 85 °C durante 2 minutos es suficiente para retener en la cuajada más del 80% de las proteínas del suero, lo que sumado a una mayor fijación de agua permite obtener un rendimiento quesero (kg de queso/100 L de leche) sensiblemente mayor (Meinardi y col., 2004/2005). No obstante, cabe destacar que tratamientos térmicos más intensos resultan innecesarios por cuanto provocan un mayor daño térmico sin incrementos significativos en el rendimiento (Meinardi y col., 2004). Sin embargo, dado que estos tratamientos afectan la aptitud casearia de la leche, tras numerosas experiencias basadas en la evaluación de los parámetros lactodinamográficos (medidos con un equipo Formagraph)

se comprobó que una acidificación a pH 6,4, conjuntamente con la adición de 0,6 g^l⁻¹ de cloruro de calcio previo a la adición del cuajo, permite restablecer el tiempo de coagulación de una leche tratada, aunque su período de desuerado en la tina supera sensiblemente al de una leche correctamente pasteurizada.

Complementariamente, en el marco de una tesis de magister se estudió la incidencia de distintas variables sobre las características de quesos Cremoso, entre las que se incluyó un tratamiento térmico a 85 °C por 2 min (Pedro, 2012). Se elaboraron tres quesos: Testigo, con leche pasteurizada (65 °C por 20 min) y tecnología estándar, Experimental I, con leche pasteurizada y acidificada con glucono-delta-lactona (GDL), cuya hidrólisis causa un descenso de pH asimilable al producido por las bacterias lácticas (Candiotti y col., 2004), y Experimental II, con leche tratada a 85 °C por 2 min y también acidificada con GDL. Los parámetros analizados fueron: acidez inicial de la leche de elaboración, concentración del ion calcio (Ca²⁺) en los sueros de elaboración y en los quesos al final de la maduración, fósforo y humedad en los quesos, y rendimiento quesero.

En la Tabla 1 se presenta un resumen de los principales resultados alcanzados a través de estas experiencias.

Como puede verse, las leches empleadas para la elaboración de los quesos Experimentales (acidificadas con GDL) exhibieron valores de pH de aproximadamente 0,3 unidades menos que en los Testigo. Esta mayor acidificación de la leche de los quesos Experimentales produjo una desmineralización de la caseína, la cual dio lugar a una mayor solubilización de Ca²⁺,

Tabla 1. Incidencia de la acidez inicial de la leche y el efecto de un tratamiento térmico superior a la pasteurización, en la concentración del ion calcio (Ca²⁺) en el suero de elaboración, la concentración de calcio y fósforo en el queso y en el rendimiento quesero, en quesos Cremoso

	Tipo de queso		
	Testigo	Experimental I	Experimental II
Tratamiento térmico	65 °C x 20 min	65 °C x 20 min	85 °C x 2 min
Cloruro de Calcio (Cl₂Ca) (g/l)	0,4	0,4	0,4
Agregados	Sin agregados	1 g/l de GDL	1 g/l de GDL
pH de la leche en tina¹	6,48 ± 0,04	6,18 ± 0,04	6,19 ± 0,01
Calcio en suero (ppm)¹	155,9 ± 4	219,7 ± 6	204,3 ± 7
Calcio en queso (ppm)¹	1282,8 ± 16	1188 ± 144	903,5 ± 103
Rendimiento quesero % (p/v)¹	14,6 ± 0,1	13,1 ± 0,4	18,6 ± 0,6
Humedad de los quesos % (p/p)¹	55,4 ± 1,1	55,8 ± 1,6	62,8 ± 0,56
Fósforo en el queso (ppm)¹	825,8 ± 62	797,3 ± 73	689,4 ± 73

¹ Valores medios ± desviación estándar de 4 determinaciones

incrementando su concentración en el suero, y reduciéndola en el queso, sin afectar su tenor de fósforo. Sin embargo, en los quesos Experimentales II, el contenido de calcio se ve reducido aún más debido a la formación de fosfato tricálcico (conocido como piedra de leche) que se precipita sobre la superficie calefactora.

Por otro lado, y como era de esperar, los quesos elaborados con la leche tratada a 85 °C durante 2 min arrojaron el mayor rendimiento.

3. Estandarización fisicoquímica

Básicamente, esta etapa consiste en reducir el contenido de materia grasa de la leche mediante centrifugación, a los efectos de ajustar su relación grasa/proteína de acuerdo con el tipo de queso a elaborar. En plantas pequeñas, donde la pasteurización (STLT) se realiza directamente en la tina, la estandarización se efectúa en una etapa previa a la misma. Por el contrario, en plantas de mayor envergadura donde se emplea la pasteurización continua (HTST), esta operación está integrada al pasteurizador.

Es importante aclarar que esta práctica, habitualmente no se emplea cuando se elaboran quesos con leche de oveja, cabra y búfala entre otras (Mahaut y col., 2003).

Cabe señalar que existen países en los que está permitido estandarizar la relación grasa/proteína mediante agregando leche en polvo descremada en la tina de elaboración, aunque no es algo muy difundido.

4. La leche en la tina

4.1. Agregados a la leche de elaboración

Una vez que la leche se encuentra en la tina, ya pasteurizada y previo a producir su coagulación, es necesario adicionar determinados componentes que se deben mezclar íntimamente, para lo cual se requiere mantener una adecuada agitación que garantice una uniformidad en su concentración. Los componentes primarios a agregar son:

4.1.1. Cloruro de calcio

La incorporación de cloruro de calcio (CaCl_2) en la leche de elaboración de quesos, modifica dos parámetros tecnológicos fundamentales: el tiempo de coagulación y la velocidad de desuerado de la cuajada (Scott, 2002). Esto se debe a que su agregado provoca un descenso de pH que favorece la fase primaria de coagulación (el coagulante incrementa su actividad enzimática) mientras que el ion calcio favorece la fase secundaria de la coagulación (Fox, 2015). Por otro lado, se le atribuye al calcio un incremento en la dureza del queso y la presencia de sabores amargos cuando su concentración es excesiva

(Fox, 2017c). Si bien en países como Francia e Italia, entre otros, el agregado de CaCl_2 está prohibido, en nuestro país el CAA admite el agregado de 0,2 g de CaCl_2/l . A pesar de ello, la concentración utilizada es diferente en cada empresa e incluso puede variar según el tipo de queso.

En general, existe poca información disponible acerca de cómo influye el agregado de CaCl_2 en la concentración de calcio de los quesos. Con la intención de aportar datos fidedignos, en la planta piloto del INLAIN se estudió el efecto del agregado del mismo en la tecnología del queso Cremoso, el cual representa la variedad de queso de mayor producción y consumo en nuestro país, y cuyas características se describen en el Código Alimentario Argentino (CAA Art. 622). Para estas experiencias se empleó como coagulante, renina producida por fermentación en polvo (Maxiren, GistBrocades, Francia) disuelta en buffer pH 5,5. Para estandarizar las condiciones operativas en todas las experiencias, la cantidad a agregar se determinó a partir del análisis lactodinamográfico en el que se evaluó el parámetro $r+k_{10}$ mediante un equipo Formagraph, según la metodología descripta por Meinardi y col. (2002).

En la Tabla 2 se puede apreciar el efecto del agregado de distintas concentraciones de Cl_2Ca : sin agregado (Testigo), 0,4 g/l (Experimental I), 0,8 g/l (Experimental II), sobre el pH de la leche de elaboración, la concentración del ion calcio (Ca^{2+}) en el suero residual y en el queso, fósforo en el queso, humedad y rendimiento quesero.

Tabla 2. Incidencia de la concentración de CaCl_2 en el pH de la leche, la concentración del ion calcio (Ca^{2+}) en el suero de elaboración, la concentración de Ca^{2+} y fósforo en quesos, y en el rendimiento quesero en quesos Cremoso (Pedro, 2012)

	Tipo de queso		
	Testigo	Experimental I	Experimental II
Cloruro de Calcio (Cl_2Ca)	Sin agregado	0,4 g/l	0,8 g/l
pH de la leche en tina¹	6,54 ± 0,01 _a	6,48 ± 0,04 _b	6,39 ± 0,02 _c
Calcio en suero (ppm)¹	116,3 ± 4 _a	155,9 ± 4 _b	197,8 ± 6 _c
Calcio en queso (ppm)¹	1198,5 ± 45 _a	1282,8 ± 16 _b	1241,6 ± 42 _c
Rendimiento quesero % (p/v)¹	14,4 ± 0,8 _a	14,6 ± 0,1 _a	14,7 ± 0,2 _a
Humedad de los quesos (p/p)¹	56,1 ± 1,5 _a	55,4 ± 1,1 _a	55,3 ± 0,7 _a
Fósforo en el queso (ppm)¹	786,5 ± 122 _a	825,8 ± 62 _b	823,9 ± 51 _c

¹ Valores medios ± desviación estándar de 4 determinaciones

Subíndices con letras iguales en el mismo renglón significa que los valores son estadísticamente iguales ($P < 0,05$).

Como era de esperar, la adición de una mayor concentración de CaCl_2 a la leche de elaboración (queso Experimental II) dio lugar a una reducción en su pH y un incremento significativamente diferente ($P < 0,05$) en la concentración de Ca^{2+} en el suero. Por otro lado, se pudo comprobar que el agregado de CaCl_2 a la leche de elaboración tuvo un impacto favorable sobre el tiempo de coagulación, la consistencia del coágulo, la velocidad de desuerado en tina y el contenido de calcio en los quesos. Sin embargo, teniendo en cuenta que no se detectaron diferencias estadísticas en el rendimiento ni en la humedad de los quesos, se concluyó que una adición de CaCl_2 a la leche de elaboración mayor a $0,4 \text{ g l}^{-1}$, no incide en las características del producto y el exceso de calcio se elimina con el suero.

4.1.2. Fermentos primarios y secundarios

Los fermentos lácticos primarios o iniciadores (también conocidos como *starters*) son cultivos de bacterias lácticas con diferentes funciones según su aplicación tecnológica. Su objetivo es «ganar el medio», es decir, convertirse en la flora dominante en los primeros estadios fases del proceso, orientándolo en la dirección precisa.

Mediante la incorporación de fermentos se logra repoblar una leche pasteurizada con microorganismos que posean características tecnológicas específicas. Estas bacterias, que se multiplican en la tina y durante el prensado, cumplen con dos funciones esenciales:

- a) Disminuir el pH del medio a una velocidad y nivel determinados, a partir de la metabolización de la lactosa con producción de ácido láctico.
- b) Contribuir al desarrollo de las características organolépticas del queso, liberando enzimas que participan directa o indirectamente en el proceso de maduración.

Por lo tanto, el tipo de fermento a agregar dependerá siempre de la variedad de queso a elaborar (Hynes y col., 2006).

Si bien en las cuajadas enzimáticas, es decir, aquellas en las que prevalece la acción del coagulante, la acidificación incide poco sobre los parámetros de coagulación de la leche y la sinéresis del coágulo en la tina, influye sensiblemente en las etapas de moldeo y prensado de los quesos. Es importante tener en cuenta que, tanto la velocidad e intensidad de la acidificación como la sinéresis del coágulo, influyen fuertemente en el estado de mineralización de la cuajada y, consecuentemente, determinan las características de la masa del queso al final de la maduración.

Los fermentos pueden ser naturales o seleccionados.

Los fermentos naturales son:

- Leche fermento: se prepara a partir de leche cruda en la cual, mediante un tratamiento térmico (de igual o menor intensidad que una pasteurización STLT), se produce una selección de su microflora nativa que da lugar a una prevalencia de estreptococos termófilos. Se presenta como un líquido homogéneo con una acidez Dornic de 45–55 °D y un pH que puede oscilar entre 4,60 y 4,90.

- Suero fermento: se obtiene utilizando el suero remanente de una elaboración casearia, por lo que sus características dependen de los parámetros tecnológicos adoptados para la misma (por lo general, para quesos de pasta cocida). Normalmente, se presenta como un líquido homogéneo, con línea de crema y ausencia de espuma, donde predomina una flora microbiana compuesta por lactobacilos que conduce a una acidez Dornic de 135 a 150 °D y un pH de 3,20 a 3,40 (Mucchetti y col., 1998; Mahaut y col., 2003).

Al margen de su bajo costo, los fermentos naturales presentan la ventaja de estar constituidos por una compleja y variada microflora que, además de conferirles una elevada resistencia a los ataques fágicos, permite que durante la maduración del queso se desarrollen los sabores y aromas que los caracterizan y que son típicos de la región (Hynes y col., 2006).

La principal desventaja que presentan los fermentos naturales es su variabilidad composicional, la cual puede alterar su comportamiento tanto en la tina de elaboración como a nivel tecnológico. Si bien estas irregularidades no afectan a las elaboraciones artesanales ni a las pequeñas o medianas empresas, sí pueden ocasionar muchas dificultades en las plantas grandes que implementen una mínima automatización.

Los fermentos seleccionados están diseñados a partir de cepas de microorganismos perfectamente identificados, cuyas características tecnológicas, principalmente su velocidad de acidificación, están bien definidas.

Estos fermentos pueden ser:

- Semidirectos: están constituidos por cepas de probada idoneidad, desarrolladas en leche descremada o en un medio de cultivo adecuado. Se presentan como un líquido homogéneo, con una acidez Dornic que puede ir desde 45 a 90 °D y un pH de entre 3,90 y 4,90. Al igual que los fermentos naturales, además de los microorganismos, aportan ácido láctico que acidifica a la leche y favorece la coagulación.

- Concentrados o de adición directa en tina: si bien estos fermentos también están compuestos por microorganismos específicos, a diferencia de los anteriores no contienen ácido láctico. Se los comercializa liofilizados y se presentan como un polvo más o menos granulado (que se disuelve

en leche antes de incorporarlo a la tina) o bien congelados, en forma de sólido granulado (que se agrega directamente a la tina para su rápido descongelamiento).

En la elaboración de ciertos tipos de quesos, además de los fermentos lácticos primarios, también pueden incluirse los fermentos conocidos como secundarios. Estos consisten en cultivos de microorganismos que se adicionan a la leche conjuntamente con el starter con el fin de desarrollar en el queso características particulares, por ejemplo, mohos en quesos azules, bacterias propiónicas en quesos con ojos, etcétera.

4.1.3. *Aditivos*

En su artículo 605, ítem c, el CAA, detalla los siguientes aditivos:

- *Nitrato de sodio o de potasio*: se utiliza como conservante, solo o combinado, hasta una cantidad de 50 mg/kg de queso. Su uso está restringido a quesos de mediana y baja humedad. Si bien en nuestro país, históricamente se utilizó en la elaboración de quesos duros (0,1 g $\text{NO}_3\text{Na}\cdot\text{l}^{-1}$ leche), a partir de la industrialización del suero para obtener concentrados proteicos o WPC (acrónimo del inglés Whey Protein Concentrate), su empleo prácticamente ha caído en desuso.

- *Colorantes*: el agregado de colorantes es una práctica permitida por el CAA y de mucha difusión en nuestro país. Se los usa prácticamente en todos los quesos, en distintas concentraciones según el criterio del productor, dado que además de cubrir eventuales defectos de color en la masa, responde a la preferencia del consumidor por los quesos ligeramente amarillentos. Sin embargo, cabe mencionar que actualmente los compradores de WPC están cuestionando la presencia de colorantes debido a que se les atribuyen efectos alergénicos.

4.1.4. *Coagulante*

Los coagulantes son preparaciones de enzimas proteolíticas de diverso origen, que tienen la capacidad de coagular la leche y que han sido utilizadas en la industria quesera por miles de años. Entre los más difundidos se encuentran:

- *Cuajo de Ternero Mamón (CTM)*: se lo extrae del abomaso (estómago verdadero de los rumiantes) de terneros que se alimentan con leche (lactantes o mamones). Comprende un conjunto de enzimas pertenecientes al grupo de las aspartatoproteinasas: quimosina (antiguamente llamada renina), A y B; pepsina, A y B y Gastricina. La quimosina, enzima específica para la coagulación de la leche vacuna, es la predominante (representa más del 80% del total).

- Cuajo de Bovino Adulto (CBA): se lo extrae del abomaso del bovino adulto. A diferencia del anterior, en este caso, la enzima predominante es la pepsina bovina (constituye más del 80 % del total). Este coagulante, que ingresó al mercado como una alternativa interesante frente a la escasez y el incremento de los costos del CTM, propició el crecimiento de la industria quesera en nuestro país.

- Coagulantes de origen microbiano (CM): paralelamente al desarrollo del CBA, Estados Unidos, a través de la industria fermentativa logró producir proteasas capaces de reemplazar a los coagulantes bovinos. En este sentido, las enzimas que más se asemejaron a las obtenidas a partir del abomaso, fueron de origen fúngico, básicamente proveniente de tres especies de mohos: *Endothia parasitica*, *Mucor pussillus* y *Mucor miehei*, siendo esta última la de mayor difusión.

- Quimosinas producidas por fermentación (RPF): el rol preponderante que cumple el cuajo de ternero mamón indujo a los científicos a emplear técnicas de ingeniería genética para obtener quimosina la cual, como ya se mencionó, es su principal enzima. Por consiguiente, a partir de 1988 ingresó al mercado un nuevo grupo de coagulantes obtenidos mediante microorganismos genéticamente modificados, conocidos comercialmente como quimosinas producidas por fermentación. Básicamente, el gen que codifica la producción de pro-quimosina bovina tipo B (aislado del cuarto estómago de un ternero mamón) se implanta en el genoma de una levadura como *Kluyveromyces lactis* o de mohos tales como *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*. La enzima se sintetiza en forma de pro-quimosina, que se activa tras el lisado de las células una vez detenida la fermentación. No obstante, si bien la cadena polipeptídica obtenida por esta vía es evidentemente idéntica a la de la quimosina bovina, la glicosilación de la misma es distinta.

Si bien algunos países, como EE. UU., aceptaron rápidamente esta alternativa, otros, como Francia y Alemania, no permitieron su uso y en algunos, como Italia, pese a haberse aprobado su comercialización, no se utiliza. Obviamente, en los quesos con Denominación de Origen no se admite el reemplazo de CTM por las RPF.

Por otro lado, cabe mencionar que la irrupción de las RPF en los EE. UU. bajó el precio internacional de CTM y hoy, el ahorro que significa pasar de un CTM a una RPF, difícilmente compense los cambios que se deben realizar en las tecnologías para mantener la calidad de los productos.

- Cuajo animal en pasta: este tipo de producto, muy difundido en Europa, es generalmente preparado por los maestros queseros en forma artesanal, a partir de estómagos de cabrito o cordero. Posee una composición enzimática ampliamente variable por cuanto la misma se ve afectada por la edad del

animal, tipo de alimentación, métodos de extracción, manipulación, conservación, etc., lo cual, indudablemente, condiciona mucho su actividad coagulante (Moschopoulou, 2011). Sin embargo, la presencia de ciertas lipasas que se suman a las enzimas proteolíticas durante la maduración del queso, generan ácidos grasos libres (principalmente de cadena corta) que aportan al queso un característico sabor picante (Castillo y col., 2007).

En general, los cuajos de cabra u oveja son tradicionalmente utilizados en países del sureste europeo para la fabricación de quesos en los que se emplea la misma leche de dichas especies, bajo denominación de origen como, por ejemplo, Idiazabal y Roncal en España; Pecorino Romano, Provolone picante, Fiore Sardo y Canestrato Pugliese en Italia y queso Feta en Grecia (Moschopoulou, 2011).

- Coagulantes de origen vegetal: son preparaciones que se obtienen a partir de diversas plantas, tales como higuera, papaya y cardo entre otras. La principal característica de estos coagulantes es su elevada actividad proteolítica, la cual, si bien puede producir problemas tecnológicos en muchas variedades de quesos, contribuye a la tipicidad de otras, en particular, originarias de Portugal.

Es importante destacar que, más allá de su procedencia, durante el proceso de elaboración, los coagulantes RTM, RPF y los CM exhiben un comportamiento muy semejante. Es decir que, frente a pequeñas variaciones del pH inicial de la leche, presentan la misma actividad, dando para iguales tiempos de coagulación los mismos intervalos de lirado, sinéresis y desuerado. Sin embargo, si se comparan los tres coagulantes antes mencionados con el CBA, se encuentra que este último es más sensible al calor, más proteolítico y más afectado por el pH de la leche. En efecto, se ha observado que el CBA presenta cierta dificultad para coagular leches sin acidez desarrollada (adicionadas de fermentos directos) y que, a igual tiempo de coagulación, sus cuajadas endurecen más lentamente que las obtenidas con CTM.

En la elaboración de suero fermento, al incubarse a 45°C el suero obtenido de una elaboración de queso duro (cocido a 52°C), se comprobó que cuando se emplea CBA se alcanzaba una acidez de $140 \pm 5^{\circ}\text{D}$ en 20 horas mientras que, en idénticas condiciones pero utilizando RPF, los sueros fermentos obtenidos presentaron niveles de acidez inferiores, que en algunos casos no llegaban al valor mínimo recomendado (130°D) para este tipo de fermento (Meinardi y col., 2002).

5. Coagulación

Es una de las etapas más importantes en el proceso de elaboración del queso. Básicamente, consiste en la floculación de las micelas de caseína que se unen

formando una red tridimensional o gel que retiene el suero, los microorganismos del fermento, los gérmenes que resistieron la pasteurización y los glóbulos grasos.

Para lograr una mejor interpretación de este fenómeno, conviene revisar brevemente la forma en que se encuentran naturalmente las caseínas en la leche. La fracción caseínica es un complejo compuesto por cuatro tipos de proteínas conocidas como caseínas α_{s1} , α_{s2} , β y κ , las cuales se distribuyen en una proporción aproximada 3:1:3:1 respectivamente (Fox y McSweeney, 1998). Dado que las tres primeras son sensibles a los iones Ca^{+2} (naturalmente presentes en la fase acuosa de la leche), a diferencia de la κ -caseína que no lo es, en su estado nativo estas proteínas se encuentran organizadas en micelas (partículas coloidales, esféricas y voluminosas) cuyos diámetros pueden ir desde 20 a 300 nm, lo cual asegura su estabilidad (Horne, 2011). Estos agregados son porosos, poseen un alto grado de hidratación (aproximadamente 2 g H_2O /g de proteína), e incluyen una importante carga mineral conocida comúnmente como fosfato de calcio coloidal (CCP) y constituida principalmente por calcio, fosfato, magnesio, citrato y otros compuestos en cantidad traza (Fox y McSweeney, 1998; De Kruif y Holt, 2003).

El proceso de coagulación ocurre debido a la modificación que sufren las micelas de caseínas por acción del coagulante, el cual produce una proteólisis limitada sobre la caseína κ , dando como resultado para-caseína y un péptido, denominado caseinomacropéptido (CMP). Esto se conoce como Fase primaria. Bajo estas condiciones, las micelas pierden su manto de hidratación (primera deshidratación) y desaparece el efecto protector hacia los iones Ca^{+2} ejercido por la caseína κ sobre el resto de las caseínas. Consecuentemente, las micelas comienzan a agregarse espontáneamente, dando como resultado un gel que abarca la totalidad del volumen reaccionante, en el cual el suero queda retenido en grandes y pequeños poros extramicelares y también ligado a las micelas.

Los factores que influyen en esta etapa son el pH de la leche, la temperatura, la dosis y tipo de coagulante, el contenido de calcio iónico, la composición en caseína, la dimensión de las micelas y los tratamientos previos de la leche (Meinardi y col., 2002; Fox, 2011).

Por otro lado, se ha demostrado que cuanto mayor es la acidez de la leche, mayor es la cantidad de coagulante que se retiene en la cuajada (Fox y col., 2017a).

Como ya se mencionó, si bien las enzimas coagulantes pueden tener distinto origen, las más difundidas son el cuajo bovino, quimosina recombinante y cuajo microbiano, especialmente en quesos madurados o frescos (Fox, 2011).

6. Tratamiento del coágulo

Consiste en realizar una serie de operaciones cuyo objetivo es intervenir en la sinéresis y el desuerado del coágulo, a fin de obtener una cuajada con un determinado contenido de humedad. Los tiempos y la intensidad con que se apliquen estos tratamientos dependerán de las distintas variantes tecnológicas, que son las que definen la humedad de la cuajada y su pH. Puesto que estos factores intervienen en el crecimiento microbiano y desarrollo de las reacciones enzimáticas y bioquímicas durante el transcurso de la maduración serán los que, en última instancia, determinen las características del producto resultante. Estas operaciones son:

6.1. Corte o lirado de la cuajada

El objetivo principal del corte o lirado es incrementar la superficie de desuerado para facilitar la eliminación de la fase líquida de la misma. Esta operación debe realizarse cuando la cuajada ha adquirido la consistencia adecuada a los efectos de provocar la menor pérdida de materia grasa posible y minimizar la formación de «finos de cuajada» que se depositan en el fondo de la tina de quesería y se pierden con el lactosuero, lo que reduce el rendimiento.

De este modo, cortando la cuajada hasta obtener un tamaño de grano uniforme y adecuado al tipo de queso, se logra una óptima evacuación del suero intragranular e intergranular. En la elaboración de quesos de mediana y baja humedad, cuando los granos de cuajada han adquirido una cierta consistencia, se realiza un segundo lirado para ajustar su tamaño al tipo de queso a elaborar.

Debe tenerse en cuenta que a partir de esta etapa del proceso de elaboración, también se comienza a definir la textura del producto final dado que, cuanto más finamente se divida la cuajada, mayor será el desuerado, lo cual afecta directamente sus propiedades reológicas y, por ende, la estructura de la matriz donde se producirán los complejos eventos de la maduración (Grundelius y col., 2000).

6.2. Agitación

Cuando el grano ha alcanzado el tamaño adecuado, se comienza una agitación continua que tiene por objetivos:

- Conservar la individualidad de los granos manteniendo libre su superficie, principalmente cuando se trata de cuajadas con una mínima acidificación en la tina, en las que su mayor nivel de mineralización favorece la agregación de los mismos.

- Facilitar el desuerado a través de los impactos que sufren los granos de cuajada entre sí.
- Mejorar la transferencia de calor durante el calentamiento de la cuajada.
- Incrementar la velocidad del suero entre los granos de cuajada para mejorar la evacuación de suero por efecto Venturi.

7. Cocción

En los quesos de pasta cocida o semicocida, se denomina «cocción» a la etapa en que los granos de cuajada, suspendidos en el suero mediante agitación, comienzan a calentarse suavemente a los efectos de favorecer la sinéresis y, consecuentemente, disminuir su grado de hidratación. Dado que, tanto la velocidad de calentamiento como la temperatura a la cual se realiza la cocción son factores determinantes del desuerado, ambos deben ser cuidadosamente controlados durante el proceso de fabricación (Lucey, 2011).

Entre los principales efectos vinculados a la temperatura de cocción, se pueden mencionar: facilita la sinéresis (aumenta la contracción del gel), regula la acidificación, disminuye la viscosidad del suero, controla el desarrollo de las bacterias lácticas mesófilas e inactiva total o parcialmente el cuajo residual en el queso. Por ejemplo, un aumento de entre 2 y 9 °C por encima de la temperatura de coagulación favorece el desuerado en la tina y restringe la producción de ácido láctico hacia el final de la acidificación dado que al reducirse el contenido de lactosa, esta pasa a ser un reactivo limitante durante la acidificación de la cuajada, a partir de lo cual se puede obtener un queso más mineralizado (Eck y Gillis, 2003). Sin embargo, es importante aclarar que cuando se trabaja por encima de 48 °C, la velocidad de calefacción no tiene efecto sobre el desuerado en tina.

La intensidad del tratamiento de cocción depende del tipo de queso a elaborar. En términos generales se tiene:

- Quesos de alta humedad (Cremoso): se coagula a 38 – 40 °C y el secado del grano se realiza con agitación y sin calentamiento.
- Quesos de mediana humedad: la cocción se realiza a temperaturas entre 42 y 47 °C, según el criterio del quesero.
- Quesos de baja humedad: se calientan hasta 42 – 44 °C y se mantiene hasta lograr el grado de secado correcto y luego se lleva rápidamente a 50 – 53 °C.

8. Prensado

8.1. Prensado bajo suero y moldeo

Alcanzado el nivel de secado requerido para la cuajada en la tina, la mezcla suero y cuajada se descarga por gravedad o bombeo a una desueradora de pre-prensado, procurándose que la masa quede perfectamente distri-

buida y permanentemente cubierta de suero tratando de evitar en todo momento la oclusión de aire y/o espuma en su interior. Es importante que no quede ninguna burbuja de aire para que la unión de los granos sea adecuada, condición esencial para la obtención de una pasta cerrada y sin agujeros mecánicos.

Luego se colocan planchas de acero inoxidable perforadas sobre la superficie de la masa inundada y se aplica presión sobre ellas por medio de pistones neumáticos. El tiempo de prensado bajo suero varía de 20 a 30 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se procede al corte y moldeo respetando el concepto de un bloque de masa por molde utilizado. Esta operación debe realizarse con la celeridad necesaria para evitar en todo momento, el enfriamiento de la masa.

En la quesería artesanal, donde se trabaja con bajos volúmenes y el grado de tecnificación es limitado, el prensado bajo suero se realiza en la misma tina. Para ello, suspendida la agitación, se permite que la cuajada decante en el fondo de la tina, donde se la deja unos 20 a 30 minutos para que se compacte. Seguidamente, la cuajada se pesca por medio de una tela y se la deposita sobre la mesa de moldeo, donde se la divide en porciones del tamaño adecuado para ser colocadas en el molde.

8.2. Prensado en molde

Esta operación tiene como objetivo completar el desuerado. Cumple una doble función, dado que fuerza la salida del suero intergranular y del posible aire ocluido, lo cual, conjuntamente con el descenso del pH, asegura una correcta cohesión de los granos que confiere al queso su forma definitiva. Debe tenerse en cuenta que si el prensado resulta excesivo, se obturarán las perforaciones del molde, impidiendo la salida del suero; mientras que si el prensado es insuficiente, no se ejercerá la presión necesaria para expulsar el suero que se encuentra a nivel intergranular. En ambos casos, la retención del suero provocará una acidificación excesiva de la cuajada que dará un queso con pH demasiado bajo al momento del desmolde.

9. Acidificación en molde

Como ya se mencionó, el nivel de desuerado es crucial para controlar el grado de acidificación en el molde por cuanto determina la cantidad de lactosa disponible para ser fermentada por las bacterias lácticas y, consecuentemente, su neutralización al formarse lactato de calcio.

La acidificación se produce simultáneamente con el prensado y, a través de ella, el queso adquiere su textura y plasticidad. Es un fenómeno complejo que, además de proteger al queso de la proliferación de gérmenes patógenos,

afecta la estructura mineral de la cuajada (favorece la solubilización del fosfato de calcio coloidal y del calcio unido químicamente a las micelas) y disminuye el agua ligada a las caseínas (Choi y col., 2008).

10. Salado

Esta es una etapa esencial en el proceso de elaboración de cualquier tipo de queso debido a que la incorporación de sal (cloruro de sodio) a la masa tiene como propósito contribuir a realzar el sabor, promover la formación de la corteza, actuar como complemento del desuerado intergranular e inhibir el desarrollo de la flora indeseable (Guinee y Fox, 2004). Si bien estos son objetivos comunes a prácticamente todas las variedades de queso, la forma en que se realiza esta operación puede ser muy distinta según las características del producto, el tipo de tecnología o las tradiciones regionales que lo caracterizan. Entre las metodologías más difundidas se pueden mencionar: el agregado de sal a la cuajada ácida (salado en pasta), aspersion de sal seca sobre la superficie del queso (salado en seco), frotación con salmuera en la superficie de los quesos durante la maduración o por inmersión en salmuera como se hace mayoritariamente en la Argentina. En este caso, antes de ser sumergidos, los quesos deben tener una temperatura próxima a la de la salmuera y un pH uniforme en toda su masa. De este modo, los intercambios de materia que tienen lugar durante esta etapa (evacuación de suero y sales solubles del queso, e incorporación de cloruro de sodio), se producirán homogéneamente. Para que esto ocurra, a la salida de la prensa los quesos se colocan en un ambiente refrigerado durante un tiempo suficiente, que puede ir desde 2 hasta 24 h, dependiendo del tamaño de las hormas.

Vale la pena mencionar que para los quesos de alta humedad (Cremoso), normalmente se emplean salmueras que se encuentran a unos 5°C lo cual, además de posibilitar un correcto salado, permite detener el proceso de acidificación por enfriamiento.

Cada variedad de queso, según sus atributos, tiene un contenido de sal bien definido. Aunque son muchas las variables que intervienen en el proceso de absorción de sal, el parámetro de mayor incidencia es el contenido de humedad del queso (a mayor humedad, se incorpora más sal), por lo cual, en la mayoría de los casos, es el determinante del tiempo de salado.

Debido a la influencia del salado sobre la actividad de agua existente en la cuajada (es uno de los factores de mayor impacto), indirectamente también actúa selectivamente sobre la microflora presente y, de esta manera, produce una diferenciación del ecosistema bacteriano que intervendrá durante la maduración. Lógicamente, en este entorno se verán favorecidas las cepas halófilas y en muchos casos, dependiendo de la sensibilidad del microorga-

nismo, la sal puede llegar a estimular la lisis celular con la consiguiente liberación de las enzimas endocelulares (endopeptidasas) que son las artífices de la proteólisis en la maduración.

11. Maduración de la cuajada

Finalizado el salado, y con su estructura básica formada, los quesos pasan a la etapa de maduración para lo cual se ubican en cámaras especialmente acondicionadas para tal fin con una temperatura y humedad relativa perfectamente controladas. En esta fase, debido a la digestión enzimática de sus componentes, la cuajada sufre una sustancial modificación de su composición, estructura, aspecto, consistencia, color, aroma y sabor, a través de la cual adquiere las características deseadas. Se trata de un proceso bioquímico complejo debido a la gran heterogeneidad fisicoquímica de la matriz de la cuajada y a la considerable diversidad de enzimas presentes, las que pueden provenir de la leche (enzimas nativas), del coagulante, del metabolismo de los microorganismos presentes o bien de agregados especiales con un fin específico (Eck y Gillis, 2003).

El tiempo y la temperatura de permanencia dentro de las cámaras de maduración dependen del tipo de queso y del tamaño de las hormas. A su vez, la maduración puede desarrollarse a humedad constante cuando el queso está protegido por film (sin corteza), o a humedad variable en los quesos tradicionales que pierden peso por evaporación.

Referencias bibliográficas

- CAA Art. 605 – ítem 4 y Art. 622.** Recuperado de http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_VIII.pdf
- Candioti, M.C.; Meinardi, C.A. y Zalazar, C.A. (2004).** Effect of heat treatments higher than pasteurization on protein distribution and clotting properties of milk. *Milchwissenschaft*, 59(3/4).
- Castillo, I.; Calvo, M.V.; Alonso, L.; Juárez, M., y Fontecha J. (2007).** Changes in lipolysis and volatile fraction of a goat cheese manufactured employing a hygienized rennet paste and a defined strain starter. *Food Chemistry* 100 (pp.590–598).
- Choi, J.; Horne, D.S.; Johnson, M.E. y Lucey, J.A. (2008).** Effects of the concentration of insoluble calcium phosphate associated with casein micelles on the functionality of directly acidified cheese. *Journal of Dairy Science*, 91, 513–522.
- Cuffia, F.; Candioti M.C. y Bergamini C.B. (2015).** Influence of brine concentration on the ripening of a soft sheep's milk cheese. *Small Ruminant Research*, 132, 60–66.
- De Kruif, C.G. y Holt, C. (2003).** Casein micelle structure, functions and interactions. En *Advances Dairy Chemistry – 1 Proteins*. Part A. Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (Eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. Chapter 5, 233–276.
- Eck, A. et Gillis, J.C. (2003).** *Le fromage. De la science à l'assurance-qualité*. 3ª Edición. París: Lavoisier TEC&DOC.
- Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (1998).** *Milk Proteins*. En *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London SE1 SHN, UK: Published by Blackie Academic & Professional, Thomson Science. Chapter 4, 146-237.
- Fox, P.F.; Guinee, T.P.; Cogan, T.M. y McSweeney, P.L.H. (2017a).** Enzymatic Coagulation of Milk. En *Fundamentals of Cheese Science*. Second Edition. New York: Springer. Chapter 7, 185–229.
- . (2017b). Microbiology of Cheese Ripening. En *Fundamentals of Cheese Science*. 2da. Edition. New York: Springer. Chapter 11, 333–390.
- . (2017c). Cheese flavour. En *Fundamentals of Cheese Science*. Second Edition. New York: Springer. Chapter 13, 443–474.
- Fox, P.F.; Uniacke-Lowe, T.; McSweeney, P.L.H. y O'Mahony, J.A. (2015).** Chemistry and Biochemistry of Cheese. En *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 2da. Edition. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland. Chapter 12, 499–546.
- Fox, P.F. (2011).** Cheese Overview. En *Encyclopedia of Dairy Science* 2da. Edition. London: Elsevier Academic Press London, Volume 1, 534–543.
- Gauna, A. (2005).** Elaboración de quesos de pasta semidura con ojos. *Cuadernillo Tecnológico N° 3*. Instituto Nacional de Tecnología Industrial–Comisión de la Unión Europea. Proyecto de Mejora de la Eficiencia y de la Competitividad de la Economía Argentina.
- Grundelius, A.U.; Lodaite, K.; Östergren, K.; Paulsson, M. y Dejmeck, P. (2000).** Syneresis of submerged single curd grains and curd rheology. *International Dairy Journal*, Volume 10, 489–496.
- Guinee, T.P. y Fox, P.F. (2004).** Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. En *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 1, 207–259.
- Gunasekaran, S. y Ak, M.M. (2003).** Cheesemaking - An Overview. En *Cheese Rheology and Texture*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida; EE.UU. Chapter 1, 12-40.
- Horne, D.S. (2011).** Casein, Micellar Structure. En *Encyclopedia of Dairy Science* (2ª Edición). London: Elsevier Academic Press London. Volume 3, 772–778.
- Hynes, E.R.; Perotti, M.C.; Bernal, S.; Candioti, M.C.; Bergamini, C.V. y Mercanti, D.J. (2006).** Avances en el conocimiento de la maduración de los quesos duros argentinos. En *Avances en microbiología, bioquímica y tecnología de quesos*. Ed. Reinheimer J.A y Zalazar C.A. 1ª Edición. Santa Fe: Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina. Sección 6, Cap. 1, 301–332. ISBN 987-508-759-9
- Lucey, J.A. (2011).** Cheese - Curd Syneresis (2011). En *Encyclopedia of Dairy Science* (2ª Edition). London: Elsevier Academic Press London, Volume 3, 91–594.
- Mahaut, M.; Jeantet, R. y Brulé, G. (2003).** *Introducción a la Tecnología Quesera*. Zaragoza, España: Acribia. ISBN 84-200-1013-8.

- Meinardi, C.; Alonso, A.; Hynes, E. y Zalazar, C. (2002).** Influence of milk-clotting enzyme on acidification rate of natural whey starters. *International Journal of Dairy Technology*, 55(3), 139–144. Editorial Blackwell Synergy. ISSN 1364-727X
- Meinardi, C.A.; Zalazar, C.A.; Ceresoli, A.E. y Candiotti, M.C. (2004/05).** Recuperación de la aptitud a la coagulación de leches tratadas térmicamente para incrementar el rendimiento quesero. *Revista Argentina de Lactología*, 23 (pp. 67-85). Editorial Centro de Publicaciones Universidad Nacional del Litoral. ISSN 0327-5418
- Meinardi, C.A.; Zalazar, C.A.; Hynes, E.R., y Candiotti, M.C. (2004).** Incremento del rendimiento del queso cremoso argentino por tratamiento de la leche a temperaturas y tiempos superiores a los de pasteurización. *Revista Argentina de Lactología*, (22), 45–54.
- Moschopoulou, E. (2011).** Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Ruminant Research*, 101, 188–195.
- Mucchetti, G.; Addeo, F., e Neviani, E. (1998).** Evoluzione storica della produzione di formaggi a denominazione di origine protetta (DOP). I. Pratiche di produzione, utilizzo et composizione dei sieroinnesti nella caseificazione a formaggi Grana Padano e Parmigiano Reggiano: Considerazioni sulle relazioni tra sieroinnesto e DOP *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 49, 281–311.
- Ottogalli, G. (Ristampa 2005).** *Atlante Dei Formaggi*. Milano, Italia: Ulrico Hoepli Editore.
- Pedro, M. (2012).** Evaluación del contenido de calcio y fósforo en quesos blandos comerciales. Estudio de parámetros tecnológicos que definen la concentración de los mismos en los quesos. *Tesis de Magister en Ciencias y Tecnología de los Alimentos*. Director: Ing. Carlos Meinardi.
- Schaller, A. (2009).** Quesos: análisis de la cadena alimentaria. *Revista Alimentos Argentinos*, 46. Ministerio de Producción; Argentina 46, 29–36.
- Scott, R. (2002).** *Fabricación de queso*. 2da. Edición. Editorial Acribia SA.

2. Caracterización de quesos típicos argentinos

Irma Wolf, Susana Palma,
Carina Bergamini y Ma. Cristina Perotti

Introducción

Argentina es un país con fuerte tradición quesera. Del total de leche producida (10 527 millones de litros en 2018), el queso representa uno de los principales destinos. La producción de queso creció notablemente en la última década, desde 430 955 tn en 2001 hasta 552 093 tn en 2016. Según los datos registrados por la Secretaría de Agroindustria (www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss_lecheria), en el año 2016 los quesos blandos (Cre moso y otros) y semiduros (Pategrás y otros) representaron el 48 y 34 %, respectivamente, de la producción total de quesos, registrándose una participación menor (en torno al 14 %) en el caso de los quesos duros (Reggianito y otros). Además, la población argentina es la mayor consumidora de quesos de América Latina, con un consumo promedio de 12 kg per cápita.

La caracterización del queso es un concepto multifacético y complejo que se puede llevar a cabo para controlar la calidad, cumplir con los requisitos legales o definir la identidad de un producto, y consiste en una descripción global de sus propiedades tecnológicas, microbiológicas, físicas, bio-químicas y sensoriales (Montero y col., 2014).

En este capítulo se presentan las características más relevantes de los quesos argentinos de mayor consumo y más representativos dentro de las categorías de los quesos blandos, semiduros y duros, y además se brinda información de los principales estudios llevados a cabo en el INLAIN, los cuales constituyen un valioso aporte para profundizar en el conocimiento del proceso de maduración de estas variedades de quesos.

Queso Cremoso

Se lo considera un derivado de los quesos italianos con características similares: Crescenza, Taleggio y Bel Paese. Además de consumirlo como un producto de mesa, es muy utilizado en la elaboración de pizzas como sucedáneo de menor costo que la Mozzarella (Zalazar y col., 1999).

La Legislación Argentina (Código Alimentario Argentino, CAA, Capítulo VIII, art. 622; ANMAT, 2018) define al queso Cremoso como un «producto de alta humedad (entre 46 y 54,9 % p/p) y muy alta humedad (> 55 % p/p), elaborado con leche entera o estandarizada, con o sin el agregado de crema, acidificada por cultivo de bacterias lácticas y coagulada por cuajo y/o enzimas específicas. El contenido de materia grasa en el extracto seco debe ser como mínimo del 50 % p/p. Se caracteriza por una pasta blanda, cerrada, algo elástica y grasosa, sabor dulce característico y ligeramente ácido, aroma suave y agradable, y color blanco–amarillento uniforme. Presenta una forma achatada o paralelepípeda, con un tiempo de maduración mínimo de 20 días para hormas de hasta 2,5 kg y de 30 días para las que pesan entre 2,5 y 5 kg». Tienen la particularidad de que no se adicionan lipasas en la elaboración y que el efecto proteolítico debido a las enzimas del fermento durante la maduración es limitado (Zalazar y col., 1995).

Antecedentes

Diversos estudios se realizaron en el INLAIN en quesos Cremoso comerciales y elaborados a escala piloto en los que se evaluaron distintos aspectos tales como las causas del fenómeno de arricotamiento (Zalazar y col., 1995), el incremento del rendimiento quesero por el tratamiento de la leche a temperaturas y tiempos superiores a los de la pasteurización (Meinardi y col., 2003), la influencia de fermentos naturales de leche y fermentos seleccionados en la elaboración y maduración (Candiotti y col., 2001), la incidencia del contenido graso y otras variables en la capacidad de fusión (Mercanti

y col., 2004), la actividad y la retención de las enzimas plasmina y coagulante, y su efecto en la proteólisis (Aparo y col., 2004; Vélez y col., 2015), la relación entre pH, grado de proteólisis y consistencia (Hynes y col., 1999), la correlación entre actividad residual del coagulante, proteólisis y fundibilidad (Candiotti y col., 2009), la predicción del tiempo de maduración empleando parámetros fisicoquímicos, de proteólisis, y técnicas estadísticas multivariadas (Ramonda y col., 2008), y el análisis de los perfiles de compuestos volátiles (Wolf y col., 2012). Asimismo, algunos trabajos se han enfocado en el uso del queso Cremoso como matriz de estudio y desarrollo de microorganismos de origen NSLAB (Milesi y col., 2010) y bacterias probióticas (Vinderola y col., 2000; 2009). A continuación se profundizará la discusión sobre resultados inéditos obtenidos para quesos comerciales.

Composición fisicoquímica y proteólisis

Valores promedio de pH, humedad, materia grasa, proteína, sal y fracciones nitrogenadas ($NSpH_{4,6}/NT$ o grado de maduración, NS_{TCA}/NT , NS_{PTA}/NT) de quesos Cremoso ($n = 18$) se presentan en la Tabla 1.

Los resultados de humedad (entre 47 y 53 %) y materia grasa en el extracto seco (entre 50 y 53 %) se encontraron dentro de los valores establecidos por el CAA. El rango de valores de pH estuvo entre 5,12 y 5,38. El bajo índice de maduración y en particular los bajos valores de NS_{PTA}/NT dan cuenta

Tabla 1. Datos de composición global y grado de maduración en quesos (valores promedio \pm SD) de las variedades Cremoso ($n = 18$), Pategrás ($n = 18$), Reggianito ($n = 26$) y azules ($n = 20$)

Parámetros	Queso Cremoso	Queso Pategrás	Queso Reggianito	Queso azul
pH	5,25 \pm 0,13	5,49 \pm 0,19	5,40 \pm 0,10	5,70 \pm 0,40
Humedad% ⁽¹⁾	50,05 \pm 2,89	37,66 \pm 1,62	33,90 \pm 1,6	41,9 \pm 2,80
Grasa% ⁽²⁾	51,33 \pm 1,71	46,23 \pm 1,66	38,90 \pm 3,50	54,0 \pm 5,6
Proteína% ⁽¹⁾	20,36 \pm 1,53	27,47 \pm 1,87	32,13 \pm 2,50	20,5 \pm 1,6
NaCl (s.h)% ⁽³⁾	ND	4,1 \pm 1,6	6,5 \pm 1,9	6,3 \pm 1,3
$NSpH_{4,6}/NT$ % ⁽⁴⁾	9,82 \pm 2,99	16,86 \pm 5,82	22,00 \pm 3,80	39,40 \pm 7,80
NS_{TCA}/NT % ⁽⁴⁾	5,28 \pm 0,46	9,53 \pm 1,40	19,16 \pm 3,60	35,00 \pm 9,00
NS_{PTA}/NT % ⁽⁴⁾	1,65 \pm 0,26	3,92 \pm 0,49	11,96 \pm 2,40	13,90 \pm 6,00
AGT (mg/Kg)	ND	ND	2069 \pm 684	20300 \pm 14100

¹ g/100g queso. ² g/100g queso expresado en base seca. ³ s.h: sal en la humedad; g/100g humedad. ⁴ Expresado en valores porcentuales respecto al contenido de nitrógeno total (NT). AGT: Acidos Grasos Totales. ND: No determinado

de una proteólisis no tan avanzada, característicos de quesos con cortos períodos de maduración a baja temperatura. Esto también se vio reflejado en la producción de bajos niveles de aminoácidos libres durante la maduración, cuyo rango estuvo entre 0,39 y 0,68 g/kg. Por otro lado, los perfiles de electroforesis revelaron una profunda degradación de la caseína α_{S1} (α_{S1-CN}) y un aumento de la fracción $\alpha_{S1-I-CN}$ (α_{S1-CN} (f24-199)), péptido resultante de la acción de la enzima coagulante residual, a medida que el tiempo de maduración avanzó. De hecho, se encontró una alta correlación ($R^2 = 0,81$) para la relación $\alpha_{S1-I-CN}/(\alpha_{S1-CN} + \alpha_{S1-I-CN})$ con el tiempo, calculada por densitometría de los electroforetogramas (Ramonda, 2009).

Compuestos volátiles

Se identificaron un total de 30 compuestos volátiles en los quesos analizados ($n = 10$): 8 cetonas, 8 alcoholes, 7 ácidos, 4 ésteres y 3 aldehídos. Las áreas de los distintos grupos de compuestos se expresaron como porcentajes, respecto al área total de compuestos identificados.

Las cetonas fueron el grupo mayoritario (43-55% del total de compuestos) en la mitad de las muestras. Se destacó la presencia de metilcetonas (C_3 a C_9), 3-hidroxi 2-butanona (acetoína) y 2,3-butanodiona (diacetilo). Particularmente, la acetoína resultó la más abundante en la mayoría de las muestras. Los alcoholes constituyeron el principal grupo de compuestos volátiles en tres de las diez muestras analizadas, con porcentajes superiores al 60%. Se identificaron principalmente alcoholes lineales primarios y secundarios, y un alcohol ramificado, siendo el etanol el alcohol cuantitativamente más importante. El grupo de los aldehídos resultó uno de los grupos mayoritarios en cuatro de los quesos analizados, destacándose la presencia de acetaldehído, 2-metil butanal y 3-metil butanal. Los ácidos alcanzaron valores porcentuales en el rango del 2 al 30%. Se detectaron ácidos de cadena lineal y número par de átomos de carbono (C_2 a C_{12}), siendo mayoritarios los ácidos acético y butanoico. Los ésteres presentaron bajos porcentajes, entre el 2 y 7%, destacándose particularmente los ésteres etílicos.

Globalmente, las cetonas y los alcoholes, y en menor medida los aldehídos y los ácidos, fueron los grupos de mayor relevancia en el perfil de compuestos volátiles de los quesos Cremoso. Teniendo en cuenta el origen de los compuestos volátiles mayoritarios identificados (acetoína, etanol, ácido etanoico, acetaldehído, 3-metil 1-butanol, etc.), el metabolismo del lactato y citrato y el catabolismo de los aminoácidos resultaron ser las principales vías metabólicas que conducen a su producción en quesos blandos.

Queso Pategrás

El queso Pategrás es el queso semiduro más popular de la Argentina. El origen de los quesos de pasta semidura, prensada, semicocida, con o sin ojos, se remonta a los inicios del siglo xx, en productos similares de antigua tradición en Francia, Italia y Suiza. Con el tiempo, debido a una falta de uniformidad en la calidad de este producto, se introdujeron cambios en el tipo y calidad de las materias primas e insumos como así también en la tecnología, que han conducido a que esta variedad adquiriera características propias. En la década del 70 estos quesos se elaboraban aplicando un proceso de saneamiento térmico suave a la leche de manera que la microflora natural heterofermentativa, dentro de las que se encuentran las bacterias propiónicas (PAB), resistiera este proceso. Posteriormente, la aplicación de la pasteurización a la leche de quesería condujo a una eliminación de la microflora natural productora de ojos (Zalazar y col., 1999). Actualmente, en la elaboración del queso Pategrás es común el agregado de PAB como fermento secundario de manera de estandarizar las características fisicoquímicas y sensoriales del producto. En nuestro país, la tecnología de los «quesos con ojos» representa aún un desafío para las industrias lácteas, lo cual ha conducido al desarrollo de protocolos de elaboración (Gauna, 2005).

El queso Pategrás o Gouda (CAA, Capítulo VIII, art. 630; ANMAT, 2018) es un «producto de mediana humedad (entre 36,0 y 45,9% p/p), graso (entre 45,0 y 59,9% p/p, en base seca), elaborado con leche entera o leche estandarizada, acidificada por cultivo de bacterias lácticas y coagulada por cuajo y/o enzimas específicas. Presenta una pasta compacta, firme, de consistencia elástica, con o sin algunos ojos bien diseminados; sabor dulce característico, aroma suave, agradable y bien desarrollado, y color blanco–amarillento uniforme. Se presenta en forma cilíndrica, caras paralelas y perfil convexo. Las hormas grandes (5 – 10 kg) deben tener una maduración mínima de 2 meses, las hormas medianas (1 – 5 kg) una maduración no menor a 1,5 meses, y las hormas chicas (< 1 kg) una maduración mínima de 1 mes».

Antecedentes

En el INLAIN se han estudiado diferentes aspectos de la tecnología y maduración del queso Pategrás. Los trabajos más recientes se han focalizado en los cambios que ocurren en la proteólisis y lipólisis durante la maduración (Perotti y col., 2009), en el uso como matriz para la incorporación de probióticos (Bergamini y col., 2005; 2010) y en la predicción del tiempo de

maduración empleando parámetros fisicoquímicos, de proteólisis y técnicas estadísticas multivariadas (Ramonda, 2009). Además, se han evaluado las actividades enzimáticas del coagulante y la plasmina, y sus efectos en la proteólisis (Vélez y col., 2015), la composición fisicoquímica, el perfil de compuestos volátiles, y el rol de las PAB en la bioquímica de la maduración (Wolf y col., 2016). A continuación se profundizará la discusión sobre resultados obtenidos para quesos comerciales.

Composición fisicoquímica y proteólisis

Valores típicos de pH, humedad, materia grasa, proteína, sal y fracciones nitrogenadas de quesos Pategrás ($n = 18$) se presentan en la Tabla 1.

Los porcentajes de humedad y de materia grasa en el extracto seco oscilaron entre 36 y 39 %, y 45 y 49 %, respectivamente, y se correspondieron con los establecidos en el CAA. El rango de pH fue de 5,3 – 5,7, el nivel de proteínas se encontró entre 25 y 32 %; el grado de maduración ($NSPH_{4,6}/NT$) varió desde 11 hasta 23 %, y las restantes fracciones, $NSTCA/NT$ y $NSPTA/NT$, oscilaron entre 8,1 y 11,0 % y entre 3,4 y 4,4 %, respectivamente. Por su parte, los aminoácidos libres alcanzaron niveles entre 1,38 y 1,77 g/kg a los 60 días de maduración. Los valores de proteólisis y de las aminoácidos libres resultaron superiores a los encontrados en quesos Cremoso, dando cuenta de un proceso proteolítico notoriamente más acentuado.

Compuestos volátiles

En los perfiles de volátiles de los quesos analizados ($n = 10$) se identificaron 48 compuestos: 9 cetonas, 5 aldehídos, 13 alcoholes, 7 ésteres, 12 ácidos y 2 hidrocarburos.

Los ácidos resultaron el grupo mayoritario (26–72 % del total de compuestos) en la mayoría de las muestras, detectándose principalmente ácidos de cadena lineal (C_2 a C_{12}) y ácidos ramificados tales como el 2–metil propanoico y 3–metil butanoico. El ácido propiónico (C_3) alcanzó porcentajes superiores al 60 % del total de los ácidos, denotando la incidencia del mismo en el perfil de volátiles. Los alcoholes y las cetonas fueron otros dos grupos cuantitativamente importantes. En más de la mitad de las muestras analizadas, los alcoholes presentaron valores porcentuales entre el 20 y el 55 %, mientras que las cetonas alcanzaron porcentajes superiores al 10 % del total de compuestos. Dentro de la familia de las cetonas se iden-

tificaron metilcetonas (C_3 a C_{11}), diacetilo y acetoína, siendo esta última la cetona mayoritaria, con porcentajes superiores al 50 % respecto del total de cetonas. Por su parte, el grupo de los alcoholes fue el más diversificado, detectándose alcoholes lineales primarios, secundarios y ramificados, y un alcohol aromático. El más abundante en todas las muestras resultó ser el etanol. Los ésteres y aldehídos fueron minoritarios y las proporciones de los mismos no superaron el 8 % del total de compuestos. Dentro del grupo de los aldehídos se identificaron aldehídos lineales, ramificados y aromáticos. En cuanto a los ésteres se encontraron principalmente ésteres etílicos, destacándose el propanoato de etilo, compuesto típico de los quesos adicionados con PAB.

Globalmente, los perfiles de volátiles de los quesos Pategrás se caracterizaron por la presencia de aldehídos, alcoholes y ácidos de cadena ramificada, alcoholes primarios y ácidos de cadena corta (C_4 a C_{10}), compuestos asociados al metabolismo de las PAB.

Queso Reggianito

El queso Reggianito es el representante de los quesos de pasta dura tipo grana más popular de la Argentina. La tecnología de elaboración es una adaptación de la utilizada para los quesos duros italianos (Parmigiano–Regiano y Grana Padano). A diferencia de estos, el Reggianito tienen mayor humedad y contenido graso, un tiempo de maduración más corto y un tamaño mucho menor (Licitra y col., 2018).

De acuerdo con la legislación argentina (CAA, Capítulo VIII, art. 635; ANMAT, 2018), el Reggianito se considera un «queso de baja humedad (hasta 35.9 % p/p) y semigraso o graso (mínimo de materia grasa de 32 % p/p, en base seca). Es un queso madurado que se obtiene por coagulación de la leche por medio del cuajo y/u otras enzimas coagulantes apropiadas, complementada por la acción de bacterias lácticas específicas. Se caracteriza por una consistencia dura y una textura compacta, quebradiza y granulosa. El color de la pasta es blanco amarillento y presenta sabor salado, levemente picante y olor característico. No posee ojos, aunque puede presentar algunos ojos pequeños y aberturas mecánicas. Se presenta en cilindros de caras planas y perfil ligeramente convexo. El tiempo de maduración mínimo es de 6 meses para quesos entre 4 a 10 kg, 8 meses para quesos entre 10 y 20 kg y de 12 meses para quesos que superen los 20 kg».

En 2008, a través de la resolución SAGPYA N° 16/2008 se oficializó el Protocolo de Calidad que define y describe los atributos de calidad para queso

Reggianito que aspiren a utilizar el Sello «Alimentos Argentinos – Una elección Natural». Este protocolo establece las características descriptivas del queso y de su proceso de elaboración utilizando tanto tecnologías tradicionales como avanzadas, brindando a las empresas productoras una herramienta adicional para la obtención de productos de calidad diferenciada (www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/queso_reggianito.pdf).

Antecedentes

Diversos trabajos llevados a cabo en nuestro Instituto contribuyeron a caracterizar la microflora ácido láctica que compone el suero fermento natural utilizado en queso Reggianito y evaluar sus propiedades tecnológicas y bioquímicas (Reinheimer y col., 1995; 1996) y características genéticas (Quiberoni y col., 1998). A partir de estos resultados se obtuvo una colección de cepas autóctonas de *L. helveticus* que se incorporaron al cepario del INLAIN. Si bien el suero fermento natural se empleó en el pasado, la tendencia actual en la industria láctea argentina, con el objeto de estandarizar la calidad, es el empleo de fermentos comerciales liofilizados de cepas de lactobacilos termófilos y la acidificación química de la leche. En este sentido, diversas cepas autóctonas se ensayaron como fermentos para la elaboración de quesos Reggianito y se evaluó su impacto en los perfiles de proteólisis, peptidólisis, lipólisis y en las características sensoriales (Candiotti y col., 2002; Hynes y col., 2003; Perotti y col., 2005; Milesi y col., 2011).

Otros estudios realizados en el INLAIN y en centros de investigación de la región han abordado otros aspectos de la maduración tales como las propiedades reológicas y sensoriales y sus correlaciones con parámetros instrumentales (Hough y col., 1996), el efecto del material de empaque en los parámetros de textura, contenido de ácidos orgánicos y perfil sensorial (Lombardi y col., 1994; Hough y col., 1994; Bértola y col., 1995), la predicción del tiempo de maduración empleando parámetros fisicoquímicos, de proteólisis y técnicas estadísticas multivariadas (Ramonda, 2009), y la incidencia de la alimentación de las vacas lecheras en la composición de la leche, en la aptitud quesera y en las características sensoriales de los productos (Costabel y col., 2011; Audero y col., 2014). También se estandarizó un protocolo de elaboración con cultivos directos y ácido láctico como acidógeno (Meinardi y col., 2008), se caracterizaron los perfiles de volátiles y de ácidos grasos de quesos comerciales (Wolf y col., 2010), y utilizando los perfiles de compuestos volátiles y técnicas estadísticas multiva-

riadas se logró una diferenciación de los quesos Reggianito de otros quesos grana (Wolf y Perotti, 2013). De modo similar, el análisis de los perfiles de aminoácidos de muestras comerciales permitió seleccionar los aminoácidos más representativos que podrían utilizarse como biomarcadores para diferenciar quesos tipo grana en estudios de autenticidad (Duchowicz y col., 2011). Por otra parte, varias estrategias se han ensayado para acelerar la maduración y/o diversificar/incrementar el flavor: aumento de la temperatura de maduración (Sihufe y col., 2007; 2010a y b; Ceruti y col., 2015), pretratamiento de la leche (tratamiento térmico, agitación mecánica, homogeneización) (Vélez y col., 2010; 2011), tipo de coagulante y temperatura de cocción de la cuajada (Costabel y col., 2015), y uso de enzimas exógenas (Ceruti y col., 2016). Además, se han evaluado las actividades enzimáticas del coagulante y la plasmina, y su efecto en la proteólisis de los quesos (Hynes y col., 2004; Vélez y col., 2015). A continuación se dirigirá la discusión sobre algunos de los resultados obtenidos en quesos comerciales.

Composición fisicoquímica, proteólisis y lipólisis

Los valores promedios de composición global, fracciones nitrogenadas y grado de lipólisis de quesos Reggianito ($n = 26$) se muestran en la Tabla 1.

El rango de pH fue de 5,3–5,5, los porcentajes de humedad y de materia grasa, en el extracto seco, oscilaron entre 32 y 36%, y 35 y 42%, respectivamente, y se correspondieron con lo establecido en la legislación, en tanto que los valores de proteínas se encontraron entre 30 y 35%. El grado de maduración varió desde 18 hasta 26%, y las fracciones NSTCA/NT y NSPTA/NT se encontraron en el rango entre 16 y 23% y entre 9 y 14%, respectivamente. Asimismo, los niveles de aminoácidos libres fueron elevados y oscilaron entre 29 a 43 g/kg de queso. De este modo, los valores de la proteólisis resultaron comparativamente superiores a los de los quesos Cremoso y Pategrás, hecho atribuido entre otros factores al mayor tiempo de maduración de los quesos Reggianito.

En cuanto al grado de lipólisis, los niveles promedio variaron entre 1187 y 3810 mg AGT (ácidos grasos totales)/kg de queso. Los principales ácidos grasos encontrados fueron el palmítico ($C_{16:0}$) y oleico ($C_{18:1}$), y los siguientes ácidos en orden decreciente de concentración fueron mirístico ($C_{14:0}$) y esteárico ($C_{18:0}$). El perfil de ácidos grasos de los quesos, desde el punto de vista cualitativo, no difirió del que caracteriza a los ácidos grasos de la grasa láctea.

Compuestos volátiles

El análisis del perfil de los volátiles de los quesos Reggianito (n = 18) permitió identificar un total de 53 compuestos: 9 cetonas, 15 alcoholes, 7 ésteres, 11 ácidos, 5 aldehídos y 6 compuestos pertenecientes a otras familias químicas.

Los ácidos y los alcoholes constituyeron en general los dos principales grupos de compuestos en la fracción aromática de los quesos Reggianito. Los ácidos alcanzaron un valor porcentual promedio del 38 % del total de compuestos, siendo los ácidos acético y butanoico los más abundantes, en tanto que los alcoholes representaron un 30 %, encontrándose el etanol y algunos alcoholes secundarios en alta proporción. Las cetonas alcanzaron porcentajes promedio del 18 % del total de compuestos, resultando la propanona, 2-pentanona, 2-heptanona, diacetilo y acetoina las más relevantes desde el punto de vista cuantitativo. Los aldehídos representaron el 9 % de la fracción volátil, destacándose la presencia de aldehídos ramificados (2 y 3-metil butanal), acetaldehído y 2-butenal. Los ésteres fueron un grupo minoritario, en torno al 5 %, y en particular el hexanoato de etilo resultó el éster más abundante en los quesos Reggianito.

De acuerdo con el origen de los compuestos mayoritarios detectados en los quesos Reggianito, los procesos bioquímicos de la lipólisis, proteólisis y el catabolismo de aminoácidos y ácidos grasos, junto con la degradación de la lactosa y el catabolismo del lactato, contribuyen en diferente medida al perfil aromático típico de esta variedad.

Quesos azules

Dentro de esta categoría se incluyen aquellos quesos que tienen como principales características las de poseer una textura semiblanda y un proceso de maduración en el cual participan activamente diferentes cepas de mohos. Se los conoce como «quesos blandos madurados», «quesos madurados por mohos» o más comúnmente, «quesos azules». Los quesos azules fueron introducidos en Argentina por inmigrantes franceses, quienes conservaron el tradicional proceso de elaboración: uso de *Penicillium roqueforti*, salado en seco y perforación de la horma de queso con agujas especiales para favorecer el desarrollo del moho en el interior.

La Legislación Argentina (CAA, Capítulo VIII, art. 627; ANMAT, 2018) define al queso azul como

el producto que se obtiene por coagulación de la leche por medio del cuajo y/u otras enzimas coagulantes apropiadas, complementada o no por la acción de bacterias lácticas específicas, y mediante un proceso de elaboración que utiliza hongos específicos (*Penicillium roqueforti*), complementados o no por la acción de hongos y/o levaduras subsidiarias responsables de otorgarle al producto características distintivas durante el proceso de elaboración y maduración. Se clasifica dentro de los quesos grasos y de mediana o alta humedad. Se caracterizan por una consistencia semidura desmenuzable o semiblanda pastosa. Presentan una textura abierta, con hongos distribuidos de manera razonablemente uniforme y vetas características de color verde, verde azulado o verde grisáceo. La pasta es de color blanco o blanco amarillento uniforme y la corteza es rugosa, sin rajaduras e irregular. Poseen sabor picante, salado, y un olor acentuado. Los quesos tienen forma cilíndrica y se comercializan en hormas que en promedio tienen unos 3 kg. El tiempo de maduración requerido para lograr sus características específicas es de por lo menos 35 días a una temperatura menor de 15 °C; luego debe mantenerse durante su expendio a temperatura no superior a 8 °C.

Antecedentes

Los trabajos científicos relacionados al estudio de la maduración de los quesos azules son escasos. El INTI-Lácteos, a través del análisis de muestras comerciales, evaluó la composición fisicoquímica (pH, humedad y materia grasa), el perfil de ácidos grasos y el perfil cualitativo de componentes del aroma. Además, estableció el perfil sensorial estándar del queso azul argentino a partir de la selección y valoración de 20 atributos correspondientes a los aspectos de apariencia, textura y flavor (Montero y col., 2014). En el INLAIN se han encarado algunos estudios, principalmente del proceso de lipólisis (Bernal y col., 1998), y más recientemente se analizaron muestras comerciales para establecer parámetros fisicoquímicos y conocer el perfil de ácidos grasos y compuestos volátiles (Wolf y col., 2011).

Composición fisicoquímica, proteólisis y lipólisis

Valores típicos de humedad, materia grasa, pH, proteína, sal, fracciones nitrogenadas y lipólisis encontrados en quesos azules comerciales (n = 20), se presentan en la Tabla 1.

Los valores de humedad (39 al 45 %) y grasa en el extracto seco (48 al 60 %), fueron normales para este tipo de quesos. El pH presentó un valor promedio de 5,7, resultando en general inferior a los reportados en quesos madurados por mohos de otros orígenes. El contenido de proteínas estuvo en el rango entre 19 y 22 % y los niveles de sal en la humedad variaron entre 5 y 7,6 %.

En relación con los perfiles de lipólisis, se observó una amplia variabilidad entre las muestras analizadas, registrándose niveles de entre 6100 y 49200 mg AGT/kg de queso. Los ácidos grasos libres mayoritarios fueron el oleico (C_{18:1}), palmítico (C_{16:0}) y mirístico (C_{14:0}). Similares resultados fueron reportados para quesos azules de otros orígenes.

Los altos niveles de las distintas fracciones nitrogenadas y del grado de lipólisis en comparación con las otras variedades de quesos madurados por bacterias revelan la intensa actividad proteolítica y lipolítica del moho. Sin embargo, la extensión de la maduración en general resultó inferior a la reportada en quesos azules de otros orígenes.

Compuestos volátiles

Un total de 50 compuestos volátiles fueron detectados en las muestras de quesos azules analizadas (n=20), los cuales pertenecieron a las familias químicas de las cetonas (10), alcoholes (17), ésteres (9), ácidos (9) y otros compuestos (5).

Las cetonas resultaron un grupo mayoritario, superando el 50 % del total de volátiles en la mitad de las muestras analizadas. Se destacaron desde un punto de vista cuantitativo las metilcetonas, y en particular la propanona, 2-pentanona, 2-heptanona y 2-nonanona.

Para la mayoría de las muestras, los alcoholes y los ácidos fueron otros dos grupos relevantes. Dentro de los alcoholes se identificaron principalmente alcoholes lineales secundarios (mayoritariamente 2-propanol, 2-pentanol y 2-pentanol), alcoholes ramificados (mayoritariamente 3-metil 1-butanol) y el etanol. En el grupo de los ácidos, predominaron el butírico y el hexanoico. Los ésteres, particularmente ésteres etílicos y metílicos de los ácidos butanoico y hexanoico, constituyeron un grupo minoritario, representando menos del 5 % del total de compuestos. En algunas muestras, el hidrocarburo 1,3-pentadieno fue encontrado en altos niveles.

El perfil global de los quesos azules caracterizado por metilcetonas, ácidos grasos, ésteres y alcoholes secundarios y ramificados, está claramente asociado a las actividades proteolíticas y lipolíticas de *Penicillium roqueforti*.

Referencias bibliográficas

- ANMAT (2018).** Agencia Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Código Alimentario Argentino. Recuperado del sitio web <https://www.argentina.gov.ar/anmat/codigoalimentario>
- Aparo, L.; Candiotti, M.; Ceresoli, A. y Hynes, E. (2004).** Determinación de la actividad de la enzima coagulante residual en quesos argentinos. *Revista Argentina de Lactología*, 23, 87–98.
- Audero, G.; Costabel, L.; Campos, S.; Cuatrin, A. y Wenteker, C. (2014).** Leche naturalmente enriquecida con ácidos grasos insaturados: influencia en la composición físicoquímica de los quesos. *Actas del V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos* organizado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba.
- Bergamini, C.; Hynes, E.; Quiberoni, A.; Suarez, V. y Zalazar, C. (2005).** Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinian cheese. *Food Research International*, 38, 597–604.
- Bergamini, C.; Hynes, E.; Meinardi, C.; Suárez, V.; Quiberoni, A. y Zalazar, C. (2010).** Pategrás cheese as a suitable carrier for six probiotic cultures. *Journal of Dairy Research*, 77, 265–272.
- Bernal, S.; Perotti, M.; Zalazar, M.C.; Cardell, D. y Zalazar, C.A. (1998).** Evaluación de ácidos grasos libres en quesos argentinos. *Revista Argentina de Lactología*, 17, 35–48.
- Bértola, N.; Bevilacqua, A. y Zaritzky, N. (1995).** Rheological behavior of Reggiano Argentinian cheese packaged in plastic film during ripening. *LWT-Food Science and Technology*, 28(6), 610–615.
- Candiotti, M.; Hynes, E.; Meinardi, C.; Sabbag, N. y Zalazar, C. (2001).** Uso de fermentos seleccionados directos en la elaboración de queso Cremoso Argentino. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 24, 64–67.
- Candiotti, M.; Hynes, E.; Quiberoni, A.; Palma, S.; Sabbag, N. y Zalazar, C.A. (2002).** Reggiano Argentinian cheese: Influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. *International Dairy Journal*, 12(11), 923–931.
- Candiotti, M.; Zalazar, C. y Hynes, E. (2009).** Correlación entre actividad residual de cuajo, la proteólisis y la fundibilidad de queso Cremoso. *Revista Argentina de Lactología*, 26, 21–30.
- Ceruti, R.; Zorrilla, S.; Sabbag, N.; Costa, S. y Sihufe, G. (2015).** Acceleration of Reggiano cheese ripening. Effect of increased initial ripening temperatures on biochemical and sensory characteristics. *Dairy Science & Technology*, 95, 231–243.
- Ceruti, R.; Pirola, M.; Ramos, E.; Robert, L.; Rubiolo, A. y Sihufe, G. (2016).** Use of an exogenous carboxypeptidase to accelerate proteolysis in Reggiano cheese. *Czech Journal of Food Science*, 34, 445–455.
- Costabel, L.; Vélez, A.; Audero, G.; Langman, L.; Taverna, M.; Páez, R.; Descalzo, A.; Rossetti, L.; Cuatrin, A.; Negri, L. y Castillo, A. (2011).** Efecto de la inclusión de alfalfa en la dieta sobre la calidad de queso Reggiano. *Actas del 34º Congreso Argentino de producción Animal – 1º Joint Meeting ASAS–AAPA* organizado por la Asociación Argentina de Producción animal.
- Costabel, L.; Bergamini, C.; Pozza, L.; Cuffia, F.; Candiotti, M. y Hynes, E. (2015).** Influence of chymosin type and curd scalding temperature on proteolysis of hard cooked cheeses. *Journal of Dairy Research*, 82, 375–384.
- Duchowicz, P.; Giraud, M.; Castro, E. y Pomilio, A. (2011).** Quantitative structure-property relationship analyses of aminograms in food: Hard cheeses. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 107, 384–390.
- Gauna, A. (2005).** Elaboración de quesos de pasta semidura con ojos. Cuaderno Tecnológico N° 3. Recuperado de <https://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/cuadernotecnologico3.pdf>
- Hough, G.; Martínez, E.; Barbieri, T.; Contarini, A. y Vega, M. (1994).** Sensory profiling during ripening of Reggiano cheese, using both traditional ripening and in plastic wrapping. *Food Quality and Preference*, 5, 271–280.
- Hough, G.; Califano, A.; Bertola, N.; Bevilacqua, A.; Martínez, E.; Vega, J. y Zaritzky, N. (1996).** Partial Least Squares correlations between sensory and instrumental measurements of flavor and texture for Reggiano grating cheese. *Food Quality and Preference*, 7, 47–53.

- Hynes, E.; Delacroix-Buchet, A.; Meinardi, C. y Zalazar, C. (1999).** Relation between pH, degree of proteolysis and consistency in soft cheeses. *Australian Journal of Dairy Technology*, 54, 24–27.
- Hynes, E.; Bergamini, C.; Suárez, V. y Zalazar, C. (2003).** Proteolysis in Reggianito Argentino cheeses manufactured with whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 86, 3831–3840.
- Hynes, E.; Aparo, L. y Candiotti, M. (2004).** Influence of residual milk-clotting enzyme on α 1 casein hydrolysis during ripening of Reggianito Argentino cheese. *Journal of Dairy Science*, 87, 565–573.
- Licitra, G.; Hynes, E.; Perotti, M.; Bergamini, C.; Eugster-Meier, E.; Fröhlich-Wyder, M-T; Jakob, E. y Wechsler, D. (2018).** Extra-hard cheeses. En Papademas P, Bintsis, T. (Eds.), *Global Cheesemaking Technology. Cheese quality and characteristics*. Reino Unido: Wiley & Sons, 194–203.
- Lombardi, A.; Bevilacqua, A. y Califano, A. (1994).** Variation in organic acids content during ripening of Reggianito cheese in air-tight sealed bags. *Food Chemistry*, 51, 221–226.
- Meinardi, C.; Zalazar, C.; Hynes, E. y Candiotti, M. (2003).** Incremento del rendimiento del queso Cremoso Argentino por tratamiento de la leche a temperaturas y tiempos superiores a los de pasteurización. *Revista Argentina de Lactología*, 22, 45–54.
- Meinardi, C.; Costabel, L.; Páez, R.; Audero, G.; Zalazar, C. y Taverna, M. (2008).** Desarrollo de un protocolo para la elaboración de queso Reggianito utilizando ácido láctico y cultivos directos. *Actas del IV Congreso Internacional de Marketing y Tecnología de Quesos* organizado por Fepale y Chr. Hansen.
- Mercanti, D.; Wolf, I.; Meinardi, C.; Candiotti, M. y Zalazar, C. (2004).** Influencia del contenido de grasa y de otras variables sobre la capacidad de fusión del queso Cremoso Argentino. *Grasas y Aceites*, 55(3), 296–302.
- Milesi, M.; Wolf, I.; Bergamini, C. y Hynes, E. (2010).** Two strains of nonstarter lactobacilli increased the production of flavor compounds in soft cheeses. *Journal of Dairy Science*, 93, 5020–5031.
- Milesi, M.; Bergamini, C. y Hynes, E. (2011).** Production of peptides and free amino acids in a sterile extract describes peptidolysis in hard-cooked cheeses. *Food Research International*, 44, 765–773.
- Montero, H.; Pino, F.; Aranibar, G.; Raco, F. y Rodríguez, G. (2014).** Caracterización de queso azul. INTI Lácteos. III del Queso Azul, Santa Fe, 1–33.
- Perotti, M.; Bernal, S.; Meinardi, C. y Zalazar, C. (2005).** Free fatty acid profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters. *International Dairy Journal*, 15, 1150–1155.
- Perotti, M.; Mercanti, D.; Bernal, S. y Zalazar, C. (2009).** Characterization of the free fatty acids profile of Pategrás cheese during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 331–338.
- Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Quéneé, P.; Suárez, V. y Reinheimer, J. (1998).** Genetic and technological diversities among wild *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 591–596.
- Ramonda, M.; Perotti, M.; Bernal, S.; Fernández, V. y Zalazar, C. (2008).** Cremoso cheese: prediction of ripening time using physicochemical parameters and multivariate statistical techniques. *Italian Journal of Food Science*, 2(20), 151–160.
- Ramonda, M.B. (2009).** *Desarrollo de un modelo basado en métodos estadísticos para la predicción del tiempo de maduración de quesos argentinos* (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional del Litoral.
- Resolución SAGPyA N° 16/2008:** Protocolo de Calidad para Queso Reggianito. www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/queso_reggianito.pdf
- Reinheimer, J.; Suárez, V.; Bailo, N. y Zalazar, C. (1995).** Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinian hard cheese production. *Journal of Food Protection*, 58(7), 796–799.
- Reinheimer, J.; Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Binetti, A. y Suárez, V. (1996).** The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina for hard cheese production. *International Dairy Journal*, 6, 869–879.
- Secretaría de Agroindustrias.** www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/ss_lecheria
- Sihufe, G.; Zorrilla, S.; Mercanti, D.; Perotti, M.; Zalazar, C. y Rubiolo, A. (2007).** The influence of ripening temperature and sampling site on the lipolysis in Reggianito Argentino cheese. *Food Research International*, 40, 1220–1226.
- Sihufe, G.; Zorrilla, S.; Sabbag, N.; Costa, S. y Rubiolo, A. (2010a).** The influence of ripening temperature on the sensory characteristics of Reggianito Argentino cheese. *Journal of Sensory Studies*, 25, 94–107.

- Sihufe, G.; Zorrilla, S. y Rubiolo, A. (2010b).** The influence of ripening temperature and sampling site on the proteolysis in Reggianito Argentino cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 43(2), 247–253.
- Vélez, M.; Perotti, M.; Wolf, I.; Hynes, E. y Zalazar, C. (2010).** Influence of milk pre-treatment on production of FFA and volatile compounds in hard cheeses: heat treatment and mechanical agitation. *Journal of Dairy Science*, 93, 4545–4554.
- Vélez, M.; Perotti, M.; Rebecchi, S.; Meinardi, C.; Hynes, E. y Zalazar, C. (2011).** Effect of mechanical treatments applied to milk fat on fat retention and lipolysis in minicurd. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 227–231.
- Vélez, M., Bergamini, C.; Ramonda, M.; Candiotti, M.; Hynes, E. y Perotti, M. (2015).** Influence of cheese making technologies on plasmin and coagulant associated proteolysis. *LWT – Food Science and Technology*, 64, 282–288.
- Vinderola, C.; Prosello, W.; Ghiberto, D. y Reinheimer, J. (2000).** Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 1905–1911.
- Vinderola, C.; Prosello, W.; Molinari, F.; Ghiberto, D. y Reinheimer, J. (2009).** Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 171–174.
- Wolf, I.; Perotti, M.; Bernal, S. y Zalazar, C. (2010).** Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. *Food Research International*, 43, 1204–1211.
- Wolf, I.; Perotti, M. y Zalazar, C. (2011).** Composition and volatile profiles of commercial Argentinean blue cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 385–393.
- Wolf, I.; Rebecchi, S.; Somavilla, E.; Astorri, T. y Perotti, M. (2012).** Compuestos volátiles en queso Cremoso. *Actas del II Simposio Argentino de Lactología* organizado por el Instituto de Lactología Industrial (FIQ–UNL/CONICET) y el Instituto de Tecnología de Alimentos (FIQ–UNL).
- Wolf, I.V. y Perotti, M.C. (2013).** Diferenciación de quesos tipo grana de distintos orígenes a través del análisis de los perfiles de compuestos volátiles. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 77, 40–45.
- Wolf, I.; Peralta, G.; Candiotti, M. y Perotti, M. (2016).** The role of propionibacteria in the volatile profile of Pategrás cheeses. *Dairy & Science Technology*, 96, 551–567.
- Zalazar, C.; Meinardi, C.; Candiotti, M.; Bernal, S. y Hynes, E. (1995).** La maduración del queso «Cremoso Argentino». *Revista Argentina de Lactología*, 11, 59–72.
- Zalazar, C.; Meinardi, C. y Hynes, E. (1999).** *Quesos típicos argentinos*. Santa Fe: Centro de Publicaciones UNL.

3. Estrategias tecnológicas para acelerar la maduración y diversificar el flavor en quesos duros

En el presente capítulo se indagará en la identificación de estrategias tecnológicas destinadas a acelerar la maduración y/o diversificar el flavor de quesos duros. En primer lugar, se expondrán los estudios del impacto de distintos tratamientos físicos aplicados a la leche de elaboración (homogeneización, tratamiento térmico) o aplicados al producto final (alta presión hidrostática) en la maduración de los quesos. En particular, se analizará el efecto de los mismos sobre las actividades enzimáticas (plasmina y coagulante) y la bioquímica de la maduración: proteólisis, lipólisis, flavor y sus características sensoriales. En segundo lugar, se presentarán resultados referidos al diseño de fermentos primarios y adjuntos y su impacto en la maduración, ofreciendo la posibilidad de diseñar productos a medida.

3.1. Tratamientos físicos aplicados durante el proceso de elaboración

Ma. Ayelén Vélez, Ma. Cristina Perotti, Luciana Costabel, Mario Candiotti, Leila Pozza, Susana Palma, Carlos Meinardi, Verónica Wolf, Carina Bergamini y Erica Hynes

Pretratamiento de la leche de quesería: agitación mecánica y homogeneización

La manufactura del queso consiste básicamente en un proceso de deshidratación, donde la grasa y las caseínas de la leche se concentran, y prosigue con la etapa de maduración que conduce al producto final, con características únicas de aroma, textura y flavor (McSweeney, 2004). La transformación de la cuajada en queso es consecuencia de cambios físicos y complejas reacciones químicas y bioquímicas, todos ellos de gran influencia en las características finales de los productos que involucran la difusión de sales, la evaporación del agua, los equilibrios químicos del calcio, metabolismo del lactato y citrato, degradación de las proteínas y lípidos y catabolismo de aminoácidos y ácidos grasos libres (McSweeney y Sousa, 2000).

En particular, la lipólisis es la hidrólisis enzimática de los triacilgliceroles (TAG) para dar ácidos grasos libres (AGL, desde C_{4:0} hasta C_{18:2}), glicerol, mono y diacilglicéridos. En algunos tipos de quesos la lipólisis es indeseable, pero en quesos duros italianos o en el queso Reggianito, una lipólisis moderada es deseable ya que contribuye al desarrollo del flavor

genuino (Candiotti y col., 2002; Collins y col., 2003). En este tipo de queso los agentes lipolíticos son la lipasa nativa de la leche, lipoproteína lipasa (LPL), y las enzimas de los fermentos lácticos y bacterias lácticas no pertenecientes al fermento (non-starter lactic acid bacteria, NSLAB). En la leche cruda la hidrólisis enzimática no se produce espontáneamente debido a que las enzimas lipolíticas y su sustrato se encuentran compartimentalizados: los TAG dentro de glóbulos rodeados por una membrana (milk fat globule membrane, MFGM) y la LPL asociada a la fase proteica (Collins y col., 2003). Sin embargo, los procesos físicos aplicados a la leche antes de la elaboración de quesos (agitación mecánica, bombeo, homogeneización) pueden disminuir la acción protectora de la membrana del glóbulo graso y favorecer la lipólisis (Evers, 2004).

Con el objeto de incrementar las reacciones de lipólisis en quesos actuando sobre la compartimentalización sustrato-grasa-enzimas lipolíticas, es decir, incrementando la accesibilidad de las enzimas lipolíticas a su sustrato, en el INLAIN se realizaron experiencias aplicando un tratamiento físico de agitación mecánica y bombeo a la leche de quesería (Vélez y col., 2011). No existen reportes previos de la aplicación de este tipo de pre-tratamientos a la leche para elaboración de quesos. Es por ello que, con el fin de seleccionar un protocolo adecuado, se estudiaron mezclas de leche y crema de distintos porcentajes de grasa (5 %, 15 % y 30 %) a distintas temperaturas (5, 15 y 45 °C). El daño a la membrana del glóbulo graso se estimó mediante la medida de la grasa liberada y observación microscópica. Las condiciones más apropiadas fueron 5 °C 30 % de contenido graso y agitación mecánica a 2800 rpm durante 2 min. Este tratamiento se aplicó a la elaboración de cuajadas miniatura donde se evaluó la retención de materia grasa, humedad y lipólisis. El protocolo llevado a cabo no incrementó la pérdida de grasa en el suero ni causó detrimento alguno en la coagulación y en la sinéresis de la cuajada, por lo que no hubo modificaciones en los valores de humedad; la lipólisis determinada por cromatografía de gases no se vio incrementada respecto a cuajadas controles. El pre-tratamiento de la leche se aplicó luego a la elaboración de quesos Reggianito miniatura (5L), donde además se evaluó la influencia de la pasteurización sobre la lipólisis y producción de compuestos volátiles durante la maduración (12 °C/ 90 días) (Vélez y col., 2010). Para ello, se realizó un diseño experimental en el que se evaluaron dos factores: el tratamiento térmico a dos niveles (pasteurizado y no pasteurizado; en este último se empleó una sanitización no-térmica mediante un descremado natural) y el tratamiento físico (crema agitada y no agitada). Los factores estudiados no influyeron sobre el contenido de ácidos grasos libres totales ya que el nivel de lipólisis global se incrementó

de manera similar durante la maduración en todos los quesos, hayan sido elaborados con leche cruda o pasteurizada, y con tratamiento mecánico de agitación o no. En cuanto al perfil de AGL, los ácidos de cadena corta (C4:0–C8:0) fueron significativamente afectados siendo mayor la proporción en los quesos elaborados con leche cruda. Este incremento puede ser atribuido tanto a la acción de la LPL como a las enzimas lipolíticas microbianas y reviste importancia ya que estos ácidos grasos tienen una influencia directa en el flavor. Además, en ausencia de tratamiento térmico y en algunos casos bajo condiciones que favorecieron la descompartimentalización enzima–sustrato, se produjeron cantidades incrementadas de compuestos volátiles derivados de la grasa como 2–heptanona y 2–nonanona, hexanoato de etilo, butanoato de etilo y butanoato de isoamilo. De esta experiencia, pudo apreciarse que el pre–tratamiento de la leche de elaboración por agitación tuvo un impacto bajo en la lipólisis ya que sólo en algunos casos fue significativo y siempre interaccionando con el tratamiento térmico; además, quedó en evidencia que los cambios favorables en lipólisis y producción de aromas derivados de la grasa se obtuvieron sólo en presencia de leche cruda.

Frente a los resultados obtenidos se decidió profundizar el estudio acerca de la accesibilidad enzima–sustrato mediante una nueva experiencia de elaboración de miniquesos, en los que el tratamiento de desestabilización del glóbulo graso fuera más energético. Esta consistió en la aplicación de una etapa de homogeneización de la fracción grasa de la leche de elaboración, utilizando en todos los casos leche cruda (Vélez y col., 2017). El principio básico de la homogeneización consiste en provocar la disrupción de los glóbulos grasos mediante el pasaje de la leche a presión por un orificio de pequeño diámetro. La brusca descompresión posterior provoca torbellinos que generan un esfuerzo de corte elevado y eventualmente cavitación, fenómenos que conllevan la disrupción de las gotas de grasa y reducción del tamaño, con el concomitante aumento de la superficie o área total de la interfase grasa/agua, lo que implica la formación de una nueva membrana —membrana artificial o de reposición—, que consiste en restos de membrana nativa y otros componentes (micelas de caseínas, proteínas del suero) que se adsorben en la interfase. Por lo tanto, este proceso favorecería la accesibilidad a la grasa a las enzimas lipolíticas (Walstra y col., 1999; Kelly y col., 2008).

A diferencia del tratamiento mecánico, existen antecedentes de la aplicación de homogeneización a la leche de quesería en algunas tecnologías particulares con el fin de acelerar la lipólisis para mejorar el flavor, como en el caso de los quesos madurados con mohos (Johnson, 2011). Por otro lado, también se ha utilizado para variedades de quesos con bajo contenido de

grasa con el fin de mejorar la textura, obteniendo mayor humedad y quesos de cuerpo más suave o cremoso. Sin embargo, no hay informes previos de este procedimiento aplicado en quesos duros.

En los ensayos desarrollados en el INLAIN se observó un aumento inicial significativo de la concentración total promedio de los ácidos grasos libres en quesos elaborados con crema homogeneizada (H) con respecto a los quesos sin aplicar homogeneización (controles, C). En efecto, en los quesos elaborados con leche homogeneizada se alcanzaron niveles máximos de lipólisis en los primeros días, mientras que en los quesos controles dichos niveles se incrementaron gradualmente durante la maduración. En cuanto al perfil de ácidos grasos cortos y medios, a los 3 días las concentraciones de los ácidos grasos fueron superiores en los quesos H, siendo el C10:0 el más abundante. En los quesos, las concentraciones de estos ácidos fueron similares entre sí. A los 90 días se observó una diferenciación en el perfil con respecto al inicial ya que el ácido graso más abundante en los quesos C y H fue el C4:0. Mientras que C4:0, C6:0 y C8:0 presentaron valores similares en C y H, C10:0 y C12:0 mostraron concentraciones significativamente superiores en H. Al igual que el aumento inicial de lipólisis encontrado en los quesos homogeneizados, estas diferencias en los ácidos grasos en particular se explican con la mayor accesibilidad lograda para las enzimas lipolíticas a su sustrato, especialmente la LPL que se encuentra activa en quesos de leche cruda. Al final de la maduración, los niveles de ácidos grasos libres totales eran similares en todos los productos. Estos resultados indican que la estrategia de aumento de contacto grasa–enzimas lipolíticas fue exitosa para acelerar las reacciones enzimáticas de lipólisis. En cuanto a los compuestos volátiles, se observó que algunos derivados del catabolismo de los AGL tales como hexanal, heptanal, nonanal y metilcetonas (C5 a C9), se formaron preferentemente en quesos elaborados con leche homogeneizada, en diferentes tiempos de maduración.

Modificaciones en la tecnología de elaboración: lavado, tipo de enzima coagulante y cocción de la cuajada

La proteólisis es el conjunto de reacciones de hidrólisis que tiene lugar sobre las caseínas intactas y sobre los péptidos derivados de ellas, y confieren a los quesos propiedades únicas de sabor, textura y aroma. Durante la maduración de quesos, la hidrólisis inicial de las caseínas es producida por el coagulante y por la enzima nativa plasmina, lo cual resulta en la formación de péptidos largos que luego son degradados por enzimas de la microflora perteneciente y no perteneciente al fermento (Chitpinitiyol

y Crabbe, 1998). La formación de péptidos y de aminoácidos libres contribuye al flavor, por actuar como precursores de compuestos de gran impacto (Upadhyay y col., 2004a).

La plasmina (EC 3.4.21.7) es una serina proteinasa derivada de la sangre; su pH y temperatura óptimos son 7,5 y 37°C, respectivamente. En la leche, preferentemente hidroliza la β -caseína en γ -caseínas, pero también puede hidrolizar α_{s2} -caseína (Rampilli y Raja, 1998). La plasmina pertenece a un sistema complejo que incluye la enzima activa, su precursor inactivo plasminógeno, activadores de plasminógeno y 2 inhibidores: el inhibidor de la plasmina y los inhibidores de los activadores del plasminógeno. Mientras que los inhibidores de la plasmina están localizados en la fracción de suero de leche, la plasmina está predominantemente unida a las micelas de caseína (Grufferty y Fox, 1988). La estabilidad térmica de la plasmina es relativamente alta dado que se requiere de un tratamiento térmico a 80°C durante 10 minutos para completar la inactivación de la misma; por el contrario, los inhibidores son termolábiles (Somers y Kelly, 2002). De esta manera, la contribución de la plasmina a la hidrólisis primaria de las caseínas es más pronunciada en quesos de pasta cocida (Sousa y col., 2001; Somers y Kelly, 2002).

Debido a la importancia de la plasmina en la maduración de diversos tipos de quesos, varios grupos de investigación han desarrollado estudios basados en el incremento de la concentración de la misma para acelerar este proceso. Entre distintas alternativas, se destaca el agregado de plasmina exógena a la leche de elaboración. Farkye y Fox (1992) consiguieron al final de la maduración de queso Cheddar un 20% más de nitrógeno soluble. Somers y col. (2002) observaron una mayor hidrólisis de la β -caseína en queso Mozzarella y O'Farrell y col. (2002) verificaron una mayor proteólisis primaria en quesos madurados en superficie. Otra estrategia consiste en lograr un aumento de la concentración de plasmina en el queso por medio de la activación del plasminógeno agregando uroquinasa. Esta técnica ha sido ensayada sobre quesos Suizos (Bastian y col., 1997) y Cheddar (Barrett y col., 1999; Milesi y col., 2008), conduciendo a un aumento de la proteólisis primaria. La estreptoquinasa, una proteasa exocelular producida por *Streptococcus uberis*, forma un complejo con el plasminógeno que induce a un cambio conformacional que activa la plasmina sin mediar una escisión proteolítica (Johnsen y col., 2000). Según Upadhyay y col. (2004b), la estreptoquinasa adicionada a la leche de elaboración de queso Cheddar activó la mayor parte del plasminógeno, lo que derivó en una aceleración de la proteólisis, como lo indicaron el aumento de nitrógeno soluble a pH 4,6 y la hidrólisis de la β caseína. Somers y Kelly (2002) estudiaron el efecto del tratamiento térmico de la leche y de la temperatura de cocción sobre quesos miniatura, concluyendo que la coc-

ción tiene un efecto positivo importante sobre la actividad de la plasmina pero que no sucede lo mismo con la temperatura de tratamiento térmico previo de la leche. Exceptuando este trabajo, existe escasa información sobre las operaciones de la fabricación del queso que puedan llevar a un incremento de la actividad de la plasmina.

En cuanto al coagulante, consiste principalmente en quimosina pura, que es una proteinasa aspártica ácida (EC 3.4.23.4) con un pH óptimo de aproximadamente 4,0 y una actividad de coagulación de la leche altamente específica a pH 6,7. La cantidad residual de enzima coagulante que permanece en la cuajada después del drenaje del suero es de hasta el 15 % ya que el resto se pierde en el suero (Sousa y col., 2001). La retención de la actividad coagulante en la cuajada depende de factores tecnológicos como el pH de drenaje, la temperatura de cocción y la humedad del queso (Jacob y col., 2010). Durante la maduración del queso, la acción proteolítica de la quimosina sobre la caseína α_{S1} libera los péptidos α_{S1} (f1–23) y α_{S1-1} (f24–199) que se observan en una etapa temprana de la maduración en quesos blandos ya que retienen grandes cantidades de suero y la cuajada no se somete a tratamiento térmico (Hynes y col., 2001; Bansal y col., 2007). Existe cierta incertidumbre con respecto al grado de inactivación de la quimosina en los quesos cocidos. Se sabe que cantidades más bajas de cuajo se retienen en los quesos duros debido a su menor contenido de humedad y a la desnaturalización causada por la temperatura. A pesar de estos hechos, se ha informado que la inactivación del coagulante en los quesos cocidos es parcial o reversible (Hayes y col., 2002; Hynes y col., 2004; Costabel y col., 2015).

Con el fin de planear estrategias para intensificar las reacciones de proteólisis, en el INLAIN se realizaron ensayos para evaluar las siguientes variables: pH de drenado de suero, temperatura de cocción de la cuajada e incorporación de una etapa de lavado de la cuajada (Vélez y col., 2015b, 2016). Estos parámetros se evaluaron, en una primera etapa, en pseudocujadas modelo mediante el análisis de la actividad de las enzimas plasmina y coagulante y su contribución a la proteólisis. El aumento del pH y el lavado de la cuajada afectaron positivamente la actividad de la enzima plasmina y aumentaron su impacto en la proteólisis, lo que fue evidenciado en un incremento de péptidos solubles en la zona del cromatograma donde eluyen los péptidos hidrofóbicos. Por el contrario, no se detectó una influencia de la temperatura de cocción en la acción de la enzima. En cuanto al plasminógeno, su actividad no se modificó. Además, se detectó que la acción del coagulante se incrementó por la disminución del pH de drenado de suero y de la temperatura de cocción, y que el lavado no modificó significativamente su acción. Estos resultados se correspondieron con incrementos en la proteólisis detec-

tados tanto por perfiles de péptidos solubles como por electroforesis y fracciones nitrogenadas. El tiempo de almacenamiento de las pseudocujadas, establecido en 7 días, fue suficiente para realizar un *screening* preliminar de los tratamientos favorables a la acción de la enzima plasmina y coagulante. En una segunda etapa, se evaluaron estrategias para intensificar los niveles de proteólisis en queso duro utilizando un modelo de queso miniatura, madurado 90 días a 12 °C. Se estudió la influencia de la temperatura de cocción (50 y 56 °C) y el tipo de enzima coagulante recombinante utilizada (quimosina bovina y quimosina de camello) (Costabel y col., 2015). Se verificó que la actividad coagulante residual fue significativamente menor en los quesos sometidos a una temperatura de cocción más alta mientras que la actividad de la plasmina fue similar a las dos temperaturas, corroborándose lo observado en el modelo de las pseudocujadas. Los perfiles electroforéticos de los quesos de 50 °C mostraron la fracción α_{s1} -I desde el inicio de la maduración, mientras que en los de 56 °C recién se apreció a los 50 días. Estos resultados se correlacionaron con los obtenidos para los perfiles peptídicos. A medida que avanzó la maduración de los quesos, se observó un incremento de la proteólisis, que fue mayor en los quesos de 50 °C. Asimismo, también se verificó que la actividad coagulante tendió a igualarse al final de la maduración en los quesos obtenidos a diferentes temperaturas de cocción lo que sugiere, como ya fue mencionado anteriormente, una reactivación de la enzima. El tipo de enzima coagulante tuvo un impacto diferente en la proteólisis de los quesos únicamente cuando se utilizó una cocción a 56 °C. A esta temperatura la quimosina bovina mostró una mayor actividad proteolítica, evidenciada en los perfiles peptídicos y en los niveles de las fracciones nitrogenadas.

Los efectos de la temperatura y lavado verificados en los estudios descritos anteriormente también se observaron en quesos de distintos tipos: Cremoso (blando), Pategrás (semiduro) y Reggianito (duro), elaborados a escala industrial y que se maduraron en nuestro Instituto (Vélez y col., 2015a). Los resultados registrados se relacionaron principalmente con la temperatura de cocción ya que su disminución incrementó la actividad coagulante, siendo superior en Cremoso, intermedia en Pategrás y baja en Reggianito. En cuanto al sistema plasmina/plasminógeno, se observó una mayor actividad del plasminógeno inactivo en los quesos Reggianito y Cremoso mientras que en el queso Pategrás el nivel del zimógeno fue muy bajo, probablemente porque la activación del mismo se llevó a cabo durante la elaboración del queso cuya tecnología incluye un paso de lavado de cuajada. Tal como se mencionó anteriormente, este procedimiento eliminaría los inhibidores de los activadores del plasminógeno. De hecho, la mayor actividad de la

plasmina se encontró en el queso Pategrás, lo que indica que el lavado de la cuajada combinado con el tratamiento térmico suave de la misma favoreció la activación del plasminógeno. Sin embargo, el ambiente definido por la matriz de queso Reggianito resultó más adecuado para mantener la estabilidad de la actividad de la plasmina a lo largo de la maduración. Los resultados fueron consistentes con la proteólisis registrada en los perfiles de electroforesis y las fracciones nitrogenadas.

Validación de la estrategia tecnológica seleccionada a escala piloto

Finalmente, se diseñó una tecnología modificada teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los modelos, que se validó a escala piloto. Se seleccionaron los cambios que resultaron más favorables para incrementar las actividades enzimáticas de interés y se evaluó su influencia sobre la proteólisis, lipólisis y la calidad sensorial de los quesos obtenidos. Se realizaron dos elaboraciones en paralelo, una siguiendo la tecnología tradicional para quesos duros de pasta cocida (leche pasteurizada, temperatura de cocción 52 °C y sin aplicación de lavado a la cuajada) y otra aplicando la tecnología modificada (leche cruda, fracción grasa —20%— homogeneizada, temperatura de cocción 50 °C e incluyendo una etapa de lavado). Los quesos obtenidos con la tecnología modificada mostraron una maduración acelerada, basada tanto en un incremento en la velocidad de lipólisis como en la velocidad de hidrólisis de las caseínas, especialmente debido a la acción del coagulante. En el perfil de compuestos volátiles de estos quesos predominaron aquellos derivados del catabolismo de la grasa, lo cual se correspondió con el análisis sensorial. Los quesos no mostraron rancidez, y el flavor genuino y picante se desarrolló más rápido y sin defectos. Los quesos se retiraron de la cámara de maduración (12 °C) a los 60 días, tiempo al que ya alcanzaron un flavor completamente maduro.

Referencias bibliográficas

- Bansal, N.; Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (2007).** Factors affecting the retention of rennet in cheese curd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 9219–9225.
- Barrett, F.M.; Kelly, A.L.; McSweeney, P.L.H. y Fox, P.F. (1999).** Use of exogenous urokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 9(7), 421–427.
- Bastian, E.D.; Lo, C.G. y David, K.M.M. (1997).** Plasminogen Activation in Cheese Milk: Influence on Swiss Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, 80(2), 245–251.
- Candioti, M.C.; Hynes, E.; Quiberoni, A.; Palma, S.B.; Sabbag, N. y Zalazar, C.A. (2002).** Reggiano cheese: Influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. *International Dairy Journal*, 12(11), 923–931.
- Collins, Y.F.; McSweeney, P.L.H. y Wilkinson, M.G. (2003).** Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13(11), 841–866.
- Costabel, L.M.; Bergamini, C.V.; Pozza, L.; Cuffia, F.; Candioti, M.C. y Hynes, E. (2015).** Influence of chymosin type and curd scalding temperature on proteolysis of hard cooked cheeses. *Journal of Dairy Research*, 82(3), 375–384.
- Chitpintyol, S. y Crabbe, M.J.C. (1998).** Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, 61(4), 395–418.
- Evers, J.M. (2004).** The milkfat globule membrane – Compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. *International Dairy Journal*, 14(8), 661–674.
- Farkye, N. y Fox, P.F. (1992).** Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *Journal of Dairy Research*, 59(2), 209–216.
- Grufferty, M.B. y Fox, P.F. (1988).** Milk alkaline proteinase. *Journal of Dairy Research*, 55(4), 609–630.
- Hayes, M.G.; Oliveira, J.C.; McSweeney, P.L.H. y Kelly, A.L. (2002).** Thermal inactivation of chymosin during cheese manufacture. *Journal of Dairy Research*, 69(2), 269–279.
- Hynes, E.; Delacroix-Buchet, A. y Zalazar, C. (2001).** Influence of milk-clotting enzyme in proteolysis during ripening of Cremoso Argentino cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56(3), 208–212.
- Hynes, E.R.; Aparo, L. y Candioti, M.C. (2004).** Influence of residual milk-clotting enzyme on α s1 casein hydrolysis during ripening of Reggiano Argentino cheese. *Journal of Dairy Science*, 87(3), 565–573.
- Jacob, M.; Jaros, D. y Rohm, H. (2010).** The effect of coagulant type on yield and sensory properties of semihard cheese from laboratory, pilot- and commercial-scale productions. *International Journal of Dairy Technology*, 63(3), 370–380.
- Johnsen, L.B.; Rasmussen, L.K.; Petersen, T.E.; Etzerodt, M. y Fedosov, S.N. (2000).** Kinetic and structural characterization of a two-domain streptokinase: Dissection of domain functionality. *Biochemistry*, 39(21), 6440–6448.
- Johnson, M.E. (2011).** Preparation of cheese milk. En Roginski H. F. y Fox P. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Science*. Londres: Elsevier Academic Press, 544–551.
- Kelly, A.L.; Huppertz, T. y Sheehan, J.J. (2008).** Pre-treatment of cheese milk: Principles and developments. *Dairy Science and Technology*, 88(4/5), 549–572.
- McSweeney, P.L.H. (2004).** Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2/3), 127–144.
- McSweeney, P.L.H. y Sousa, M.J. (2000).** Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 80(3), 293–324.
- Milesi, M.M.; McSweeney, P.L.H. y Hynes, E.R. (2008).** Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type. *Journal of Applied Microbiology*, 105(3), 884–892.
- O'Farrell, I.P.; Sheehan, J.J.; Wilkinson, M.G.; Harrington, D. y Kelly, A.L. (2002).** Influence of addition of plasmin or mastitic milk to cheesemilk on quality of smear-ripened cheese. *Lait*, 82(3), 305–316.

- Rampilli, M. y Raja, V. (1998).** Osservazioni sull'attività di plasmina e plasminogeno nel formaggio. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 49(6), 341–350.
- Somers, J.M.; Guinee, T.P. y Kelly, A.L. (2002).** The effect of plasmin activity and cold storage of cheese milk on the composition, ripening and functionality of mozzarella-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 55(1), 5–11.
- Somers, J.M. y Kelly, A.L. (2002).** Contribution of plasmin to primary proteolysis during ripening of cheese: Effect of milk heat treatment and cheese cooking temperature. *Lait*, 82(2), 181–191.
- Sousa, M.J.; Ardó, Y. y McSweeney, P.L.H. (2001).** Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11(4/7), 327–345.
- Upadhyay, V.K.; McSweeney, P.L.H.; Magboul, A.A.A. y Fox, P.F. (2004a).** Proteolysis in cheese during ripening. En Fox P, McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Timothy P. (Coords.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1, 391–433, VIII.
- Upadhyay, V.K. Sousa; M.J., Ravn, P.; Israelsen, H.; Kelly, A.L. y McSweeney, P.L. H. (2004b).** Use of exogenous streptokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Lait*, 84(6), 527–538.
- Vélez, M.A.; Bergamini, C.V.; Ramonda, M.B.; Candiotti, M.C.; Hynes, E.R. y Perotti, M.C. (2015a).** Influence of cheese making technologies on plasmin and coagulant associated proteolysis. *LWT – Food Science and Technology*, 64(1), 282–288.
- Vélez, M.A.; Hynes, E.R.; Meinardi, C.A.; Wolf, V.I. y Perotti, M.C. (2017).** Cheese milk low homogenization enhanced early lipolysis and volatiles compounds production in hard cooked cheeses. *Food Research International*, 96, 215–225.
- Vélez, M.A.; Perotti, M.C.; Candiotti, M.C.; Bergamini, C.V. y Hynes, E.R. (2016).** Plasmin and coagulant activities in a minicurd model system: Study of technological parameters. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 7053–7062.
- Vélez, M.A.; Perotti, M.C.; Rebecchi, S.R. y Hynes, E.R. (2015b).** Short communication: A new minicurd model system for hard cooked cheeses. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3679–3683.
- Vélez, M.A.; Perotti, M.C.; Rebecchi, S.R.; Meinardi, C.A., Hynes, E.R. y Zalazar, C.A. (2011).** Effect of mechanical treatments applied to milk fat on fat retention and lipolysis in minicurds. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2), 227–231.
- Vélez, M.A.; Perotti, M.C.; Wolf, I.V.; Hynes, E.R. y Zalazar, C.A. (2010).** Influence of milk pretreatment on production of free fatty acids and volatile compounds in hard cheeses: Heat treatment and mechanical agitation. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4545–4554.
- Walstra, P.; Geurts, T.J.; Noomen, A.; Jellema, A. y van Boekel, M.A. (1999).** Homogenization. En Fennema, O.R., Karel, M., Sanderson, G.W., Tannenbaum, S.R., Walstra, P., Whitaker, J.R. (Eds.). *Dairy Technology*. Nueva York: Marcel Dekker, 245–264.

3.2. Tratamientos físicos aplicados durante el proceso de maduración

Luciana Costabel, Carina Bergamini, Erica Hynes y Sergio Vaudagna

Tratamiento con APH en quesos

El tratamiento con alta presión hidrostática (APH) a los quesos se plantea como una estrategia innovadora. El objetivo fundamental de la aplicación de este tratamiento a los mismos es acelerar el extenso período de maduración en el cual se producen las transformaciones bioquímicas de las proteínas, las grasas y los glúcidos que darán lugar a la textura, flavor y funcionalidad de las diferentes variedades de quesos (O'Reilly y col., 2001; San Martín González y col., 2007).

El interés por el estudio del efecto del tratamiento con APH sobre quesos se inicia por la prometedora patente de Yokohama y col. (1992) en la cual se evidencia que quesos Cheddar que fueron expuestos a presiones de 50 MPa durante tres días a 25°C presentaron una concentración de aminoácidos libres y un flavor comparable a quesos comerciales con seis meses de maduración. A partir de este estudio comenzaron a realizarse otras investigaciones en quesos Cheddar (O'Reilly y col., 2000, 2001), Gouda (Messens y col., 1999) y queso duro de cabra (Saldo y col., 2001), utilizando tratamientos similares a los aplicados por Yokohama y col. En general, estos estudios concluyeron que la aplicación de esas combinaciones presión-tiempo tuvo relativamente poco efecto sobre la maduración de los quesos. Esto en parte

fue atribuido a que en el estudio de Yokohama y col. se utilizaron niveles 10 veces mayores del fermento que los utilizados comúnmente para la elaboración de queso Cheddar, lo que seguramente influyó en la aceleración de la maduración observada. Comienzan entonces a plantearse otros estudios en diferentes tipos de queso variando las combinaciones presión–tiempo y evaluando el impacto en diversos aspectos relacionados a la maduración (Martínez–Rodríguez y col., 2012).

Dentro de los quesos duros, numerosos estudios se han enfocado en queso Cheddar y quesos de oveja. Sin embargo, en el caso de quesos duros de pasta cocida, los cuales tienen los períodos de maduración más largos, son escasos los estudios publicados.

Tratamiento con ApH en queso Reggiano. Impacto en los recuentos microbiológicos y perfiles de maduración

En un estudio realizado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) en queso Reggiano, se evaluó el impacto de la aplicación del tratamiento con ApH y el tiempo de maduración sobre la composición, el pH, los recuentos microbiológicos, la actividad de enzimas proteolíticas que intervienen en la maduración, la proteólisis primaria y secundaria, la textura, los parámetros cromáticos y los atributos sensoriales del queso (Costabel, 2015; Costabel y col., 2016). Para ello, se elaboraron quesos Reggiano miniatura a los cuales se les aplicó presiones de 100 ó 400 MPa durante 5 ó 10 min a 20°C el día posterior a la elaboración. Algunos quesos no fueron tratados con ApH, los que se consideraron como controles. Todos los quesos se maduraron durante 90 días a 12°C.

Composición química, pH y recuentos microbiológicos

La composición química y el pH de los quesos a lo largo de la maduración no resultaron afectados por el tratamiento con ApH. Los recuentos de lactobacilos termófilos inmediatamente luego de la aplicación del tratamiento con ApH fueron inferiores en los quesos tratados a 400 MPa, con independencia del tiempo de tratamiento. Se informaron resultados similares en quesos Cheddar al aplicar tratamientos con ApH utilizando presiones a partir de 400 MPa (Wick y col., 2004; Rynne y col., 2008; Ozturk y col., 2013) en quesos madurados por mohos (Voigt y col., 2010; Calzada y col., 2014),

en quesos de cabra (Saldo y col., 2000) y en quesos de oveja (Moschopoulou y col., 2010). La disminución de los recuentos microbiológicos por el tratamiento con APH puede estar asociada a una lisis celular durante la cual se produce la liberación del pool enzimático intracelular, lo que puede tener un efecto en los perfiles de maduración (Wick y col., 2004).

El efecto del tratamiento con APH sobre los microorganismos depende de las condiciones de proceso (nivel de presión aplicada, tiempo de mantenimiento a la presión de trabajo, temperatura), de las características del alimento (composición, pH y actividad de agua) y del tipo de microorganismo (género, especie y cepa) (Cheftel y col., 1995; Huppertz y col., 2006). A diferencia de los sistemas modelos, en los alimentos las bacterias pueden recuperarse luego del tratamiento con APH, lo que frecuentemente es atribuido a un efecto protector por parte de la matriz alimentaria (Wick y col., 2004).

Actividad de enzimas proteolíticas y nivel de proteólisis

Se ha informado que la aplicación de un tratamiento APH en etapas tempranas de la maduración puede afectar los parámetros de maduración de los quesos a través de la modulación de las reacciones enzimáticas (Messens y col., 1999; O'Reilly y col., 2000). El rango en el cual la presurización puede pasar de mostrar efectos positivos a negativos en la actividad neta de una enzima depende no sólo de las características moleculares de la enzima y de la matriz alimentaria en la que se encuentra sino también de los otros componentes del sistema enzimático de interés (por ejemplo, de la presencia de precursores e inhibidores enzimáticos en la matriz alimentaria). En queso Reggiano, la actividad de la plasmina se incrementó por la aplicación de APH a 400 MPa durante 10 min. Esto no había sido informado previamente en ningún estudio. En cuanto a la actividad de la enzima coagulante residual, esta no se vio afectada por el tratamiento con APH, lo que coincide con lo informado en trabajos previos (Messens y col., 1999; Rynne y col., 2008).

Los indicadores de proteólisis evaluados demostraron que esta transformación bioquímica fue afectada por el tratamiento con APH. La fracción de nitrógeno soluble a pH 4,6 se incrementó en los quesos tratados a 400 MPa, independientemente del tiempo de tratamiento. Asimismo, en los perfiles de electroforesis estos quesos mostraron una mayor intensidad de las fracciones de α_{s1} -I y γ -caseínas especialmente a los 45 días de maduración. El aumento de la proteólisis primaria por efecto del tratamiento con APH también fue observado por otros autores en diferentes variedades de queso. En este sentido, Rynne y col. (2008) encontraron un comportamiento simi-

lar al observado en este trabajo en quesos Cheddar tratados a 400 MPa durante 10 min. También en otros trabajos, a presiones próximas a 400 MPa, se ha observado un incremento en la velocidad de la proteólisis primaria en queso de cabra (Saldo y col., 2000), queso de oveja (Juan y col., 2007) y queso Gouda (Messens y col., 2001). Asimismo, los perfiles peptídicos de las muestras tratadas a mayor presión se diferenciaron del resto, lo que evidenció una mayor proteólisis secundaria en los quesos tratados a 400 MPa. También se detectó un leve incremento en los niveles de aminoácidos libres totales con el aumento de la presión aplicada. Los resultados observados en los quesos tratados a 400 MPa sugieren una mayor actividad de peptidasas microbianas, lo que se correlaciona con la disminución de los recuentos iniciales y probable autólisis de los lactobacilos termófilos del fermento.

Textura, parámetros cromáticos y atributos sensoriales

La aplicación del tratamiento con aPH a quesos Reggianito tuvo una influencia significativa en los parámetros deformación y esfuerzo a la fractura. Ambos presentaron un valor mayor en los quesos tratados a 400 MPa al inicio de la maduración (independientemente del tiempo de mantenimiento de la presión). El efecto fue reversible ya que con el avance de la maduración no se conservó este efecto del tratamiento. En quesos Cheddar tratados a 400 MPa durante 10 min (Rynne y col., 2008) y en quesos de oveja tratados a 300 MPa durante 10 min (Juan y col., 2008) se observó el mismo incremento en estos parámetros. Sin embargo, sólo en los quesos Cheddar el efecto se mantuvo a lo largo de toda la maduración. Los mayores valores en los parámetros evaluados en los quesos inmediatamente luego del tratamiento a 400 MPa pueden deberse a un cambio conformacional en ese momento puntual que se revierte con el avance de la maduración, durante la cual se produce una re-orientación y/o formación de nuevas uniones lo que resulta en similares valores de los parámetros de textura en los quesos presurizados que en los controles. En este sentido, algunos investigadores plantearon que durante el tratamiento con aPH se producen cambios en el equilibrio entre el calcio libre (soluble) y el calcio unido a las caseínas (coloidal). Cuando los quesos se someten a presión, las asociaciones calcio-caseína se rompen y el calcio migra a la fase soluble. Cuando se libera la presión, el equilibrio se restablece pero las asociaciones entre las caseínas no resultan las mismas que las iniciales aunque, con el tiempo, las diferencias en textura entre los quesos tratados y no tratados disminuyen (Saldo y col., 2000).

Con respecto al análisis del perfil de textura (TPA), se observó un efecto en los parámetros elasticidad y cohesividad, presentando todos los quesos tratados a 400 MPa menores valores de estos parámetros a todos los tiempos de maduración analizados. Es probable que la disminución de estos parámetros en los quesos tratados con APH a la mayor presión, se relacione con la mayor proteólisis evidenciada en los mismos. Similar efecto en la elasticidad fue observado en quesos semiduros cuando se aplicaron presiones de 200 y 400 MPa (Koca y col., 2011) y en quesos de cabra tratados a 50 MPa durante 3 días (Saldo y col., 2001).

El tratamiento con APH no modificó los parámetros cromáticos. Del análisis de la literatura existente y de los resultados del trabajo realizado en queso Reggianito, surge que el efecto del tratamiento con APH sobre el color depende de las características particulares de cada tipo de queso y del tiempo de mantenimiento durante el cual se aplica el tratamiento.

Con respecto a la evaluación sensorial se observó que a los 45 días de maduración los quesos Reggianito tratados a 400 MPa durante 5 y 10 min tuvieron mayor intensidad para los atributos gusto salado y flavor típico y presentaron una menor intensidad para el atributo olor característico en comparación con el control y con las muestras tratadas a 100 MPa. En un estudio previo, en el cual se evaluaron los atributos sensoriales que caracterizan a un queso Reggianito maduro, se encontró que el flavor genuino y gusto salado fueron los más importantes (Ceruti y col., 2014). Por lo tanto, los atributos que caracterizan a un queso maduro fueron más intensos en los quesos tratados a 400 MPa a los 45 días de maduración que en los controles y los tratados a 100 MPa.

A través de este estudio, se puede concluir que la aplicación de un tratamiento con APH a 400 MPa a quesos Reggianito al inicio de la maduración permitió acelerar la maduración de los mismos, lo cual fue demostrado por un incremento de la proteólisis y peptidólisis en los quesos. Además, los quesos tratados a esa presión mostraron una aceleración en el desarrollo de los atributos sensoriales característicos de un queso maduro.

Referencias bibliográficas

- Calzada J.; del Olmo, A.; Picon, A.; Gaya, P. y Nuñez, M. (2014).** Effect of high-pressure-processing on the microbiology, proteolysis, texture and flavour of Brie cheese during cheese ripening and refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 37, 64–73.
- Ceruti, R. J.; Zorrilla, S.E.; Sabbag, N.G.; Costa, S.C. y Sihufe, G.A. (2014).** Effect of increased initial ripening temperature on the sensory characteristics of Reggiano cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 67, 1–8.
- Costabel, L.M. (2015).** Estrategias tecnológicas para el incremento de la proteólisis y peptidólisis de quesos duros (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional del Litoral.
- Costabel, L.M.; Bergamini, C.; Vaudagna, S.; Cuatrin, A.; Audero, G. y Hynes, E. (2016).** Effect of high-pressure treatment on hard cheese proteolysis. *Journal of Dairy Science*, 99, 4220–4232.
- Cheftel, J.C. (1995).** High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology*, 1, 75–90.
- Huppertz, T.; Smiddy, M.; Upadhyay, V.K. y Kelly, A.L. (2006).** High-pressure-induced changes in bovine milk: a review. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 58–66.
- Hynes, E.R.; Aparo, L. y Candiotti, M.C. (2004).** Influence of residual milk-clotting enzyme on α -s1 casein hydrolysis during ripening of Reggiano Argentinian cheese. *Journal of Dairy Science*, 87, 565–573.
- Juan, B.; Ferragut, V.; Buffa, M.; Guamis, B. y Trujillo, A.J. (2007).** Effects of high pressure on proteolytic enzymes in cheese: relationship with the proteolysis of ewe milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 90, 2113–2125.
- Juan, B.; Ferragut, V.; Guamis, B. y Trujillo, A.J. (2008).** The effects of high-pressure treatment at 300 MPa on ripening of ewe's milk cheese. *International Dairy Journal*, 18, 129–138.
- Koca, N.; Balasubramaniam, V.M. y Harper, W.J. (2011).** High-Pressure Effects on the Microstructure, Texture, and Color of White-Brined Cheese. *Journal of Food Science*, 76, 399–404.
- Martínez-Rodríguez, Y.; Acosta-Muñiz, C.; Olivas, G.I.; Guerrero-Beltrán, J.; Rodrigo-Aliaga, D. y Sepúlveda, D.R. (2012).** High Hydrostatic Pressure processing of cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 399–416.
- Messens, W.; Estepas-García, J.; Dewettinck, K. y Huyghebaert, A. (1999).** Proteolysis of high-pressure-treated Gouda cheese. *International Dairy Journal*, 9, 775–782.
- Messens, W.; Foubert, I.; Dewettinck, K. y Huyghebaert, A. (2001).** Proteolysis of high-pressure-treated mould-ripened cheese. *Milchwissenschaft*, 56, 201–204.
- Moschopoulou, E.; Anisa, T.; Katsaros, G.; Taoukis, P. y Moatsou, G. (2010).** Application of high-pressure on ovine brined cheese: Effect on composition and microflora throughout ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 11, 543–550.
- O'Reilly, C.E.; Kelly, A.L.; Murphy, P.M. y Beresford, T.P. (2001).** High-pressure treatment: applications to cheese manufacture and ripening. *Trends Food Science and Technology*, 12, 51–59.
- O'Reilly, C.E.; O'Connor, P.M.; Murphy, P.M.; Kelly, A.L. y Beresford, T.P. (2000).** The effect of exposure to pressure of 50 MPa on Cheddar ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 1, 109–107.
- Ozturk, M.; Govindasamy-Lucey, S.; Jaeggi J.J.; Houck, K.; Johnson, M.E. y Lucey, J. A. (2013).** Effect of various high-pressure treatments on the properties of reduced-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 96, 6792–6806.
- Rynne, N.M.; Beresford, T.P.; Guinee, T.P.; Sheehan, E.; Delahunty, C.M. y Kelly, A.L. (2008).** Effect of high-pressure treatment of 1 day-old full-fat Cheddar cheese on subsequent quality and ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 9, 429–440.
- Saldo, J.; Sendra, E. y Guamis B. (2000).** High hydrostatic pressure for accelerating ripening of Goat's milk cheese: proteolysis and texture. *Journal of Food Science*, 65, 636–640.
- Saldo, J.; Sendra, E. y Guamis B. (2001).** Hard cheese structure after a high hydrostatic pressure treatment at 50 MPa for 72 h applied to cheese after brining. *Lait*, 81, 625–635.

- San Martín-González, M.F.; Rodríguez, J.J.; Gurram, S.; Clark, S.; Swanson, B.G. y Barbosa-Cánovas, G.V. (2007).** Yield, composition and rheological characteristics of cheddar cheese made with high pressure processed milk. *LWT -Food Science and Technology*, 40, 697–705.
- Voigt, D.D.; Chevalier, F.; Qian, M.C. y Kelly, A.L. (2010).** Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 11, 68–77.
- Wick, C.; Nienaber, U.; Anggraeni, O.; Shellhammer, T.H. y Courtney, P.D. (2004).** Texture proteolysis and viable lactic acid bacteria in commercial Cheddar cheeses treated with high pressure. *Journal of Dairy Research*, 71, 107–115.
- Yokohama, H.; Sawamura, N. y Motobayashi, N. (1992).** Method for accelerating cheese ripening. European patent application EP 0 469 857 A1.
- Zalazar, C.A.; Candiotti, M.; Mercanti, D.J.; Bergamini, C.V. y Meinardi, C. (2006).** Maduración acelerada. En Reinheimer J., Zalazar C. (Eds.). *Avances en Microbiología, Bioquímica y Tecnología de quesos*. Santa Fe, Argentina: Ediciones UNL, 267–284.

3.3. Diseño de fermentos primarios y adjuntos

Facundo Cuffia, Carina Bergamini, Verónica Wolf,
Guillermo George, Erica Hynes, Ma. Cristina Perotti

Consideraciones generales

La aplicación de herramientas innovadoras que permitan mantener y mejorar la calidad del queso son tópicos de gran interés tanto para la industria como para las áreas de investigación.

Si bien el rol principal del fermento primario en tecnología quesera es metabolizar la lactosa a ácido láctico, también tiene un papel fundamental en el desarrollo del flavor durante la maduración debido a las múltiples actividades enzimáticas que presenta (Beresford y col., 2001). *L. helveticus* es una de las especies dominantes de los fermentos naturales de suero empleados generalmente en quesos duros de pasta cocida, tales como los quesos italianos (Grana Padano, Parmigiano-Reggiano) y tipo suizos (Rossetti y col., 2008; Gatti y col., 2014), así también en el queso Reggianito (Licitra y col., 2018). La variabilidad en la composición cuali/cuantitativa de la microflora de los fermentos de suero puede producir variaciones en las características químicas y organolépticas del queso y por lo tanto atentar contra la constancia de su calidad (Reinheimer y col., 1996). Sin embargo, en los últimos años el uso de fermentos comerciales congelados o liofilizados de adición directa a tina (DVS, direct-vat-addition) compuestos por cepas seleccionadas, en combinación con la acidificación química de la leche (ácidos láctico o cítrico, glucono- δ -

lactona), se ha convertido en una práctica muy difundida en la industria láctea argentina. Otra alternativa empleada consiste en inocular y preincubar estos cultivos comerciales en suero antes de su agregado a la leche de elaboración. Estudios llevados a cabo en el INLAIN han demostrado la buena performance tecnológica de esta última estrategia utilizando cepas seleccionadas autóctonas de *L. helveticus* (Candioti y col., 2002; Hynes y col., 2003; Perotti y col., 2005). Estos métodos buscan dirigir la fermentación de una manera más controlada y predecible para mejorar y estandarizar la calidad del queso.

Por otra parte, cepas seleccionadas de lactobacilos mesófilos de origen NSLAB suelen utilizarse como fermentos o cultivos adjuntos en la elaboración de quesos, con el fin de controlar la microbiota potencialmente perjudicial, mejorar, diversificar y modular el flavor y posiblemente acelerar la maduración (Beresford y col., 2001; Crow y col., 2001). Muchos antecedentes del uso de cultivos adjuntos en variedades de quesos blandos y semiduros han sido reportados (Crow y col., 2001; Milesi y col., 2009; Poveda y col., 2014); sin embargo, según nuestro conocimiento, escasos estudios se han llevado a cabo en quesos duros. El proceso de cocción al que la cuajada está expuesta en la tecnología de estos quesos y el prolongado período de maduración pueden afectar el crecimiento, viabilidad y actividades enzimáticas de las cepas mesófilas adicionadas (Hickey y col., 2007). Por lo tanto, el diseño o formulación de fermentos para quesería a partir de cepas seleccionadas (autóctonas) por sus propiedades tecnológicas y características deseables, podría ser una herramienta innovadora para lograr una producción reproducible y una mejora en las características globales del queso y además, aportaría valor agregado al producto.

Importancia de los sistemas modelo en el desarrollo de fermentos

Distintas metodologías pueden emplearse para entender, mejorar y modular diferentes aspectos de la tecnología y maduración del queso. Muchos estudios destinados a evaluar el rol de los fermentos y de otros agentes de maduración en el desarrollo del flavor y su impacto en la calidad se llevan a cabo en experiencias de elaboración a escala piloto o industrial. Si bien este método refleja lo que sucede en la matriz real, resulta difícil individualizar la acción de un determinado microorganismo en un ecosistema microbiano complejo y dinámico como el que convive en el queso. Además, requiere equipamiento específico, personal capacitado y elevados recursos económicos entre los que se contempla el capital inmovilizado por el estacionamiento del queso durante la maduración (Hunter y col., 1997). Otras opciones más económicas y que

permiten estudiar varias variables o factores (fermentos, coagulantes, enzimas, ingredientes, y otros parámetros de elaboración) en paralelo, lo constituyen los sistemas modelo que miniaturizan los procesos de fabricación del queso. Varios formatos se han ensayado con diferentes propósitos tales como suspensiones de quesos (*slurries* o extractos), pastas, mezclas y quesos elaborados a escala laboratorio (miniatura); también se ha reportado el uso de quesos preparados en condiciones microbiológicas controladas (asépticas) de manera de individualizar el efecto de un agente microbiano específico (Farkye y col., 1995; Shakeel–Ur–Rehman y col., 2001; Sgarbi y col., 2013). En el INLAIN se han desarrollado diferentes modelos casearios. Milesi y col. (2011) optimizaron un modelo de extracto de queso duro, el cual resultó ser adecuado para modelar la maduración de este tipo de queso en un tiempo más acotado. Con este modelo se valoró la contribución de lactobacilos a la proteólisis y peptidólisis (Bergamini y col., 2013) y a la producción de compuestos volátiles (Peralta y col., 2014). Asimismo, se optimizó un modelo de quesos a escala laboratorio, el cual se empleó para evaluar diferentes parámetros de la tecnología quesera (Vélez y col., 2010, 2011; Costabel y col., 2015).

A continuación se describen los resultados obtenidos en extractos de quesos y en quesos miniatura acerca de la valoración de la contribución de fermentos primarios y adjuntos de lactobacilos a la biosíntesis de flavor en quesos duros y a los perfiles de maduración, en vistas a diseñar fermentos para mejorar/diversificar/potenciar el flavor y/o controlar la calidad del producto. En particular, se estudiaron dos cepas autóctonas de *Lactobacillus helveticus* (Lh138, Lh209) y un fermento comercial denominado LhC y tres cepas autóctonas de lactobacilos mesófilos de origen NSLAB: *L. casei* 72 (L72), *L. paracasei* 90 (Lp90) y *L. plantarum* 91 (Lp91). Las cepas autóctonas pertenecen al cepario del INLAIN.

Evaluación de fermentos en extractos de quesos

Los extractos de quesos que se usaron como base para estos estudios fueron preparados a partir de quesos duros elaborados en la planta piloto del INLAIN empleando como fermento primario las cepas individuales, Lh138, Lh209 y LhC. De esta manera se obtuvo una matriz base o extracto a partir de cada uno de estos quesos, por lo que se tuvieron tres matrices con diferentes perfiles de sustratos. Los extractos se estandarizaron en contenido de sal y pH (4 %v/v, pH 5,25) y se esterilizaron. Para cada matriz se evaluó la habilidad de las tres cepas de lactobacilos mesófilos y de la cepa de termófilo que se usó como fermento para preparar el queso correspondiente, y

de las combinaciones termófilo–mesófilo para crecer y producir compuestos de flavor. Para ello, alícuotas de los extractos se inocularon con la/s cepa/s, según corresponda, en niveles suficientes para alcanzar concentraciones de 10^4 – 10^5 UFC/mL, y se incubaron a 37 °C por 14 días.

Las poblaciones de lactobacilos, tanto termófilos como mesófilos, se incrementaron a los 3 días hasta niveles de 10^6 – 10^8 UFC/mL y luego disminuyeron hacia el final de la incubación en todos los extractos; los lactobacilos mesófilos mostraron en general un mejor mantenimiento de su viabilidad en comparación a los termófilos. La mayor resistencia de los lactobacilos mesófilos frente al medio adverso presente en la matriz del queso refleja la capacidad para utilizar fuentes de energía alternativas (ácidos grasos libres, péptidos cortos, aminoácidos, citrato) en lugar de los azúcares simples (Skeie y col., 2008; Stefanovic y col., 2017), los cuales estaban ausentes en los extractos. En concordancia con la ausencia de carbohidratos fácilmente fermentables, no hubo cambios en el pH ni en el contenido de ácido láctico durante la incubación en ninguno de los extractos. Además, como era de esperar, ninguna de las cepas de lactobacilos termófilos metabolizó el citrato. Un efecto contrario se encontró en los extractos inoculados con los lactobacilos mesófilos, individualmente o en asociación con los termófilos, en donde se verificó consumo de cítrico y aumento de acético.

La producción de volátiles por cepas de *L. helveticus* ha sido escasamente evaluada en comparación con cepas de lactobacilos mesófilos y lactococos (Klein y col., 2001; Sgarbi y col., 2013). Las tres cepas de *L. helveticus* produjeron diferentes perfiles de volátiles, cuyos compuestos detectados se han reportado como característicos del volatiloma de queso Reggianito (Wolf y col., 2010). Lh209 y LhC produjeron una gran cantidad de compuestos mientras que Lh138 fue la cepa menos productora. Los perfiles de volátiles producidos por los lactobacilos mesófilos se diferenciaron claramente de aquellos obtenidos para los termófilos y, además, se observó la influencia de la matriz. Se evidenciaron varias asociaciones cooperativas termófilo–mesófilo ya que niveles incrementados en varios compuestos fueron encontrados en los extractos inoculados con la combinación de cepas en comparación a sus contribuciones individuales; el efecto matriz también se puso de manifiesto en dichas asociaciones. Estos resultados revelan que las reacciones involucradas en el desarrollo del flavor en quesos dependen de las actividades enzimáticas específicas de las cepas y de la disponibilidad de sustratos precursores en el medio para su metabolización, los cuales también pueden regular la expresión de dichas actividades (Pastink y col., 2008; Taïbi y col., 2011). En la Tabla 1 se observan los compuestos producidos por las cepas individuales y aquellos detectados en niveles incrementados en comparación con la contribución individual en los extractos inoculados con la combinación termófilo/mesófilo.

Tabla 1. Compuestos volátiles producidos por las cepas individuales de lactobacilos termófilos y mesófilos y sus combinaciones, en extractos de quesos.

Lactobacilos termófilos		Lh138	Lh209	LhC
		diacetilo 2-heptanona acetoína 3-metilbutanal	2-heptanona acetato de etilo 2-pentanol 3-metil 1-butanol 1-pentanol 2-metilbutanal 3-metilbutanal ácido butanoico	2-butanona diacetilo acetoína acetato de etilo 1-pentanol 3-metilbutanal ácido acético ácido butanoico ácido hexanoico
Lactobacilos mesófilos		Matriz usada para preparar el extracto		
		Lh138	Lh209	LhC
Lc72	<i>Individual</i>	diacetilo acetoína acetato de etilo butanoato de etilo 3-metilbutanal 2-etil 1-hexanol	2-butanona acetoína 3-metil 1-butanol 2,3- butanodiol ácido acético ácido butanoico ácido hexanoico	2-propanona acetoína acetato de etilo ácido acético ácido butanoico ácido hexanoico
	<i>Combinación termófilo/mesófilo*</i>	2-heptanona 2-nonanona etanol 3-metil 1-butanol ácido acético ácido hexanoico	—	diacetilo 2-metilbutanal 3-metilbutanal 2-pentanol
Lp90	<i>Individual</i>	2-heptanona acetoína butanoato de etilo 3-metil 1-butanol ácido acético ácido hexanoico	2-propanona 2-butanona 2-heptanona acetoína butanoato de etilo 3-metil 1-butanol 1-hexanol ácido acético ácido butanoico ácido hexanoico	etanol 3-metil 1-butanol 1-pentanol ácido acético ácido butanoico ácido hexanoico
	<i>Combinación termófilo/mesófilo*</i>	acetato de etilo 3-metil 1-butanol ácido acético ácido butanoico ácido hexanoico	acetoína 2,3- butanodiol ácido acético ácido butanoico	2-etil 1-hexanol ácido acético ácido butanoico
Lp91	<i>Individual</i>	acetoína 2-butanona acetato de etilo butanoato de etilo 3-metil 1-butanol 2-etil 1-hexanol ácido acético ácido butanoico ácido hexanoico	2-propanona 2-butanona acetoína butanoato de etilo hexanoato de etilo 3-metil 1-butanol 2,3- butanodiol ácido acético ácido butanoico	acetoína acetato de etilo 3-metil 1-butanol ácido acético ácido butanoico ácido hexanoico
	<i>Combinación termófilo/mesófilo*</i>	acetoína 2-butanona 3-metil 1-butanol ácido acético	2-propanona acetoína 2-etil 1-hexanol 1-butanol	2-propanona acetoína diacetilo 1-pentanol 2-pentanol ácido acético ácido butanoico

*Se indican aquellos compuestos para los cuales se detectaron niveles incrementados en comparación a la contribución individual de las cepas.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la selección de cepas individuales y de combinaciones de cepas, mediante la evaluación de su viabilidad y metabolitos producidos, como una herramienta para el diseño de fermentos para obtener quesos con atributos diferenciados.

Evaluación de fermentos en miniquesos

Algunas de las cepas evaluadas en los extractos fueron ensayadas en un sistema más representativo de la matriz real. De esta manera, en dos experiencias independientes se valoró la aptitud de LHC y Lh209 como fermentos primarios y la conveniencia de incluir o no Lp90 como fermento adjunto, en elaboraciones de quesos miniatura (5L). Para cada uno de los fermentos se analizó el impacto de la metodología de agregado: en forma directa (D) o preincubados por 20 h en suero estéril de quesería (P), en los perfiles de maduración. Para los quesos con Lh209 la adición directa (quesos D) consistió en la incorporación del pellet celular de Lh209 y Lp90, según corresponda, obtenidos a partir de cultivos *overnight* en MRS. En los quesos P, una alícuota del cultivo *overnight* de cada cepa, según corresponda, se inoculó e incubó en el suero. Para los quesos con LHC, la adición directa (quesos D) consistió en la incorporación de la cepa deshidratada de LHC y Lp90, según corresponda, a la leche de elaboración; en los quesos P, cada cepa deshidratada, según corresponda, se inoculó e incubó en el suero. En los quesos D se agregó un agente químico (glucono- δ -lactona o ácido láctico) a la leche de elaboración para aportar el nivel de acidez adecuada para este tipo de queso, que en los quesos P fue aportada por el medio (suero fermentado).

La población de lactobacilos, tanto termófilos como mesófilos, fue de 7,0–8,5 log UFC/g a los 7 días de maduración y los termófilos disminuyeron un orden logarítmico hacia los 90 días en todos los quesos. En cuanto a los recuentos de lactobacilos mesófilos un comportamiento diferente se evidenció según el fermento primario utilizado: una disminución de dos órdenes logarítmicos se encontró en los quesos con Lh209, mientras que incrementos de aprox. 1,5 órdenes se vieron en los quesos con LHC (para ambos métodos de preparación). Una disminución en la viabilidad de los fermentos ha sido reportada en muchas variedades de quesos y está asociada con la exposición de los cultivos a las condiciones adversas presentes en la matriz del queso (falta de nutrientes, alto nivel de sal en la humedad, potencial redox negativo, entre otros), lo que puede generar la muerte celular, permeabilización y/o lisis y liberación de enzimas (Beresford y col., 2001; Gatti y col., 2014).

En ambas experiencias, la proteólisis primaria se vio afectada por la forma de agregado de los fermentos ya que mayores niveles de la fracción NS_{4,6}/NT se encontraron en los quesos D comparativamente a los quesos P. Por su parte, una proteólisis secundaria más profunda, reflejada en mayores niveles de NSPTA/NT y en los perfiles peptídicos (incrementos de los péptidos pequeños y aminoácidos y disminución de péptidos hidrofóbicos) se encontró también en los quesos D, pero solo cuando se usó LHC como fermento primario. Por el contrario, en los quesos con Lh209 el efecto fue inverso; mayor nivel de NSPTA/NT se detectó en los quesos P. En cuanto a la influencia del agregado de Lp90, un incremento en la peptidólisis se observó en los quesos P solo en la experiencia con Lh209.

Los azúcares (lactosa, glucosa y galactosa) no fueron detectados a los 90 días en los quesos D, de ambas experiencias. Por el contrario, lactosa y galactosa se encontraron (0,1 y 0,5 g/100g, respectivamente) en los quesos P y sin adición de Lp90, cuando se usó LHC. Ligeros cambios en el pH fueron detectados: los valores fueron superiores en los quesos D cuando se usó Lh209 y en los quesos P cuando se usó LHC. El agregado de Lp90 produjo una disminución de pH solamente en los quesos con LHC, para ambas metodologías de preparación del fermento. El láctico fue el principal ácido encontrado, en niveles que rondaron 1500 mg/100 g, y su contenido fue menor en los quesos P sin Lp90 cuando se usó LHC. Estos resultados sugieren que la preincubación en suero de LHC modificó su actividad acidificante.

La incorporación de Lp90 generó una disminución de ácido cítrico en los quesos P y D cuando se usó Lh209 mientras que este efecto no se evidenció en los quesos con LHC. El consumo de cítrico en ausencia de azúcares fermentables por lactobacilos mesófilos en quesos también fue reportado por Buffa y col. (2004). Niveles incrementados de ácido acético fueron encontrados en los quesos D cuando se usó Lh209. El propiónico fue mayor en los quesos P cuando se usó Lh209 y en los D cuando se usó LHC.

Con respecto al volatiloma de los quesos evaluados al final de la maduración (90 días), diferencias notorias se detectaron por la metodología de agregado de los fermentos y la inclusión o no de Lp90, para ambas experiencias. En general, el agregado de Lp90 produjo incrementos en los ácidos y disminución en los alcoholes en los quesos P y D de ambas experiencias. En cuanto a las cetonas, el agregado de Lp90 condujo a disminuciones en los quesos P y aumentos en los D cuando se usó Lh209; mientras que para aquellos con LHC sólo se detectó un aumento para los quesos P. Por otra parte, la metodología de agregado de los fermentos modificó principalmente al grupo de los ácidos: los quesos P se caracterizaron por mayores niveles versus los D para los quesos con Lh209, y se observó un efecto contrario en los que-

Los ésteres y aldehídos fueron grupos minoritarios en todos los quesos y varios compuestos pertenecientes a estas familias químicas presentaron diferencias en los distintos quesos. En la Tabla 2 se muestran los compuestos volátiles que presentaron diferencias por la metodología de agregado de los fermentos y la adición de Lp90 en los quesos de ambas experiencias.

Tabla 2. Compuestos volátiles que presentaron diferencias por la metodología de agregado de los fermentos y la adición de Lp90, en los quesos con Lh209 y LhC.

Experiencia	Metodología de agregado de los fermentos		Adición de Lp90	
Quesos con Lh209	Cetonas	Alcoholes	Cetonas	Alcoholes
	2-propanona	2-propanol	2-propanona	2-propanol
	2-hexanona	etanol	acetoína	1-propanol
	acetoína	1-propanol	2-nonanona	etanol
	2-nonanona	2-pentanol	Ésteres	2-metil 1-propanol
	Ésteres	3-metil -butanol	etanoato de etilo	2-pentanol
	etanoato de etilo	1-pentanol	butanoato de etilo	3-metil 1-butanol
	butanoato de etilo	2-heptanol	hexanoato de etilo	2-heptanol
	hexanoato de etilo	Ácidos		Ácidos
	Aldehídos	acético		acético
	2-metil butanal			2-metil propanoico
3-metil butanal			3-metil butanoico	
Quesos con LhC	Cetonas	Alcoholes	Cetonas	Alcoholes
	2-butanona	etanol	acetoína	etanol
	2-heptanona	1-butanol	diacetilo	1-pentanol
	acetoína	1-pentanol	2-hexanona	1-butanol
	2-nonanona	2-heptanol	2-butanona	2-heptanol
	Ésteres	Ácidos	Ésteres	Ácidos
	butanoato de etilo	acético	butanoato de etilo	Acético
	hexanoato de etilo	butanoico	hexanoato de etilo	butanoico
	Aldehídos	hexanoico	Aldehídos	hexanoico
	2-metil butanal		3-metil butanal	3-metil butanoico
	3-metil butanal			

Varios de los compuestos identificados pueden derivar del catabolismo de los aminoácidos, reportado como la principal vía metabólica de producción de volátiles en quesos. En particular, diacetilo y su producto de degradación acetoína, pueden derivar del ácido aspártico por transaminación. Se detectó actividad aminotransferasa hacia el Asp en las tres cepas mesófilas estudiadas. Por otro lado, 2- y 3- metil butanal derivan del catabolismo de la isoleucina y leucina, respectivamente; los aldehídos son compuestos transitorios que se pueden oxidar o reducir fácilmente dependiendo del poten-

cial redox del medio (Yvon y col. 2006). La formación de estos compuestos podría correlacionarse con la actividad aminotransferasa hacia leucina e isoleucina, las cuales fueron detectadas en las cepas de lactobacilos mesófilos (Peralta y col., 2016). Una de las vías de producción de ácido acético es el catabolismo de la serina y el ácido aspártico (Liu y col., 2003). Por su parte, el ácido butanoico es un importante compuesto de sabor en los quesos, formado principalmente por el metabolismo de la grasa (Collins y col., 2003) o por la desaminación de aminoácidos (Buffa y col., 2004).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el efecto de la metodología de agregado de los fermentos en sus actividades enzimáticas, lo que se reflejó en los perfiles de maduración evaluados. La incorporación del cultivo adjunto de 1p90 es una estrategia interesante para potenciar la formación de algunos compuestos particulares de quesos duros y para incrementar la peptidólisis y acelerar la maduración dependiendo de la forma de preparación del cultivo y de su interacción con el fermento primario.

Referencias bibliográficas

- Beresford, T.; Fitzsimons, N.; Brennan, N. y Cogan, T. (2001).** Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259–274.
- Bergamini, C.; Peralta, G.; Milesi, M. y Hynes, E. (2013).** Growth, survival and peptidolytic activity of *Lactobacillus plantarum* I91 in a hard-cheese model. *Journal of Dairy Science*, 96, 5465–5476.
- Buffa, M.; Guamis, B.; Saldo, J. y Trujillo, A. (2004).** Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *LWT-Food Science and Technology*, 37, 247–253.
- Candiotti, M.; Hynes, E.; Quiberoni, A.; Palma, S.; Sabbag, N. y Zalazar, C. (2002).** Reggianito Argentino cheese: Influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. *International Dairy Journal*, 12, 923–931.
- Collins, Y.; McSweeney, P. y Wilkinson, M. (2003).** Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13, 841–866.
- Costabel, L.; Bergamini, C.; Pozza, L.; Cuffia, F.; Candiotti, M. y Hynes, E. (2015).** Influence of chymosin type and curd scalding temperature on proteolysis of hard cooked cheeses. *Journal of Dairy Research*, 82, 375–384.
- Crow, V.; Curry, B. y Hayes, M. (2001).** The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*, 11, 275–283.
- Farkye, N.; Madkor, S. y Atkins, H. (1995).** Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in a model cheese system. *International Dairy Journal*, 5, 115–125.
- Gatti, M.; Bottari, B.; Lazzi, C.; Neviani, E. y Mucchetti, G. (2014).** Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal Dairy Science*, 97, 573–591.
- Hickey, D.; Kilcawley, K.; Beresford T.; Sheehan, E. y Wilkinson, M. (2007).** Starter strain related effects on the biochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 1, 9–17.
- Hunter, E.; McNulty, D. y Banks, J. (1997).** Statistical design and analysis of experiment in cheese technology. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30, 121–128.
- Hynes, E.; Bergamini, C.; Suárez, V. y Zalazar, C. (2003).** Proteolysis on Reggianito Argentino cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 86, 3831–3840.
- Klein, N.; Maillard, M.; Thierry, A. y Lortal, S. (2001).** Conversion of amino acids into aroma compounds by cell-free extracts of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 404–411.
- Licitra, G.; Hynes, E.; Perotti, M.; Bergamini, C.; Eugster-Meier, E.; Fröhlich-Wyder, M-T; Jakob, E. y Wechsler, D. (2018).** Extra-hard cheeses. En Papademas P, Bintsis, T. (Eds.). *Global Cheesemaking Technology. Cheese quality and characteristics*. Reino Unido: Wiley & Sons, 194–203.
- Liu, S.; Holland, R.; McJarrow, P. y Crow, V. (2003).** Serine metabolism in *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 265–273.
- Milesi, M.; Vinderola, G.; Sabbag, N.; Meinardi, C. y Hynes, E. (2009).** Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter lactobacilli strains with probiotic potential. *Food Research International*, 42, 1186–1196.
- Milesi, M.; Bergamini, C. y Hynes, E. (2011).** Production of peptides and free amino acids in a sterile extract describes peptidolysis in hard-cooked cheeses. *Food Research International*, 44, 765–773.
- Pastink, M.; Sieuwerts, S.; de Bok, F.; Janssen, P.; Teusink, B.; van Hylckama Vlieg, J. y col. (2008).** Genomics and high-throughput screening approaches for optimal flavour production in dairy fermentation. *International Dairy Journal*, 18, 781–789.
- Peralta, G.; Wolf, I.; Bergamini, C.; Perotti, M. y Hynes, E. (2014).** Evaluation of volatile compounds produced by *Lactobacillus paracasei* I90 in a hard-cooked cheese model using solid-phase microextraction. *Dairy Science & Technology*, 94, 73–81.
- Peralta, G.; Bergamini, C. y Hynes, E. (2016).** Aminotransferase and glutamate dehydrogenase activities in lactobacilli and streptococci. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 741–748.

- Perotti, M.; Bernal, S.; Meinardi, C. y Zalazar, C. (2005).** Free fatty acid profiles of Reggiano Argentine cheese produced with different starters. *International Dairy Journal*, 15, 1150–1155.
- Poveda, J.; Nieto-Arribas, P.; Seseña, S.; Chicón, R.; Castro, L.; Palop, L. y Cabezas, L. (2014).** Volatile composition and improvement of the aroma of industrial Manchego cheese by using *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* as adjunct and other autochthonous strains as starters. *European Food Research Technology*, 238, 485–494.
- Reinheimer, J.; Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Binetti, A. y Suárez, V. (1996).** The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina on hard cheese production. *International Dairy Journal*, 6, 869–879.
- Rossetti, L.; Fornasari, M. A.; Gatti, M.; Lazzi, C.; Neviani, E. y Giraffa, G. (2008).** Grana Padano cheese whey starters: Microbial composition and strain distribution. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 168–171
- Sgarbi, E.; Lazzi, C.; Tabanelli, G.; Gatti, M.; Neviani, E. y Gardini, F. (2013).** Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. *Journal of Dairy Science*, 96, 4223–4234
- Shakeel-Ur-Rehman; Fox, P.; McSweeney, P.; Madkor, S. y Farkye, N. (2001).** Alternatives to pilot plan experiments in cheese-ripening studies. *International Journal of Dairy Technology*, 54, 121–126.
- Skeie, S.; Kieronczyk, A.; Eidet, S.; Reitan, M, Olsen, K. y Østlie, H. (2008).** Interaction between starter bacteria and adjunct *Lactobacillus plantarum* INF15D on the degradation of citrate, asparagine and aspartate in a washed-curd cheese. *International Dairy Journal*, 18, 169–177.
- Stefanovic, E.; Thierry, A.; Maillard, M.; Bertuzzi, A.; Rea, M.; Fitzgerald, G.; McAuliffe, O. y col. (2017).** Strains of the *Lactobacillus casei* group show diverse abilities for the production of flavor compounds in 2 model systems. *Journal of Dairy Science*, 100, 1–12.
- Taibi, A.; Dabour, N.; Lamoureux, M.; Roy, D. y LaPointe, G. (2011).** Comparative transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains under conditions simulating Cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology*, 146, 263–275.
- Vélez, M.; Perotti, M.; Wolf, I.; Hynes, Y. y Zalazar, C. (2010).** Influence of milk pre-treatment on production of FFA and volatile compounds in hard cheeses: heat treatment and mechanical agitation. *Journal of Dairy Science*, 93, 4545–4554.
- Vélez, M.; Perotti, M.; Rebecchi, S.; Meinardi, C.; Hynes, E. y Zalazar, C. (2011).** Effect of mechanical treatments applied to milk fat on fat retention and lipolysis in minicurds. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 227–231.
- Wolf, I.; Perotti, M.; Bernal, S. y Zalazar, C. (2010).** Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggiano Argentine cheese: Characterization of Reggiano Argentine cheese. *Food Research International*, 43, 1204–1211.
- Yvon, M. (2006).** Key enzymes for flavor formation by lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61, 16–24.

4. Cultivos adjuntos de quesería a partir de cepas de origen NSLAB

Guillermo Peralta, Carina Bergamini, Verónica Wolf, Mario Candiotti, Gabriela Audero, Roxana Páez, Paula Giménez, Ma. Cristina Perotti y Erica Hynes

Bacterias lácticas no provenientes del fermento

Las bacterias lácticas no provenientes del fermento (NSLAB, non-starter lactic acid bacteria) son una parte esencial de la microbiota del queso. Este grupo microbiano deriva principalmente de la leche cruda, pero también del ambiente de la fábrica. Las NSLAB incluyen a todas las bacterias lácticas que no se agregan como fermento, por lo que la denominación se refiere a un grupo heterogéneo, según la variedad de queso de que se trate. Sin embargo, dado que la bacteria láctica más utilizada en el mundo como fermento es *Lactococcus lactis*, seguida de *Streptococcus thermophilus*, se puede afirmar que entre las NSLAB predominan lactobacilos mesófilos heterofermentantes facultativos, aunque también se han aislado pediococos y enterococos. En general, las NSLAB se encuentran en bajos niveles en los quesos jóvenes ($< 10^2$ UFC/g) pero su población se incrementa durante la maduración hasta llegar a concentraciones superiores a 10^6 UFC/g. Pueden convertirse en la flora dominante en algunas variedades de queso si la población del fermento declina (Gobbetti y col., 2015). La velocidad de crecimiento de estas bacterias en el queso depende

principalmente de la disponibilidad de fuentes de energía y de la temperatura de maduración. La lactosa residual se ha identificado como la principal fuente de energía inicial para estas bacterias, así como la galactosa en quesos elaborados con fermentos primarios que no la metabolizan. El citrato, además de productos de la lisis celular del fermento, glucoproteínas de la membrana del glóbulo de grasa e hidratos de carbono de la κ -caseína también se han incluido entre potenciales fuentes de carbono, aunque se conoce menos su impacto en el crecimiento de las NSLAB (Settanni y Moschetti, 2010; Porcellato y col., 2015).

Cultivos adjuntos de cepas NSLAB

Algunas cepas de NSLAB pueden tener una influencia significativa en las características organolépticas del queso según su perfil enzimático, el nivel que alcancen en el alimento y las condiciones de maduración. Una gran cantidad de estudios asocian la presencia de las NSLAB con defectos en quesería, tales como formación de aberturas (ojos) en variedades que no deben presentarlas, inconstancia en la calidad, sabores y olores atípicos o no deseados y cristales de lactato de calcio. Sin embargo, otros autores señalan que los quesos con bajos números de NSLAB no desarrollan un flavour completamente maduro o un perfil de aroma suficientemente complejo. Por este motivo, en la última década se ha implementado como una innovación en quesería el uso de cultivos adjuntos de cepas seleccionadas de origen NSLAB. Estos cultivos, también llamados de afinado o de maduración, se emplean para estandarizar la calidad del producto y para acelerar, diversificar o mejorar el flavour. Además, algunas cepas de NSLAB han demostrado poseer propiedades probióticas, por lo que suman el plus de contribuir al carácter funcional del alimento (Bude-Ugarte y col., 2006; Settanni y Moschetti, 2010; Burns y col., 2012).

En el INLAIN se han aislado e identificado 22 cepas de origen NSLAB de quesos argentinos de buena calidad. La mayoría de las cepas fueron lactobacilos mesófilos, que se asignaron a las especies *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. curvatus* y *L. perolens* (Bude-Ugarte y col., 2006). Las cepas se caracterizaron en cuanto a sus propiedades tecnológicas tales como la actividad proteolítica y acidificante, la resistencia a fagos y la tolerancia a NaCl y KCl. En líneas generales, presentaron una actividad proteolítica débil a moderada, y mostraron tolerancia a la sal y resistencia a fagos específicos. Además, la mayoría de las cepas acidificaron la leche lentamente; un tercio fue capaz de cre-

cer cuando la leche se complementó con glucosa e hidrolizado de caseína (Briggiler Marcó y col., 2007). En las siguientes secciones, se describirán los principales resultados de nuestras investigaciones sobre cepas seleccionadas de esta colección.

Control de la microbiota del queso y metabolismo de azúcares residuales y citrato

En las últimas dos décadas se ha extendido el uso de cultivos adjuntos con el objetivo de ejercer un mejor control sobre la microbiota del queso. La estrategia consiste en agregar el cultivo adjunto —muchas veces incluido en la formulación junto al fermento primario— en una concentración suficientemente alta ($\approx 10^4$, hasta 10^6 UFC/mL) para que predomine frente a bacterias no fermento adventicias. Asimismo, este segundo fermento puede contribuir con el *starter* al control de otros microorganismos no deseados, como patógenos y alterantes. La inhibición se produce a través de diferentes mecanismos en los que se incluyen la producción de sustancias antimicrobianas (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, etanol y diacetilo), la competencia y el agotamiento de nutrientes, y el cambio en el potencial de óxido-reducción (Settanni y Moschetti, 2010; Gobbetti y col., 2015).

En el INLAIN se ha evaluado la influencia de la adición de cultivos adjuntos de cepas NSLAB en diferentes tipos de queso o sistemas modelo. En todos los casos, las cepas ensayadas (*L. plantarum* 191, *L. paracasei* 190, *L. rhamnosus* 173, *L. rhamnosus* 177 y *L. casei* 172), incorporadas en niveles de 10^6 UFC/mL a la leche de elaboración, mostraron una concentración o crecimiento en la cuajada hasta niveles de 10^7 – 10^8 UFC/g de queso. Durante la maduración, mantuvieron altas densidades celulares en las matrices lácteas evaluadas, que incluyeron diferentes tipos de quesos, fabricados a escala miniatura o piloto: Cremoso, Pategrás, Reggianito y Cheddar, en los que se utilizaron diferentes cultivos primarios. Además, algunas cepas también se aplicaron en diferentes modelos de queso, como pseudocuajadas y extractos estériles solubles obtenidos de quesos blandos o duros, en los que demostraron igualmente una buena supervivencia (Galletto y col., 2007; Milesi y col., 2008a y b, 2009, 2010; Bergamini y col., 2013; Peralta y col., 2014, 2016b; Cuffia, 2016). Con el objetivo de determinar el nivel de inóculo mínimo para alcanzar una elevada población en el queso durante la maduración, se evaluó el uso de tres diferentes dosis de la cepa *L. paracasei* 190 en queso Cremoso (5×10^3 , 1×10^5 , y 5×10^6 UFC/mL en la leche de elaboración). El fermento adjunto se mantuvo viable en el queso en niveles proporcionales a las

dosis empleadas y se conservaron las diferencias entre los niveles de inóculo durante la maduración; los recuentos en el queso fueron 9×10^4 , 2×10^6 y 8×10^7 UFC/g, respectivamente (Peralta y col., 2017a).

El uso de cultivos primarios que no pueden metabolizar la galactosa proveniente de la hidrólisis de la lactosa, mayoritariamente de *Streptococcus thermophilus*, conduce a la acumulación de este azúcar en la cuajada. La galactosa puede ser utilizada por las NSLAB para su crecimiento y conducir a defectos asociados a actividades metabólicas indeseables. También se han asociado a la galactosa acumulada defectos de textura debidos a la sobreacidificación y de pardeamiento por reacciones de Maillard al calentar el queso (Wu y Shah, 2017). Los fermentos adjuntos seleccionados de NSLAB también pueden dar respuesta a estos problemas al agotar los carbohidratos residuales en el queso (Mukherjee y Hutkins, 1994), aunque su influencia en la acidificación debe verificarse ya que la sobreacidificación es un riesgo que debe ser evitado. Entre las cepas de nuestra colección, *L. plantarum* 191 y *L. paracasei* 190, adicionadas como fermentos adjuntos en quesos Cremoso y Pategrás, no causaron un exceso de acidificación. Por el contrario, *L. rhamnosus* 173 y 177 causaron una pos acidificación durante la maduración en ambos tipos de quesos, excepto la cepa 177 en el queso Pategrás (Milesi y col., 2009). En un estudio posterior, se evaluó la aplicación de la cepa 190 en quesos Cremoso madurados con cortes en la cadena de frío, simulando situaciones que pueden producirse durante la etapa de comercialización. En este estudio, se verificó que la población de la cepa 190 fue mayor (aprox. 0,2–0,3 órdenes log UFC/g) cuando hubo cortes en la cadena de frío. Asimismo, se observó una disminución en los niveles de galactosa en el queso, con un consiguiente incremento en la concentración de ácido láctico y disminución del pH, debido a la actividad metabólica del adjunto, cambios que se acentuaron en presencia de interrupciones de frío. El incremento en los niveles de ácido láctico se correlacionó con un aumento de los puntajes de acidez del queso, determinados por un panel sensorial, aunque los niveles detectados no fueron percibidos como un defecto. La capacidad de reducir una posible fuente de energía (galactosa) para las NSLAB alterantes y la producción de un compuesto inhibidor (ácido láctico) del crecimiento de patógenos sin inducir defectos sensoriales revelan propiedades de interés en esta cepa para ser usada como un cultivo bioprotector (Peralta y col., 2017b).

La formación indeseada de ojos y aberturas en quesos de masa compacta, como el Cremoso, es un defecto que se origina debido a la producción de gas por la actividad metabólica de la microflora contaminante heterofermentante, la cual se puede incrementar cuando se producen cor-

tes en la cadena de frío (Porcellato y col., 2015; O'Sullivan y col., 2016). En relación con esta temática, se evaluó la capacidad de la cepa I90 de inhibir el crecimiento y actividad indeseada de una cepa gasógena, incorporada como contaminante en niveles de 10^4 UFC/ML en la leche de elaboración de quesos Cremoso. La cepa gasógena alterante utilizada fue *Leuconostoc mesenteroides* D11, la cual fue aislada de quesos con defectos de formación de ojos (Cardamone y col., 2011). En experiencias preliminares en planta piloto, se confirmó la actividad gasógena de esta cepa en queso Cremoso, aunque únicamente se observó generación de gas y aberturas no deseadas cuando los quesos fueron sometidos a cortes en la cadena de frío; en los quesos madurados en condiciones normales no hubo ningún defecto causado por la cepa. La incorporación del fermento adjunto I90, en niveles de 10^6 UFC/ML en la leche de elaboración, resultó una estrategia eficaz para evitar la aparición indeseada de ojos en estos quesos, causada por la cepa D11. Además, se observaron menores niveles (0,5 órdenes log UFC/g) de la cepa alterante en los quesos con el fermento adjunto (Giménez y col., 2018a). *L. paracasei* 190 y de *L. plantarum* 191 ya habían sido eficaces para controlar los niveles de mohos y levaduras en quesos Cremoso (Milesi y col., 2010). Estos resultados indican una inhibición del crecimiento y actividad de microorganismos contaminantes por la incorporación del fermento 190, lo que podría atribuirse a una inhibición competitiva por el consumo de nutrientes presentes en el medio o una inhibición por compuestos antimicrobianos producidos.

El citrato es un precursor de importantes compuestos de flavour como acetaldehído, etanol, acetato, diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol. La capacidad de cepas de *Lactobacillus* para metabolizar el citrato es dependiente de la especie y la cepa, y está influenciada por el estado fisiológico de las células y el nivel de carbohidratos en el medio (Medina de Figueroa y col., 2000). En nuestros estudios, *L. paracasei* 190, *L. plantarum* 191 y *L. casei* 172 no pudieron metabolizar el citrato en quesos blandos o extractos de queso blando, mientras que sí fue metabolizado en queso duro o extractos obtenidos de este queso. En el queso blando y sus extractos se encontraron concentraciones en torno al 0,1 y 0,7% (p/p) de lactosa residual y galactosa, respectivamente, mientras que en el queso duro y sus modelos el citrato fue la principal fuente de carbono y la concentración de otros carbohidratos resultaron insignificantes. Los resultados sugieren que la presencia de carbohidratos simples inhibió la capacidad de las cepas evaluadas para metabolizar el citrato (Peralta y col., 2016b; Cuffia, 2016).

Contribución a la proteólisis

La proteólisis y la peptidólisis tienen un impacto directo en la calidad del queso ya que influyen en el desarrollo de la textura y el flavour. La contribución de las NSLAB a la proteólisis es principalmente a través de su actividad peptidolítica, lo que conduce a un aumento de los niveles de péptidos pequeños y aminoácidos libres (AA), mientras que no tienen un impacto significativo en la proteólisis primaria. Esta influencia podría conducir a cambios favorables tales como la aceleración de la maduración y el mejoramiento del flavour a través de un aporte directo al sabor de fondo por parte de los oligopéptidos y AA, pero sobre todo mediante un efecto indirecto al proporcionar AA como precursores de compuestos volátiles (Upadhyay y col., 2004). En el INLAIN, se observó que los cultivos adjuntos de *L. rhamnosus* (cepas 173 y 177) incrementaron la proteólisis y la peptidólisis cuando fueron incorporados en quesos Cremoso y Pategrás, en los cuales el cultivo primario fue *S. thermophilus*. Estas cepas modificaron los perfiles peptídicos y aumentaron la concentración de AA, lo que sugiere una aceleración en la maduración del queso. La influencia de *L. paracasei* 190 y *L. plantarum* 191 en las mismas variedades de queso fue menor, verificándose únicamente un incremento de algunos AA (Milesi y col., 2009, 2010). En otro estudio llevado a cabo en un modelo de queso blando, se verificó un aumento de los niveles de AA debido a la actividad peptidolítica de *L. paracasei* 190 y *L. casei* 172, siendo la influencia más marcada para esta última cepa (Peralta y col., 2016b).

La cooperación entre cultivos primarios y adjuntos, y su contribución conjunta al perfil de proteólisis, también es un tema interesante que ha sido abordado en el INLAIN. En este sentido, se verificó una variabilidad de la influencia de 10 cepas de lactobacilos mesófilos de origen NSLAB (de la colección CNRZ) en la proteólisis de quesos de pasta lavada, en función de la cepa de *Lactococcus* utilizada como fermento primario (Hynes y col., 2003). De manera similar, la cepa *L. plantarum* 191, que mostró un aumento de la peptidólisis cuando se usó en queso blando y semiduro elaborado con *S. thermophilus* como cultivo primario (Milesi y col., 2008b, 2009, 2010), tuvo una contribución insignificante cuando se estudió junto a *L. helveticus* en un modelo de queso duro (Bergamini y col., 2013). Por el contrario, la influencia de *L. paracasei* 190 en los perfiles de proteólisis fue similar cuando se estudió la cooperación con *S. thermophilus* o *L. helveticus* (Milesi y col., 2009, 2010; Cuffia, 2016; Peralta y col., 2016b). Estos antecedentes destacan la importancia de evaluar los cultivos adjuntos en combinación con el fermento primario utilizado en cada variedad de queso, teniendo en cuenta que pueden existir interacciones microbianas que potencien o inhiban alguna actividad particular.

Contribución al catabolismo de aminoácidos y producción de compuestos volátiles

El catabolismo de aminoácidos (AA) tiene un impacto significativo en el desarrollo del flavour de la mayoría de las variedades de queso ya que gran parte de los compuestos volátiles que se producen derivan de este proceso por la actividad de las bacterias lácticas (Yvon y Rijnen, 2001). Una de las principales vías que transforman los AA en diferentes compuestos de flavour, tales como ácidos carboxílicos, aldehídos, alcoholes y compuestos azufrados entre otros, comienza con una reacción de transaminación catalizada por enzimas denominadas aminotransferasas (AT) (Kieronczyk y col., 2001; Yvon y Rijnen, 2001). En esta reacción, los AA se convierten en sus correspondientes α -cetoácidos debido a la transferencia del grupo α -amino a un aceptor adecuado, generalmente α -cetoglutarato (α -KG). El α -KG está presente naturalmente en el queso, aunque en bajos niveles, y por esta razón se ha identificado como el reactivo limitante en la biosíntesis de compuestos de flavour a través del catabolismo de AA. Para superar este paso crítico, se ha propuesto el uso de cultivos con alta actividad glutamato dehidrogenasa (GDH), enzima que cataliza la producción de α -KG a partir de glutamato (Williams y col., 2006). Las actividades de las enzimas que desempeñan funciones clave en la producción de compuestos volátiles de interés en el queso, tales como las AT y GDH, se han propuesto como un nuevo criterio para la selección de cepas para su uso como mejoradores del flavour. En el mismo sentido, también se ha propuesto la selección de cepas con actividades enzimáticas complementarias (Kieronczyk y col., 2001; Williams y col., 2001).

En el INLAIN se estudiaron los perfiles de actividades AT y GDH en 15 cepas de lactobacilos mesófilos de origen NSLAB y en cepas comerciales de *Streptococcus thermophilus* ampliamente utilizadas en nuestro país como cultivos primarios (Peralta y col., 2016a). La actividad GDH fue baja en las cepas NSLAB en comparación con las cepas comerciales de *S. thermophilus*. Con relación a las AT, los mayores niveles de actividad fueron hacia el ácido aspártico en la mayoría de las cepas analizadas, mientras que los niveles y la especificidad de la actividad hacia otros AA fueron altamente dependientes de la cepa y la especie. *L. paracasei* 190 y *L. casei* 172, inoculadas individualmente en extractos acuosos obtenidos de quesos Cremoso, formaron compuestos volátiles relacionados con las actividades AT mayoritarias y con el perfil de AA presentes (Peralta y col., 2016b). En particular, *L. paracasei* 190, en la que predominó la actividad ASPAT, produjo diacetilo y acetoína, compuestos que pueden derivar del catabolismo del Asp. *L. casei* 172, que mostró niveles similares de actividad AT hacia todos los AA, produjo principalmente

3-metilbutanal derivado de Leu, que fue el AA mayoritario en el extracto. Los cambios bioquímicos en extractos inoculados conjuntamente con lactobacilos mesófilos y *S. thermophilus* fueron similares a los que contenían cultivos individuales de lactobacilos. Esto pone en evidencia que los lactobacilos lideraron los cambios bioquímicos en el extracto, mientras que solo pequeñas variaciones fueron atribuibles a la cooperación entre lactobacilos y estreptococos. Una influencia similar a la descrita para *L. paracasei* 190 en extractos de queso, se observó cuando se estudió la misma en queso Cremoso miniatura elaborado con un cultivo primario de *S. thermophilus* (Milesi y col., 2010). En estudios posteriores en los que se utilizaron tres diferentes dosis del fermento adjunto I90 (5×10^3 , 1×10^5 , y 5×10^6 UFC/mL en la leche de elaboración), se corroboró el buen desempeño en la producción de compuestos de flavour deseables en este tipo de queso solamente cuando se utilizó la mayor dosis estudiada (Peralta y col., 2017a). En este mismo modelo de queso, *L. plantarum* 191 también aumentó los niveles de diacetilo y acetoina, así como otros compuestos volátiles de interés. Estos cambios se correlacionaron con una mejora de las características sensoriales del queso Cremoso, tanto para *L. paracasei* 190 como para *L. plantarum* 191 (Milesi y col., 2010).

Contribución a la salud: propiedades probióticas

Los probióticos «son microorganismos vivos, que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud al huésped» (WHO-FAO, 2002). La mayoría de las cepas probióticas reportadas hasta la fecha pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Vinderola y col., 2011). Particularmente para NSLAB, diversas propiedades probióticas se han informado en los últimos años, sobre todo para cepas de lactobacilos. La mayoría de los estudios evaluaron el potencial probiótico de las cepas individuales en ensayos *in vitro* o *in vivo*, mientras que pocos trabajos verificaron su capacidad probiótica cuando se administran vehiculizadas en un producto como el queso (Bude-Ugarte y col., 2006; Burns y col., 2012).

En el INLAIN se realizó una caracterización *in vitro* de las propiedades probióticas de las 22 cepas NSLAB aisladas de quesos argentinos. En general, todas las cepas mostraron una alta resistencia a la lisozima, una buena adaptación al jugo gástrico simulado, una tolerancia a la bilis de moderada a baja y una alta actividad β -galactosidasa. Siete de estas cepas se seleccionaron como los mejores candidatos para el desarrollo de alimentos fermentados probióticos: *L. plantarum* 191, 187 y 189, *L. rhamnosus* 173 y 175, *L. curvatus* 134 y

L. paracasei 190 (Bude–Ugarte y col., 2006; Briggiler Marcó y col., 2007). El potencial probiótico de las cepas *L. plantarum* 191 y *L. paracasei* 190 incorporadas como adjuntos en queso Cremoso fue evaluado en estudios *in vivo* en ratones. La administración oral de estos quesos produjo un aumento en el número de células IgA+ en la lámina propia del intestino delgado de los ratones, lo que sugiere una promoción satisfactoria de las defensas de la mucosa intestinal mediadas por la IgA. Además, la ingesta de estos quesos demostró ser segura porque no se detectaron efectos secundarios indeseables, como la translocación de enterobacterias al hígado o cambios morfológicos en la arquitectura general del intestino delgado. Finalmente, no se observaron cambios en la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales en ratones alimentados con quesos probióticos en comparación con los alimentados con quesos control, por lo que no se detectó ningún efecto sobre la respuesta inmune sistémica (Burns y col., 2012).

Producción y degradación de aminas biógenas

Las aminas biógenas (AB) son compuestos orgánicos nitrogenados que pueden producirse durante el almacenamiento y procesamiento de ciertos alimentos, como los quesos, a partir de los aminoácidos precursores por la acción de descarboxilasas microbianas. El consumo de alimentos que contengan AB puede causar efectos adversos en los consumidores, lo que depende del nivel y toxicidad de cada AB, la sensibilidad de cada individuo y la coexistencia de factores potenciadores de los efectos. En condiciones normales y con bajos niveles de ingesta, estos compuestos son degradados en el tracto gastrointestinal mediante la actividad de enzimas mono- y di-aminooxidasas. Sin embargo, cuando los procesos de detoxificación no son suficientes, las AB pasan a circulación sanguínea pudiendo causar efectos tóxicos indeseables (Ladero y col., 2010; EFSA, 2011; Gardini y col., 2016).

Muchas cepas de origen NSLAB han demostrado el potencial de producir AB, particularmente histamina, tiramina, cadaverina y putrescina (Cogan y col., 2007). En el INLAIN se analizó el contenido de AB en 35 quesos provenientes de 21 industrias lácteas nacionales y en 15 quesos artesanales obtenidos de 13 productores queseros de Entre Ríos, Córdoba y Santa Fe. En general, la mayor ocurrencia y nivel de AB se observó en los quesos artesanales, los cuales fueron elaborados con leche cruda la que aporta una microflora adventicia que puede sobrevivir en el queso durante la maduración. Estos resultados sugieren que algunas de las cepas NSLAB presentes tenían la capacidad de producir AB (Giménez y col., 2018b).

De esta manera, es importante evaluar la capacidad de producción de estos compuestos potencialmente tóxicos por parte de cepas autóctonas, antes de su uso como fermentos en alimentos fermentados. La cepa *L. paracasei* 190, que caracterizamos ampliamente en nuestro grupo, no produjo AB cuando fue utilizada como adjunto en queso duro elaborado con una cepa comercial de *L. helveticus* como fermento primario (Giménez, 2017).

Por otro lado, mientras que algunas cepas de NSLAB tienen el potencial de producir AB, otras han mostrado el efecto opuesto ya que evitan su acumulación degradándolas. En este sentido, se ha propuesto el uso de microorganismos con alta actividad mono- y di-amino-oxidasa como una estrategia para reducir los niveles de AB en productos fermentados, ya que estas enzimas las transforman en compuestos no tóxicos (Lorenzo y col., 2017). Se han identificado varias especies de BAL con esta actividad enzimática, como *L. casei*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus* y *Oenococcus oeni*, entre otras (García-Ruiz y col., 2011).

Secado spray para la conservación de cultivos adjuntos de origen NSLAB

La producción industrial de cultivos a partir de cepas de origen NSLAB implica la aplicación de una serie de etapas en la que se destaca el proceso de conservación, que pueden afectar tanto la viabilidad como la actividad metabólica microbiana. En este sentido, muchas cepas con características interesantes para su uso como fermentos en la industria láctea pueden no ser cultivables o comercializables, o pueden mostrar una pérdida de sus propiedades interesantes frente a las condiciones adversas a las que se ven expuestas durante los procesos de preservación.

Una de las metodologías utilizadas para la conservación de cultivos lácteos es el secado spray. Mediante este proceso se obtiene un polvo deshidratado al atomizar el líquido a alta velocidad en un flujo de aire caliente (Santivarangkna y col., 2007). Esta tecnología ofrece ventajas tales como altos índices de producción, bajos costos operativos, procesamiento en una sola unidad para la formación y secado de partículas, y la facilidad de escalado (Santivarangkna y col., 2007; Ghandi y col., 2012). En la industria láctea, el secado spray es un método ampliamente utilizado para secar la leche e ingredientes lácteos, mientras que su aplicación para la conservación de cultivos ha sido menos extendida. En nuestro Instituto evaluamos la aplicación del secado spray sobre dos cepas de NSLAB (*L. paracasei* 190 y *L. plantarum* 191). Las cepas fueron crecidas en un medio comercial (MRS), luego de lo cual se

resuspendieron en leche descremada al 20% (p/v) y se deshidrataron utilizando un secadero spray a escala laboratorio. Ambas cepas mostraron buena resistencia al proceso de secado y conservaron la viabilidad en el polvo deshidratado durante 12 meses de almacenamiento a 5°C. Además, la viabilidad y actividad metabólica característica de las cepas (metabolismo de carbohidratos, producción de ácidos orgánicos y compuestos volátiles) se mantuvo en los fermentos deshidratados al ensayarse los mismos como cultivos adjuntos en queso (Peralta y col., 2017a).

Otro punto de interés en esta temática, previo a la etapa de secado spray, es el desarrollo de medios de cultivo económicos para la propagación de las cepas con el objetivo de reemplazar los costosos medios comerciales. En el INLAIN se está trabajando actualmente en la optimización de medios de cultivo basados en subproductos industriales (harina de soja, permeado y suero de quesería) para la producción de biomasa de cepas de origen NSLAB. Hasta el momento, se han obtenido resultados satisfactorios para la cepa *L. paracasei* 190, que alcanzó altos niveles en varias formulaciones (Peralta y col., 2018). Es importante tener en cuenta que el medio de crecimiento puede tener un impacto en la expresión enzimática bacteriana, por lo que se debería reevaluar la performance de un fermento adjunto cuando el mismo es obtenido a partir de otro medio de cultivo.

Referencias bibliográficas

- Bergamini, C.V.; Peralta, G.H.; Milesi, M.M. y Hynes, E.R. (2013).** Growth, survival and peptidolytic activity of *Lactobacillus plantarum* I91 in a hard-cheese model. *Journal of Dairy Science*, 96, 5465–5476.
- Briggiler Marcó, M.; Capra, M.L.; Quiberoni, A.; Vinderola, G.; Reinheimer, J.A. y Hynes, E. (2007).** Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: in vitro characterization and performance in two model cheeses. *Journal of Dairy Science*, 90, 4532–4542.
- Bude-Ugarte, M.; Guglielmotti, D.; Giraffa, G.; Reinheimer, J.A. y Hynes, E. (2006).** Nonstarter lactobacilli isolated from soft and semihard Argentinean cheeses: genetic characterization and resistance to biological barriers. *Journal of Food Protection*, 69, 2983–2991.
- Burns, P.; Cuffia, F.; Milesi, M.; Vinderola, G.; Meinardi, C.; Sabbag, N. y Hynes, E. (2012).** Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. *Food Microbiology*, 30, 45–50.
- Cardamone, L.; Quiberoni, A.; Mercanti, D.J.; Fornasari, M.E.; Reinheimer, J.A. y Guglielmotti, D.M. (2011).** Adventitious dairy *Leuconostoc* strains with interesting technological and biological properties useful for adjunct starters. *Dairy Science & Technology*, 91, 457–470.
- Cogan, T.M.; Beresford, T.P.; Steele, J.; Broadbent, J.; Shah, N.P. y Ustunol, Z. (2007).** Advances in starter cultures and cultured foods. *Journal of Dairy Science*, 90, 4005–4021.
- Cuffia, F. (2016).** *Biogeneración de aroma en quesos duros por fermentos primarios y adjuntos de bacterias lácticas* (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional del Litoral.
- EFSA (2011).** Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA J 9/2393:1–93. Recuperado de <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2011.2393>
- Galetto, C.; Quiberoni, A.; Milesi, M.M. y Hynes, E.R. (2007).** Crecimiento de una cepa de *Lactobacillus plantarum* aislada de queso en una pseudo-cuajada modelo. *Actas del XI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos* organizado por la Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios.
- García-Ruiz, A.; Gonzáles-Rompinelli, E.; Bartolomé, B. y Moreno-Arribas, M. (2011).** Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 115–120.
- Gardini, F.; Özogul, Y.; Suzzi, G.; Tabanelli, G. y Özogul, F. (2016).** Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–18.
- Ghandi, A.; Powell, I.B.; Dong, C.X. y Adhikari, B. (2012).** The effect of dryer inlet and outlet air temperatures and protectant solids on the survival of *Lactococcus lactis* during spray drying. *Drying Technology*, 30, 1649–1657.
- Giménez, P. (2017).** *Implementación y optimización de un método cromatográfico (HPLC) para la determinación de aminas biógenas en productos lácteos* (Tesina de Licenciatura en Química). Universidad Nacional del Litoral.
- Giménez, P.; Peralta, G.H.; Guglielmotti, D.; Hynes, E.R. y Bergamini, C.V. (2018a).** Control de la formación de ojos en queso Cremoso con un fermento adjunto de *Lactobacillus paracasei* 90. *Actas del VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos* organizado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba.
- Giménez, P.; Peralta, G.; Hynes, E. y Bergamini, C. (2018b).** Contenido de aminas biógenas en quesos Argentinos. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 102, 43–47.
- Gobbetti, M.; De Angelis, M.; Di Cagno, R.; Mancini, L. y Fox, P.F. (2015).** Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology*, 45, 167–178.
- Hynes, E.; Bach, C.; Lamberet, G.; Ogierb, J.C.; Son, O. y Delacroix-Buchet, A. (2003).** Contribution of starter lactococci and adjunct lactobacilli to proteolysis, volatile profiles and sensory characteristics of washed-curd cheese. *Le Lait*, 83, 31–43.
- Kieronczyk, A.; Skeie, S.; Olsen, K. y Langsrud, T. (2001).** Metabolism of amino acids by resting cells of non-starter lactobacilli in relation to flavour development in cheese. *International Dairy Journal*, 11, 217–224.

- Ladero, V.; Calles, M.; Fernández, M. y Álvarez, M. (2010).** Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition and Food Science*, 6, 145–156.
- Lorenzo, J.M.; Sichert-Munekata, P.E. y Domínguez, R. (2017).** Role of autochthonous starter cultures in the reduction of biogenic amines in traditional meat products. *Current Opinion in Food Science*, 14, 61–65.
- Medina de Figueroa, R.; Álvarez, E.; Pesce de Ruiz Holgado, A.; Oliver, G. y Sesma, E. (2000).** Citrate utilization by homo- and heterofermentative lactobacilli. *Microbiological Research*, 154, 313–320.
- Milesi, M.M.; McSweeney, P.L. y Hynes, E.R. (2008a).** Impact of chymosin- and plasmin-mediated primary proteolysis on the growth and biochemical activities of lactobacilli in miniature Cheddar-type cheeses. *Journal of Dairy Science*, 91, 3277–3290.
- Milesi, M.M.; McSweeney, P.L.H. y Hynes, E.R. (2008b).** Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 884–892.
- Milesi, M.M.; Vinderola, G.; Sabbag, N.; Meinardi, C.A. y Hynes, E.R. (2009).** Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter lactobacilli strains with probiotic potential. *Food Research International*, 42, 1186–1196.
- Milesi, M.M.; Wolf, I.V.; Bergamini, C.V. y Hynes, E.R. (2010).** Two strains of nonstarter lactobacilli increased the production of flavor compounds in soft cheeses. *Journal of Dairy Science*, 93, 5020–5031.
- Mukherjee, K.K. y Hutkins, R.W. (1994).** Isolation of galactose-fermenting thermophilic cultures and their use in the manufacture of low browning Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 77, 2839–2849.
- O'Sullivan, D.J.; McSweeney, P.L.H.; Cotter, P.D.; Giblin, L. y Sheehan, J.J. (2016).** Compromised *Lactobacillus helveticus* starter activity in the presence of facultative heterofermentative *Lactobacillus casei* DPC6987 results in atypical eye formation in Swiss-type cheese. *Journal of Dairy Science*, 99, 2625–2640.
- Peralta, G.H.; Wolf, I.V.; Bergamini, C.V.; Perotti, M.C. y Hynes, E.R. (2014).** Evaluation of volatile compounds produced by *Lactobacillus paracasei* 190 in a hard-cooked cheese model using solid-phase microextraction. *Dairy Science & Technology*, 94, 73–81.
- Peralta, G.H.; Bergamini, C.V. y Hynes, E.R. (2016a).** Aminotransferase and glutamate dehydrogenase activities in lactobacilli and streptococci. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 741–748.
- Peralta, G.H.; Wolf, I.V.; Perotti, M.C.; Bergamini, C.V. y Hynes, E.R. (2016b).** Formation of volatile compounds, peptidolysis and carbohydrate fermentation by mesophilic lactobacilli and streptococci cultures in a cheese extract. *Dairy Science & Technology*, 96, 603–621.
- Peralta, G.H.; Bergamini, C.V.; Audero, G.; Páez, R.; Wolf, I.V.; Perotti, M.C. y Hynes, E.R. (2017a).** Spray-dried adjunct cultures of autochthonous non-starter lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 255, 17–24.
- Peralta, G.; Bergamini, C.; Costabel, L.; Audero, G.; Perotti, M.C. y Hynes, E.R. (2017b).** Desempeño de un fermento adjunto de *Lactobacillus paracasei* 90 en condiciones de corte de cadena de frío en queso cremoso. *Actas del XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos* organizado por la Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios.
- Peralta, G.H.; Beret, M.V.; Hynes, E.R. y Bergamini, C.V. (2018).** Formulación de un medio de cultivo económico para la producción de biomasa de *Lactobacillus paracasei* 90: revalorización de residuos agroindustriales. *Actas del VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos* organizado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba.
- Porcellato, D.; Johnson, M.E.; Houck, K.; Skeie, S.B.; Mills, D.A.; Kalanetra, K.M. y Steele, J.L. (2015).** Potential of *Lactobacillus curvatus* LFC1 to produce slits in Cheeddar. *Food Microbiology*, 49, 65–73.
- Santivarangkna, C.; Kulozik, U. y Foerst, P. (2007).** Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress*, 23, 302–315.

- Settanni, L. y Moschetti, G. (2010).** Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27, 691–697.
- Upadhyay, V.K.; McSweeney, P.L.H.; Magboul, A.A.A. y Fox, P.F. (2004).** Proteolysis in cheese during ripening. En Fox P, McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Timothy P (Coords.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. Amsterdam: Elsevier, 392–433.
- Vinderola, G.; Binetti, A.; Burns, P. y Reinheimer, J.A. (2011).** Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1–6.
- WHO-FAO (2002).** *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. World Health Organization- Food and Agriculture Organization of the United Nations, London, Ontario, Canadá.
- Williams, A.G.; Noble, J. y Banks, J.M. (2001).** Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 11, 203–215.
- Williams, A.G.; Withers, S.E.; Brechany, E.Y. y Banks, J.M. (2006).** Glutamate dehydrogenase activity in lactobacilli and the use of glutamate dehydrogenase-producing adjunct *Lactobacillus* spp. cultures in the manufacture of cheddar cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1062–1075.
- Wu, Q. y Shah, N.P. (2017).** The potential of species-specific tagatose-6-phosphate (T6P) pathway in *Lactobacillus casei* group for galactose reduction in fermented dairy foods. *Food Microbiology*, 62, 178–187.
- Yvon, M. y Rijnen, L. (2001).** Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11, 185–201.

5. Tendencias y desafíos en la producción de quesos frescos de pasta hilada

Facundo Cuffia, Guillermo George, Jorge Reinheimer,
Carlos Meinardi y Patricia Burns

Aspectos generales

Los quesos de pasta hilada comprenden un diverso grupo de quesos fabricados a partir de leches bovinas, bubalinas, caprinas u ovinas, y tuvieron su origen en la zona mediterránea norte que abarca Italia, Grecia, Balcanes, Turquía y Europa Oriental. Todos comparten, al final de la elaboración, una etapa común 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 la cual la cuajada caliente se estira haciendo que las proteínas formen fibras. Estos quesos pueden ser blandos o semiduros (como la Mozzarella tradicional y la Mozzarella para pizza, respectivamente) y se consumen frescos o después de un corto período de maduración. Otros quesos de pasta hilada son duros o semiduros (como Caciocavallo, Ragusano, Kashkaval y Provolone) y presentan una maduración extensa antes de su consumo (Mc Mahon, 2011).

La Mozzarella tradicional italiana, fabricada originalmente con leche de búfala es moldeada a mano en hormas ligeramente ovoidales, esferas pequeñas (*bocconcini* o *cilegie*) o trenzas (*treccie*) y con un peso que oscila entre los 20 y los 800 g dependiendo de la forma. Es un queso de alto con-

tenido de humedad (alrededor del 55%), de color blanco porcelana (por la ausencia de β -caroteno en la leche bubalina), con corteza muy fina (1 mm) y superficie lisa. El sabor es muy característico y delicado, su textura es suave y se aprecian las fibras que conforman las capas que envuelven el líquido cremoso de suave sabor láctico (De Angelis y Gobbetti, 2011). Mientras que la Mozzarella producida en las regiones italianas de Campania, Lazio y Puglia posee denominación de origen controlada (DOC) y está protegida con el nombre de «*Mozzarella di Bufala Campana*», aquellas elaboradas fuera de la región se denominan simplemente Mozzarella de búfala. La variante producida con leche de vaca, llamada tradicionalmente en Italia *Fiordilatte*, desde el año 1989 también puede rotularse como «Mozzarella» (Salvadori del Prato, 1998).

La Mozzarella semidura es la más consumida en el mundo y se ha ganado, de la mano de la pizza, un lugar importante en el mercado mundial de alimentos. En la actualidad representa el 30% de la producción quesera de los EE. UU. (el mayor productor mundial de queso) con un crecimiento del 15% en los últimos cinco años (USDA, 2018). Asimismo, la incorporación creciente de este queso en el consumo chino está cambiando la matriz productiva de los grandes exportadores de leche, los cuales están volcando un gran volumen de materia prima para la elaboración de este producto (originalmente destinada para la producción de leche en polvo).

La Mozzarella para pizza se elabora a partir de leche bovina por lo general, parcialmente descremada y presenta diferencias sustanciales en el proceso de elaboración ya que conlleva un período de maduración que le confiere propiedades características: fundamentalmente una mayor capacidad de derretimiento (*meltability*), la formación en caliente de largos hilos (*stretchability*), la disminución del oscurecimiento por efecto de la cocción (*browning*) y una mayor liberación de aceite durante la cocción (*free-oil*). También se busca en este tipo de queso una buena capacidad de conservación bajo congelamiento y de procesamiento en hebras o pellets para uso directo sobre la masa de la pizza (*shreddability*).

Tecnología de elaboración

La tecnología de elaboración del queso Mozzarella es similar a la de otros quesos de pasta blanda como el Cremoso o el Crescenza (proceso de carácter predominantemente enzimático), que se diferencia principalmente por el proceso de hilado. El hilado es un proceso de texturado de la masa o cuajada que se logra mediante la acción de una fuerza mecánica a elevada temperatura (55–

70 °C) con el fin de obtener una masa lisa y con la capacidad de formar largos hilos para lo cual es necesario trabajar con una cuajada desmineralizada en una proporción determinada. Por acción enzimática se conforma la red tridimensional (cuajada). El calcio es parte fundamental de esta y se fija en forma de fosfato tricálcico. Al aumentar la acidez, la cuajada se desmineraliza pasando las estructuras de enlace de las caseínas a fosfato monocálcico (Walstra, 1999:133). Esta estructura más débil se alinea por la acción del calor y el trabajo mecánico, dejando bandas de proteína separadas entre sí por grasa y agua libre. En la Fig. 1 puede verse de manera simplificada la distribución de la grasa y las micelas de caseína, desde el estado de suspensión en la leche hasta la formación de la cuajada hilada, pasando por la estructura de red con enlaces de fosfato tricálcico de la cuajada a pH mayores.

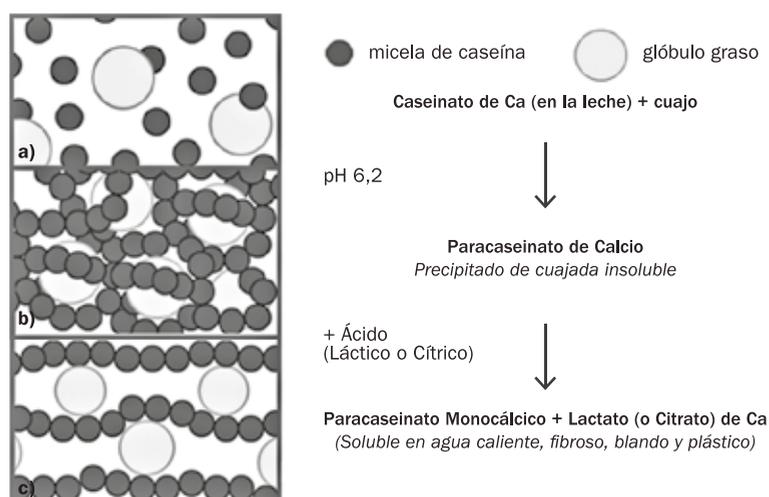


Figura 1. Distribución de las micelas de caseína y la grasa en las diferentes etapas de elaboración: a) leche, b) cuajada y c) cuajada hilada

Si la acidez es demasiado alta, las fibras se cortan fácilmente debido a una elevada pérdida de calcio. Por el contrario, si no se llega a una desmineralización adecuada, la masa es difícil de trabajar y la textura deseada no se logra ya que se requiere un mayor trabajo de hilado dando lugar a una masa más consistente que puede acarrear una pérdida elevada de materia grasa. Asimismo, el aumento de la acidez se logra por acción microbiana (tradicional) o por acidificación directa.

El proceso enzimático comienza con la acción del cuajo sobre la micela caseínica. Al cortarse (hidrolizarse) el enlace 105–106 (Phe–Met) de la k–caseína, esta se divide en para–k–caseína hidrofóbica (péptidos 1–105) y en glicomacropéptido hidrofílico (GMP, 106–169). La emulsión entonces se desestabiliza y se forma el gel por acción de fuerzas de van der Waals entre las moléculas (en un principio) y luego esa unión se va haciendo más firme a medida que se generan puentes (uniones salinas) gracias a la acción de los iones Ca^{2+} (Walstra y col., 1999). Una vez que se obtiene la firmeza de coágulo necesaria, se puede proceder a la deshidratación parcial del mismo mediante el corte de la cuajada (lirado).

La temperatura de elaboración, junto con el tamaño de grano, define la humedad retenida en la cuajada. Cuando se elabora un queso de elevada humedad, como es el caso de la Mozzarella tradicional italiana, se trabaja a temperatura de coagulación constante entre 38 y 40 °C y se corta la cuajada en cubos de 2,5–3 cm de arista. En el caso de la Mozzarella para pizza, se parte de una temperatura de coagulación algo menor (aproximadamente 37 °C) y se la calienta ligeramente luego del corte para obtener una masa más seca. Una vez logrado el tamaño de grano deseado se deja reposar la cuajada bajo suero hasta lograr la desmineralización deseada. El pH de la cuajada en este punto tiene especial relevancia ya que el equilibrio del calcio se ve influido directamente.

El contenido de calcio de las micelas y el agente acidificante utilizado influyen en gran medida en el rango óptimo de pH para el hilado. Si se trabaja con leches ácidas que presentan una elevada desmineralización se debe hilar a un valor de pH mayor al normal mientras que si se trabaja con leche de búfala, que es mucho más rica en caseínas y calcio, se debe llegar a valores de pH cercanos a 4,9 para obtener un hilado óptimo (Fig. 2).

En cuanto al agente acidificante, se observa que para una leche de vaca acidificada por acción del starter, el rango óptimo de pH para el hilado es de aproximadamente 5,1–5,2. Por otro lado, si la misma leche es acidificada de manera directa con ácido cítrico, el rango de pH óptimo de hilado oscila entre 5,6 y 5,8, mientras que si agrega ácido acético o láctico es de 5,4–5,6 (Addeo, 1996). Esto se debe a la variación del poder secuestrante de los cationes Ca^{2+} de los distintos ácidos. Estudios realizados con glucono- δ -lactona reportan valores similares al agregado directo de ácido láctico (Giraffa y Olivari, 1992).

La cuajada ácida se corta en trozos delgados para favorecer el intercambio de calor e hilar de manera uniforme en el menor tiempo posible, trabajando la cuajada a una temperatura de entre 55 y 70 °C. Una vez superados los 50 °C se solubiliza la grasa, lo que suaviza la cuajada permitiendo el esti-

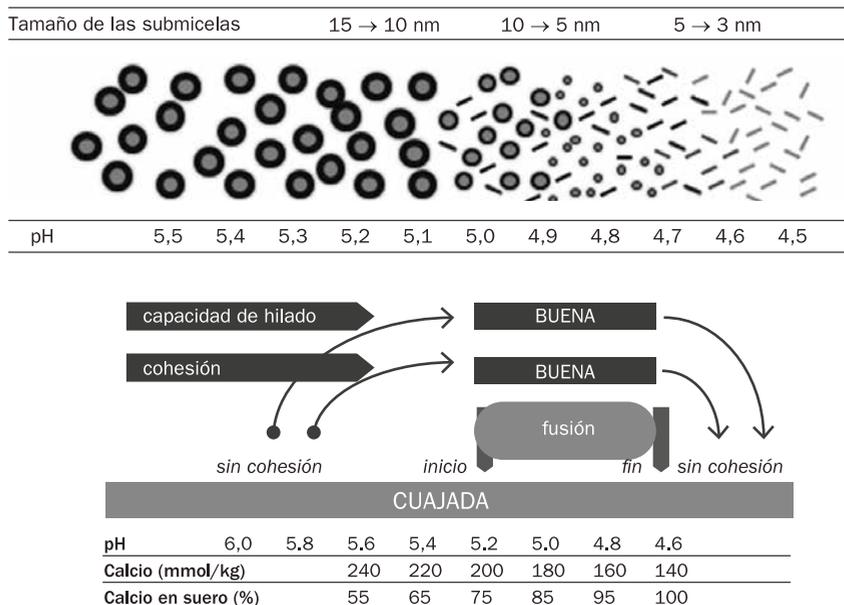


Figura 2. Descalcificación de la cuajada de leche de búfala y variación de la aptitud para el hilado en función del pH. Adaptado de Addeo y col., 1995

ramiento de las fibras proteicas con la acción mecánica. Cuando se alcanzan los 70°C, se comienzan a desnaturalizar las proteínas dando lugar a la pérdida de la estructura. La aparición de finos hilos en la masa ya flexible y brillante en superficie muestra que el proceso está finalizado. Si se continúa trabajando la masa, la pérdida de grasa será excesiva y los hilos comenzarán a cortarse fácilmente al ser estirados generando un producto de textura gomosa y defectuosa. Una vez logrado el punto de hilado deseado se debe dar la forma definitiva al queso. Las hormas obtenidas se enfrían rápidamente por inmersión en agua helada lo que permite conservar la forma del queso y también su brillo característico.

El salado del queso puede realizarse en la etapa de enfriamiento, durante el hilado (mediante el agregado de sal al agua caliente) o agregando la sal en seco a la cuajada feteada previo al ingreso a la hiladora (cheddarizado). En el caso de la Mozzarella tradicional, llegada esta instancia, ya se encuentra lista para su consumo pues no requiere maduración. Por lo general, para que conserve su brillo exterior y no se seque por fuera, se la conserva en líquido de gobierno. Esta solución básicamente debe ser isotónica, para evitar la migración de sales entre el líquido y la Mozzarella, y debe estar tam-

ponada a un pH similar al del queso. En el caso de la Mozzarella para pizza, se acostumbra a envasarla al vacío y otorgarle un período mínimo de maduración de unos 15 días. Este período de tiempo permite una proteólisis del queso que le confiere las características deseadas, especialmente mejorando la manera en que se expande sobre la masa al calentarse (*meltability*) (Banville y col., 2013) y promoviendo el consumo de la galactosa por parte de los lactobacilos presentes en la matriz para evitar la aparición de manchas oscuras por reacciones de Maillard durante la cocción (*browning*). Es común en el caso del *pizza cheese* someterlo a una trituración para obtener trozos pequeños que se congelan individualmente con el fin de facilitar su aplicación y dosificación sobre la masa de pizza.

En nuestro país, particularmente en Buenos Aires, se consume la denominada «Mozzarella bonaerense» que se elabora con una masa premadurada. Sus orígenes se encuentran en los primeros tambos fábricas que, con leche cruda, entera y sin las condiciones higiénico–sanitarias adecuadas, producían una masa que les permitía sacar la producción de dichos campos. Durante el almacenamiento y transporte de la cuajada a los centros de acopio en la ciudad se produce la maduración de la misma, lo que permite su hilado (Vigliengo, 2013). Al momento del hilado, el quesero tritura la masa con distintos tiempos de premaduración con el fin de ajustar las condiciones de hilado. Esta operación se realiza en hiladoras discontinuas calefaccionadas con vapor directo. Debido a que en Buenos Aires se prefiere este tipo de Mozzarella, cuidando las condiciones higiénico–sanitarias se sigue produciendo cuajada premadurada, en bandejas o moldeada, para ser luego hilada. En el diagrama de la Fig. 3 se muestran las distintas tecnologías empleadas en nuestro país.

Incorporación de cultivos probióticos

La búsqueda de productos alimenticios funcionales, es decir, que confieren un aporte a la salud del consumidor más allá de su valor nutritivo, ha llevado a la incorporación de variantes tecnológicas también en este tipo de quesos. La demanda mundial de alimentos adicionados de microorganismos probióticos está aumentando significativamente debido a la creciente conciencia entre los consumidores sobre su relación directa con los beneficios para la salud. Se estima que el mercado de probióticos (USD 49,4 mil millones en 2018) crecerá a una tasa compuesta anual de 7,0% para alcanzar un valor de USD 69,3 mil millones para 2023 (USDA, 2018).

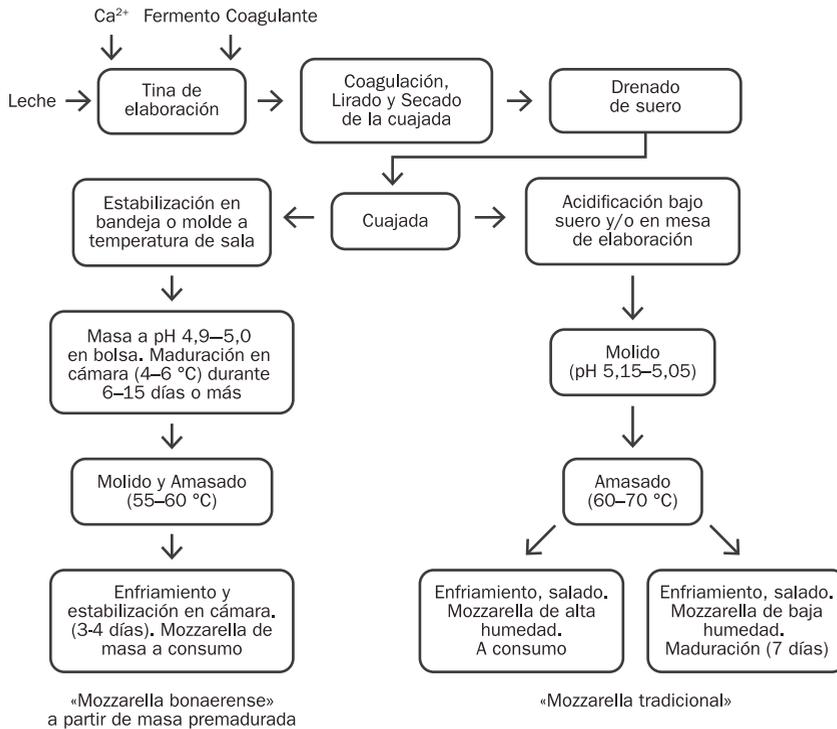


Figura 3. Procesos utilizados en la elaboración de distintos tipos de Mozzarella

Los efectos sobre la salud debidos al consumo de microorganismos probióticos están ampliamente demostrados y se han propuesto numerosos mecanismos para explicarlos, entre ellos: metabolización de carbohidratos complejos, defensa contra microorganismos patógenos (producción de componentes antimicrobianos, competencia por sitios de adhesión y nutrientes), modulación de la permeabilidad de la barrera intestinal y estimulación del sistema inmunológico, entre otras (Dongarrà y col., 2013; Barberi y col., 2015).

Los quesos de pasta hilada poseen un proceso de elaboración hostil para la sobrevivencia de los microorganismos mesófilos, especialmente por el fuerte tratamiento térmico, lo que representa un desafío tecnológico para ser considerados como vehículo adecuado para la incorporación de probióticos. Recientes estudios desarrollados en el INLAIN han logrado la selección e incorporación de cepas probióticas comerciales a un queso fresco de pasta hilada tipo *Fiordilatte* (Cuffia y col., 2017, 2019) que, por sus características sobresalientes para el consumo en ensaladas y platos fríos, se presentan como una vía óptima para la incorporación de probióticos en la dieta.

De esta manera, la tecnología desarrollada que contempla específicamente la adición de cepas comerciales de *L. rhamnosus* GG (quesos G), *L. acidophilus* LA5 (quesos L) (Chr. Hansen s/A, Dinamarca), y la combinación de ambas (quesos GL), serán sujetos de estudio del presente capítulo.

Si bien las leches fermentadas y los yogures adicionados de probióticos son los alimentos funcionales más estudiados y comercializados, varios trabajos han demostrado que los quesos son vehículos apropiados para la incorporación de estos microorganismos, presentando incluso algunas ventajas sobre las leches fermentadas, que darían mayor protección a las bacterias probióticas, tales como una matriz más sólida, mayor pH y mayor capacidad buffer (Burns y col., 2008, 2015; Gomes da Cruz y col., 2009). No obstante, existen escasas evidencias de la incorporación de microorganismos probióticos a quesos frescos de pasta hilada. En particular, estos trabajos hacen referencia a la adición de bacterias probióticas microencapsuladas en alginatos o pre-adaptadas al calor (Minervini y col., 2012; Ortakci y col., 2012; Angiolillo y col., 2014).

Los probióticos se definen como «microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del consumidor» (Hill y col., 2014). Esta definición implica que estos microorganismos deben mantener su viabilidad y llegar en elevada concentración al intestino, lugar donde ejercen su efecto beneficioso.

El desarrollo realizado en el INLAIN implicó realizar ajustes en la tecnología tradicional de elaboración de quesos tipo *Fiordilatte*, seleccionar cepas probióticas con elevada resistencia térmica y encontrar un medio de cultivo que permitiera realizar recuentos entre lo/s microorganismo/s probiótico/s y el cultivo iniciador (*starter*) utilizado (*S. thermophilus* STI-14—Chr. Hansen).

En particular, los parámetros tecnológicos seleccionados como óptimos fueron: acidificación de la cuajada (pH $5,20 \pm 0,05$), tiempo de hilado (10 min) y temperatura del agua hilado ($79,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$), lo que implica una temperatura del interior de la cuajada de $60,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$. El recuento selectivo de los microorganismos probióticos se realizó en agar MRS-bilis (de Man, Rogosa and Sharpe agar —Biokar, Beauvais, Francia— + bilis bovina 0,15 % (p/v) —Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA—) a 37°C , 48 h, en aerobiosis (Cuffia y col., 2019). Cabe aclarar que el cultivo iniciador no fue capaz de desarrollar en MRS-bilis y ambos probióticos se diferenciaron según las características morfológicas de las colonias.

El control de la viabilidad de los microorganismos probióticos se realizó una vez incorporados a la leche de la tina, en la cuajada antes del hilado y en los diferentes quesos (G, L y GL) luego de 1, 8, 15 y 29 días de almacenamiento a 4°C y a 12°C .

El inóculo inicial de *L. rhamnosus* GG y *L. acidophilus* LA5 fue de 7,0–7,3 log UFC/mL en la leche y su concentración fue $\geq 8,0$ log UFC/g en las cuajadas. En los tres tipos de quesos ambos probióticos mantuvieron un nivel superior a 6,8 log UFC/g hacia el final de la maduración, lo cual está dentro de la concentración que debe tener un alimento funcional adicionado de microorganismos probióticos (al menos 6,0–7,0 log UFC/g) (Angiolillo y col., 2014). Sin embargo, la temperatura de almacenamiento de los quesos influyó significativamente no solo en el nivel de células viables sino también en las características de los quesos.

Temperatura de almacenamiento

Impacto en la viabilidad de las cepas probióticas y en las características fisicoquímicas y bioquímicas de los quesos

La temperatura de almacenamiento de un alimento en góndola es un factor importante a tener en cuenta para garantizar su calidad durante la vida útil. En nuestro trabajo (Cuffia y col., 2019) se evaluó el efecto de la temperatura de almacenamiento (4 °C y 12 °C) sobre las características microbiológicas, químicas y sensoriales de los quesos G, L y GL. Cuando los quesos fueron almacenados a temperatura de refrigeración (4 °C), la viabilidad de ambas cepas probióticas se mantuvo constante en los tres tipos de quesos hasta el final de la maduración (29 días), con niveles mayores a 7 log UFC/g. Sin embargo, cuando se almacenaron a 12 °C (temperatura habitual de las góndolas abiertas de supermercados), se observó un desarrollo significativo de *L. rhamnosus* GG en los quesos G y GL (no así de *L. acidophilus* LA5). Dado que *Streptococcus thermophilus*, microorganismo utilizado como *starter* en la elaboración de quesos tipo *Fiordilatte* suele ser una bacteria galactosa negativa, su metabolismo genera una concentración residual de galactosa en la cuajada (Kindstedt y col., 2004; Iyer y col. 2010) la que puede ser metabolizada, junto con la lactosa residual, por cultivos adjuntos como *L. rhamnosus*. Si la temperatura es adecuada, permiten el crecimiento de dicho microorganismo, lo cual pudo apreciarse a partir del día 15 de almacenamiento a 12 °C (> 1 orden log) en los quesos G y GL, llegando a valores de 9 log UFC/g hacia el final de la maduración (crecimiento $> 1,5$ log UFC/g). Aun cuando el desarrollo de una cepa probiótica podría ser considerado como un aspecto positivo para la funcionalidad del alimento, se debe prestar especial atención al impacto de su actividad metabólica sobre las características sensoriales y la calidad del producto (Cuffia y col., 2019).

En términos generales, la composición global de los quesos (valores de grasa, proteína y humedad) no se ve afectada por la incorporación de microorganismos probióticos (Minervini y col., 2012; Ortakci y col., 2012; Cuffia y col., 2017, 2019). Como se mencionó anteriormente, los azúcares residuales de la cuajada (galactosa y lactosa) pueden ser metabolizadas por cultivos adjuntos como *L. rhamnosus* y *L. acidophilus*, lo que da lugar a la producción de ácidos orgánicos (Watson y col., 2012). Como resultado, las altas concentraciones de estos cultivos incorporados en los quesos producen una gran cantidad de ácido D-láctico durante la maduración, lo que genera valores de pH más bajos. Asimismo, fenómenos de pos acidificación debidos al almacenamiento a temperaturas inadecuadas y a la presencia de cultivos complementarios han sido reportados (Vinderola y col., 2009; Guidone y col., 2015). Esto estaría de acuerdo con los resultados observados ya que no se detectaron diferencias significativas en el pH cuando los quesos se almacenaron a 4 °C y los valores se mantuvieron estables ($\sim 5,25$) durante todo el proceso de maduración, lo que se correlaciona directamente con la estabilidad observada en la viabilidad de *L. acidophilus* LA5 y *L. rhamnosus* GG. Esto indicaría que, a la temperatura mencionada, la incorporación de cultivos probióticos (individualmente o combinados) no presenta capacidad para acidificar el medio (Milesi y col., 2008; Cuffia y col., 2017). Sin embargo, cuando la maduración se realizó a 12 °C, se comprobó un comportamiento diferente. Durante el primer día de almacenamiento, no se observaron diferencias significativas de pH; sin embargo, después del octavo, se evidenció una disminución significativa entre las muestras (GL12 > G12 > L12). Finalmente, se detectó la presencia de un efecto sinérgico en la producción de ácidos a partir de los 15 días de almacenamiento a 12 °C, ya que los quesos adicionados con ambos probióticos presentaron valores de pH significativamente más bajos que aquellos que sólo contenían una cepa.

El contenido de nitrógeno en la fracción soluble a pH 4,6 (NS-4,6) representa la proteólisis primaria y se produce a partir de la descomposición de las caseínas intactas (especialmente las caseínas α_1 y β) principalmente por proteasas no microbianas. En los quesos blandos, en particular, el cuajo residual es el principal agente no microbiano que participa en la proteólisis durante la maduración (Delacroix-Buchet y Fournier, 1992; Vélez y col., 2015). Por otro lado, el contenido de nitrógeno en las fracciones de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (NS-TCA) y fosfotúngstico (NS-PTA) representa la proteólisis secundaria, que se produce principalmente por la actividad de enzimas proteolíticas microbianas de los cultivos iniciador y adjunto y también de NSLAB (*non-starter lactic acid bacteria*) (Fox y col., 1996). Estas enzimas hidrolizan los péptidos grandes y medianos, lo que lleva a la producción de péptidos más pequeños y aminoácidos libres (FAA, *free aminoacids*).

Se ha demostrado la capacidad de *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* para generar péptidos, aminoácidos y compuestos de nitrógeno más pequeños durante la fermentación láctica impulsada por su sistema proteolítico (Azcarate-Peril y col., 2005; González-Olivares y col., 2014; Gobetti y col., 2015), efecto que se intensifica cuando la temperatura de almacenamiento se acerca a la temperatura óptima del sistema mencionado, lo que podría generar un aumento en la proteólisis secundaria. En este sentido, las enzimas de los cultivos adjuntos presentes en la matriz del queso podrían ser responsables de aumentar la fracción de NS-TCA y NS-PTA, lo que conlleva a la formación de compuestos aromáticos (Minervini y col., 2012). Los niveles de NS-4,6 no mostraron diferencias significativas entre los quesos G, L y GL y los valores de las fracciones NS-TCA y NS-PTA fueron significativamente más altos en los quesos almacenados a 12 °C respecto de los almacenados a 4 °C. Ninguno de los cultivos probióticos, agregados individualmente o combinados, tuvo un impacto en la proteólisis primaria, lo que se evidenció por los valores de NS-4,6, pero sí se detectó un aumento en la proteólisis secundaria, principalmente cuando se agregaron combinados.

Aspectos sensoriales

La temperatura de almacenamiento es un factor importante para la conservación de los productos alimenticios con elevado contenido de humedad y puede impactar en las características sensoriales de un producto.

A fin de determinar el comportamiento de los quesos estudiados, se llevó a cabo un Análisis Cuantitativo Descriptivo a partir de panelistas entrenados, quienes no percibieron diferencias significativas en la apariencia de los quesos y los describieron como blancos, lisos y con una superficie brillante, requisitos básicos de los quesos de pasta hilada (Jana y Mandal, 2011). Asimismo, no detectaron cantidades significativas de exudado dentro de la masa al dividir las muestras.

Dado que los niveles de grasa y humedad afectan principalmente el color y la cantidad de exudado (Wadhvani y McMahon, 2012) y, como se describió anteriormente, la composición general no mostró diferencias entre los quesos, era de esperarse que el color, el brillo y las cantidades de exudado fueran similares en las muestras almacenadas a ambas temperaturas.

El almacenamiento de quesos a temperaturas elevadas de refrigeración puede inducir varios cambios en el perfil de los compuestos volátiles que pueden provocar una disminución de sus cualidades (Bishop y Smukowski, 2006; Jana y Mandal, 2011). De esta manera, los quesos almacenados a 12 °C

presentaron una intensidad de olor significativamente mayor que los almacenados a 4 °C, independientemente del cultivo complementario utilizado.

Las puntuaciones para el sabor amargo y ácido fueron significativamente más altas en G12, L12, GL12 que en G4, L4 y GL4. El mayor sabor ácido coincidió con los valores de pH más bajos, lo que indica que existe una correlación directa entre el análisis sensorial y las características fisicoquímicas. Además, el retrogusto fue significativamente más fuerte en las muestras maduradas a 12 °C. En este sentido, es importante destacar que el sabor amargo se debe a la actividad proteolítica de algunas cepas (Chandan, 2014) y ha sido reportada por parte de *L. rhamnosus* GG en quesos frescos almacenados a 14 °C (González–Olivares y col., 2014) lo que podría deberse al hecho de que la actividad proteolítica se promueve a temperaturas más cercanas a la óptima para el sistema proteolítico de las BAL (bacterias ácido–lácticas).

Los atributos de textura mecánica tales como firmeza, elasticidad y masticabilidad no mostraron diferencias entre las muestras. Por otro lado, la mayor temperatura de almacenamiento hizo que los quesos se adhirieran más a los dientes y al paladar, encontrándose mayor granulosidad en G12, L12 y GL12, lo que corresponde a un queso más ácido.

En vistas de que las características texturales, de apariencia y de sabor afectan la calidad general, los panelistas consideraron que la temperatura de almacenamiento jugó un papel fundamental en la diferenciación entre los quesos, lo que se vio reflejado en las puntuaciones de calidad general (significativamente más altas en los quesos almacenados a 4 °C que los almacenados a 12 °C).

Aspectos funcionales

L. rhamnosus GG y *L. acidophilus* LA5 son dos cepas probióticas comerciales con efectos benéficos ampliamente demostrados (De Vrese y col., 2011; Gorbach y col., 2016). Sin embargo, cuando se incorporan a un alimento, sus características funcionales pueden verse afectadas debido a la presencia de diversos ingredientes en la matriz alimentaria tales como compuestos bioactivos. Es así que, para un alimento adicionado de cepas probióticas es necesario demostrar la funcionalidad del producto final mediante ensayos *in vivo*.

En este sentido, en el INLAIN se evaluó la funcionalidad de los quesos frescos de pasta hilada L, G y GL (almacenados a 4 °C durante 15 días) utilizando un modelo de ratones BALB/c.

Los animales fueron alimentados durante 10 días consecutivos, mediante 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 de microbiota entérica a hígado 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 anti y pro-inflamatorias en intestino delgado y grueso por técnica de Elisa. Un grupo de animales recibió queso control (c) (elaborado sin la adición de cepas probióticas).

En todos los casos el ensayo de translocación resultó negativo, indicando que todos 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 control. El nivel de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α e IFN- γ) en homogenado de intestino delgado y grueso se redujo significativamente en los animales alimentados con los quesos probióticos respecto al grupo control. En particular, los grupos G y GL presentaron niveles significativamente menores de IL-6 y TNF- α en homogenado de intestino delgado.

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 confirma que el efecto benéfico de los microorganismos probióticos es cepa-dependiente y debe evaluarse cada caso particular.

Hasta el momento no se reportan datos en la bibliografía en los cuales se demuestre la funcionalidad *in vivo* de quesos tipo *Fiordilatte* adicionados de microorganismos probióticos. El aporte realizado en el INLAIN puede ser considerado muy valioso ya que se logró desarrollar exitosamente quesos frescos de pasta hilada adicionados de cepas probióticas y demostrándose su funcionalidad *in vivo*, lo cual podría ampliar la oferta de alimentos funcionales existentes en el mercado.

Referencias bibliográficas

- Addeo, F.; Emaldi, G.C. y Masi, P. (1995).** Tradizione e innovazione nella produzione della «Mozzarella di bufala Campana». *Bubalus Bubalis*, 3, 46–62.
- Addeo, F. (1996).** Actas del Congreso Internacional de Tecnología en Producción de Quesos organizado por Chr.Hansen–FEPALE. Buenos Aires, 276.
- Angiolillo, L.; Conte, A.; Faccia, M.; Zambrini, A. y Del Nobile, M. (2014).** A new method to produce symbiotic Fiordilatte cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 180–187.
- Azcarate-Peril, M.A.; Mcauliffe, O.; Altermann, E.; Lick, S.; Russell, W.M. y Klaenhammer, T.R. (2005).** Microarray analysis of a two–component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5794–5804.
- Banville, V.; Morin, P.; Pouliot, Y. y Britten, M. (2013).** Physical properties of pizza Mozzarella cheese manufactured under different cheese–making condition. *Journal of Dairy Science*, 96, 4804–4815.
- Barberi, C.; Campana, S.; De Pasquale, C.; Rabhani Khorasgani, M.; Ferlazzo, G. y Bonaccorsi, I. (2015).** T cell polarizing properties of probiotic bacteria. *Immunology Letters*, 168(2), 337–342.
- Bishop, J.R. y Smukowski, M. (2006).** Storage temperatures necessary to maintain cheese safety. *Food Protection Trends*, 26(10), 714–724.
- Burns, P.; Patrignani, F.; Serrazanetti, D.; Vinderola, G.C.; Reinheimer, J.A.; Lanciotti, R. y Guerzoni, M.E. (2008).** Probiotic crescenza cheese containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high–pressure homogenized milk. *Journal of Dairy Science*, 91, 500–512.
- Burns, P.; Patrignani, F.; Tabanelli, G.; Vinderola, G.C.; Siroli, L.; Reinheimer, J.A.; Lanciotti, R. y col. (2015).** Potential of high–pressure homogenisation on probiotic Caciotta cheese quality and functionality. *Journal of Functional Foods*, 13, 126–136.
- Chandan R. (2014).** Dairy fermented products. En Clark S.; Jung S. y Lamsal, B. (Eds.). *Food Processing: Principles and Applications, Second Edition*. Minnesota, USA: John Wiley & Sons, Ltd., 405–435.
- Cuffia, F.; George, G.; Renzulli, P.; Reinheimer, J.A.; Meinardi, C. y 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.; Pavón, Y.; George, G.; Reinheimer, J.A. y Burns, P. (2019).** 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, 588–596.
- De Angelis, M. y Gobbetti, M. (2011).** Pasta–Filata Cheeses: Traditional Pasta–Filata Cheese. En *Encyclopedia of Dairy Sciences Second Edition*. Londres: Elsevier, 745–752.
- Delacroix–Buchet, A. y Fournier, S. (1992).** Protéolyse et texture des fromages à pâte cuite pressée. II. Influence de la chymosine et des conditions de fabrication. *Lait*, 72, 53–72.
- De Vrese, M.; Kristen, H.; Rautenberg, P.; Laue, C. y 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.
- Dongarrà, M.L.; Rizzello, V.; Muccio, L.; Fries, W.; Cascio, A.; Bonaccorsi, I. y Ferlazzo, G. (2013).** Mucosal immunology and probiotics. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13(1), 19–26.
- Fox, P.; Wallace, J.; Morgan, S.; Lynch, C.; Niland, E. y Tobin, J. (1996).** Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 271–297.
- Giraffa, G. y Olivari, G. (1992).** Impiego di glucono delta lattone nella fabbricazione di formaggi. Nota II: mozzarella. *L'industria del latte*, 28, 59–72.
- Gobbetti, M.; De Angelis, M.; Di Cagno, R.; Mancini, L. y Fox, P. (2015).** Pros and cons for using non–starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology*, 45, 167–178.
- Gomes da Cruz, A.; Buriti, A.F.C.; Batista de Souza, C.H.; Fonseca Faria, J.A. y Saad, S.M.I. (2009).** Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 344–354.

- González-Olivares, L.; López-Cuellar, Z.; Añorve-Morga, J.; Franco-Fernández, M.; Castañeda-Ovando, A.; Contreras-López, E. y Jaimez-Ordaz, J. (2014).** Viability and proteolytic capacity of *Lactobacillus bulgaricus* 2772 and *Lactobacillus rhamnosus* GG during cheese ripening. *Journal of Biosciences and Medicines*, 2, 7–12.
- Gorbach, S.; Doron, S. y Magro, F. (2016).** *Lactobacillus rhamnosus* GG. En *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis*. Londres: Elsevier, 79–89.
- Guidone, A.; Braghieri, A.; Cioffi, S.; Claps, S.; Genovese, F.; Morone, G. y col. (2015).** Effect of adjuncts on microbiological and chemical properties of Scamorza cheese. *Journal of Dairy Science*, 98, 1467–1478.
- Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Sanders, M.E. y col. (2014).** 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, 506–514.
- Iyer, R.; Tomar, S.; Uma Maheswari, T. y Singh, R. (2010).** *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 20, 133–141.
- Jana, A.H. y Mandal, P.K. (2011).** Manufacturing and Quality of Mozzarella Cheese: A Review. *International Journal of Dairy Science*, 6(4), 199–226.
- Kindstedt, P.; Carić, M. y Milanović, S. (2004).** Pasta filata cheeses. En Fox, P.; McSweeney, P.; Cogan, T. y Guinee, T. (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Londres: Elsevier, 251–257.
- McMahon, D.J. (2011).** Pasta-Filata Cheeses: Low-Moisture Part-Skim Mozzarella (Pizza Cheese). En *Encyclopedia of Dairy Sciences Second Edition*. Londres: Elsevier, 737–744.
- Minervini, F.; Siragusa, S.; Faccia, M.; Dal Bello, F.; Gobbetti, M. y De Angelis, M. (2012).** Manufacture of Fiordilatte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli. *Journal of Dairy Science*, 95, 508–520.
- Milesi, M.; Mc Sweeney, P. y Hynes E. (2008).** Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 884–892.
- Ortakci, F.; Broadbent, J.R.; McManus, W.R. y 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.
- Salvadori del Prato, O. (1998).** Mozzarella. *Trattato di tecnologia casearia*. Boloña: Edagricole, 593–605.
- United States Department of Agriculture (USDA) (2018).** Estadísticas recuperadas de https://quickstats.nass.usda.gov/results/BEA543C-0754-399D-AA91-2ABE7D608E87?pivot=short_desc
- Vélez, M.; Bergamini, V.; Ramonda, M.; Candiotti, M.; Hynes, E. y Perotti, M. (2015).** Influence of cheese making technologies on plasmin and coagulant associated proteolysis. *LWT—Food Science and Technology*, 64, 282–288.
- Vigliengo, E. (2013).** Síntesis del material de las charlas técnicas. *ExpoSuipacha 2013*, 116.
- Vinderola, G.; Prosello, W.; Mollinari, F.; Ghiberto, D. y Reinheimer, J.A. (2009).** Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinean probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 171–174.
- Wadhvani, R. y McMahon, D. (2012).** Colour of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. *Journal of Dairy Science*, 95, 2336–2346.
- Walstra, P.; Geurts, T.J.; Noomen, A.; Jellema, A. y van Boekel, M.A.J.S. (1999).** *Dairy Technology. Principles of Milk Properties and Processes*. New York: Marcel Dekker.
- Watson, D.; O’Connell Motherway, M.; Schoterman, M.; Joost van Neerven, R.; Nauta A. y van Sinderen, D. (2012).** Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 1132–1146.

Página web

(2018) <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/probiotic-market-advanced-technologies-and-global-market-69.html>

6. Exopolisacáridos (EPS) de *Lactobacillus fermentum*: nuevos ingredientes alimentarios con doble rol tecnológico y funcional para productos lácteos

Elisa Ale, Jorge Reinheimer y Ana Binetti

Lactobacillus fermentum es una bacteria láctica heterofermentativa obligada que forma parte de la microflora intestinal y suele encontrarse también en la flora secundaria de distintas variedades de quesos pero que, debido a su metabolismo, representa muchas veces un problema para la industria que-
sera por el defecto de hinchazón que genera.

Una característica muy valiosa de muchas cepas de bacterias lácticas (entre ellas, algunas pertenecientes a *L. fermentum*) es su capacidad de formar exopolisacáridos (EPS) como parte de su metabolismo, que suelen excretarse al medio modificando su reología y mejorando en ciertos casos la textura de un alimento (quesos o yogures, por ejemplo). Asimismo, a algunos de estos polisacáridos se les atribuyen efectos fisiológicos positivos en la salud del consumidor (actividad inmunomoduladora, prevención de úlceras, reducción del colesterol, protección frente a infecciones, rol prebiótico, etc.). De este modo, los EPS de *L. fermentum*, agregados en forma de ingredientes naturales, podrían aportar un doble rol tecnológico y funcional a la matriz alimentaria donde se encuentran, permitiendo la formulación de alimentos novedosos.

Introducción

Algunas bacterias lácticas (BAL) son capaces de producir polímeros exocelulares o exopolisacáridos (EPS) que pueden ser excretados al medio (EPS *slime*) o permanecer fuertemente unidos a la pared celular de la bacteria productora (polisacáridos capsulares o CPS). A su vez, estos polímeros pueden estar formados por un solo tipo de monosacárido (homopolisacáridos, HOPS) o bien, pueden presentar más de un tipo de monosacárido en su composición (heteropolisacáridos, HEPS), siendo los mecanismos de síntesis particulares para cada caso (Cerning, 1995). Estas moléculas son frecuentemente utilizadas en la industria alimenticia por sus propiedades tecnológicas, por ejemplo, en la producción de leches fermentadas y diversos tipos de quesos, donde se aplican *in situ* las cepas productoras de EPS para mejorar las características sensoriales y la textura del producto final (Amatayakul, 2006a). Asimismo, algunos EPS son capaces de reducir la sinéresis debido a su capacidad para retener agua (Amatayakul, 2006b), lo cual es beneficioso en ciertos yogures, o pueden aplicarse en productos con bajo contenido de grasa como ciertos quesos (que suelen presentar una textura más gomosa o áspera que aquellos con contenido de grasa normal), permitiendo el diseño de productos más saludables con características mejoradas (Dabour y col., 2006). Por otro lado, en los últimos años, se les han atribuido a estos biopolímeros ciertos efectos positivos para la salud del consumidor, lo que los hace doblemente atractivos para su aplicación en alimentos. Estos beneficios son específicos para cada polisacárido o su cepa productora y dependen fuertemente de su naturaleza química y de la interacción con los componentes de la matriz alimentaria (Hidalgo–Cantabrana, 2012). Dentro de las propiedades funcionales se pueden mencionar: rol prebiótico, protección frente a úlceras estomacales y frente a patógenos, propiedades anticolesterolémicas, inmunomoduladoras, antioxidantes y antitumorales (Ruas–Madieto y col., 2002).

Particularmente en las BAL, el rol ecológico o fisiológico de los EPS para la bacteria productora resulta poco claro y se lo ha asociado a un rol protector frente a condiciones extremas en diversos nichos (a través de la formación de biofilms) o al metabolismo del carbono (Zannini y col., 2016).

Entre las BAL, el género *Lactobacillus* incluye más de 200 especies (Salvetti y col., 2018) y posee gran interés industrial debido a sus propiedades, tanto tecnológicas como funcionales o probióticas, frecuentemente asociadas a la síntesis de EPS. Dentro del género, *Lactobacillus fermentum* es una especie heterofermentativa obligada que se encuentra formando parte de la microbiota intestinal, como así también de la flora secundaria de distintas varie-

dades de quesos, causando importantes defectos relacionados con la producción de gas (hinchazón tardía). Sin embargo, a pesar de ser un alterante en ciertas elaboraciones casearias, en otras se agrega *ex professo*, buscando la producción de pequeños ojos, como en el caso de algunos quesos italianos y mejicanos (Dal Bello, comunicación personal).

Con relación a su uso como probiótico, documentado en la última década, *L. fermentum* posee ciertas propiedades particulares comparado con otras bacterias probióticas, como su habilidad para producir antioxidantes (como glutationato) y ácidos grasos de cadena corta (SCFA, *Short Chain Fatty Acids*) así como la inducción del desarrollo de otras especies de lactobacilos (Peran y col., 2006; 2007). Se han atribuido efectos antioxidantes y antimicrobianos a la cepa *L. fermentum* ME-3 (DSM 14241; Kullisaar y col., 2003), así como la capacidad para prevenir reacciones de estrés oxidativo nocivas para las células epiteliales intestinales (Truusalu y col., 2004). Otro caso es la cepa probiótica *L. fermentum* 3872, la cual produce agentes antimicrobianos como peróxido de hidrógeno y ácido láctico, y podría funcionar como una herramienta efectiva para tratar infecciones de *Campylobacter* (Lehri y col., 2017). Asimismo, la cepa probiótica *L. fermentum* CECT 5716 fue aislada de leche materna y presentó la capacidad de prevenir colitis en un modelo murino (Peran y col., 2006), potencial antimicrobiano contra *Salmonella* (Olivares y col., 2006) y mejoras en los efectos de la vacunación contra influenza (Olivares y col., 2007), además de propiedades inmunoestimuladoras *in vitro* (Pérez-Cano y col., 2010). Por otro lado, se observó que la combinación de una cepa de *L. rhamnosus* y otra de *L. fermentum* redujo el riesgo de la colonización vaginal por parte de microorganismos patógenos y el de contraer infecciones en el tracto urinario, mejorando el mantenimiento de la microbiota normal (Reid y Burton, 2002; Reid y col., 2003).

En el INLAIN, como parte de la colección de microorganismos autóctonos provenientes de diferentes ambientes de la región de influencia de Santa Fe, se seleccionó una cepa de la especie *Lactobacillus fermentum*, *L. fermentum* If2, que fue aislada como alterante de un queso Tybo, el cual presentaba defectos gasógenos causados por su metabolismo heterofermentativo. El estudio de esta cepa se basó en los importantes niveles de producción de EPS (1 g/L, aproximadamente) bajo condiciones de fermentación controlada (no optimizada), un rendimiento significativo comparado a los descriptos para BAL, que puede variar desde 0,045 a 0,35 g/L cuando crecen en condiciones no optimizadas (De Vuyst y Degeest, 1999). Este capítulo abordará, de un modo resumido, el estudio de este extracto de EPS enfocado en diversos aspectos fundamentales para comprender el comportamiento de este com-

puesto: su composición química, los genes involucrados en su síntesis, la optimización de su producción, y las propiedades tecnológicas, reológicas y funcionales cuando se lo agrega a una matriz alimentaria, con el fin de proponer su aplicación como ingrediente alimentario, con un potencial doble rol tecno–funcional.

Composición química y estructural. Interrelación con las propiedades tecnológicas y funcionales de los EPS

Diversos factores estructurales de los EPS, como la composición de monosacáridos, el peso molecular, los enlaces glucosídicos, la presencia de sustituyentes cargados y/o ramificaciones, afectan notablemente el comportamiento de estas moléculas, ya que determinan el tipo de interacción que se genera con los componentes del medio que los rodea, como los presentes en un alimento (Salazar y col., 2014).

Con relación a sus aspectos funcionales, se ha postulado que los EPS con carga negativa (presencia de fosfatos o sulfatos), con glucosa y/o galactosa en su composición, y peso molecular bajo ($< 10^6$ Da), actúan como estimuladores suaves de las células inmunes, mientras aquellos EPS neutros y con elevado peso molecular ($> 10^6$ Da) exhiben perfiles supresivos (Hidalgo–Cantabrana y col., 2012; Caggianiello y col., 2016). Asimismo, la presencia de EPS (especialmente de elevado PM) rodeando la superficie bacteriana puede inhibir su adherencia a las células intestinales, incluso a superficies abióticas, debido a un efecto de «blindaje» de las macromoléculas superficiales que actúan como adhesinas (Lee y col., 2016). Por ejemplo, la cepa *L. rhamnosus* GG, cuyo exopolisacárido rico en galactosa demostró tener bajos niveles de adhesión *in vitro* (Lebeer y col., 2009) demostró una adecuada performance *in vivo*, evidenciando que el mismo favorecería su persistencia en el tracto intestinal en un modelo murino (Lebeer y col., 2011).

Las ramificaciones en la cadena polisacáridica también parecen incidir sobre la funcionalidad de los EPS. En este sentido, Huazano–García y López (2013) sugirieron que existe una relación entre la estructura (longitud de la cadena y ramificaciones) de los fructanos y la producción de SCFA, evidenciado por un mayor nivel de SCFA cuando los fructanos eran ramificados en comparación con polisacáridos lineales.

Además de la influencia de la composición química de estas moléculas sobre su funcionalidad, también se ha estudiado su impacto en las propiedades tecnológicas. Se ha encontrado una posible interrelación entre el tipo de enlace de los HEPS y su rigidez: los enlaces $\beta(1,4)$ generan cadenas más rígi-

das que los enlaces $\alpha(1,4)$ o $\beta(1,3)$, afectando la reología del medio que los rodea, incrementando su eficiencia como texturizantes, más aún en presencia de alguna ramificación (Tuinier y col., 2001). Aquellos que contienen enlaces $\alpha(1,6)$ en la cadena principal, como el dextrano, presentan excelentes características como espesantes y estabilizantes (Zannini y col., 2016). Además, los EPS con elevado peso molecular y conformación rígida son interesantes cuando se pretende aportar viscosidad a un alimento (De Vuyst y De Vin, 2007) y la presencia de ramificaciones, también aumenta la rigidez del polímero. En cuanto al efecto de la presencia de carga sobre las propiedades fisicoquímicas del alimento, se considera que los EPS neutros aportan viscosidad pero no elasticidad al medio. Lo contrario se observa para EPS negativamente cargados, que son capaces de interactuar con las cargas positivas de las caseínas en una matriz láctea (Duboc y Mollet, 2001).

La concentración de EPS no siempre es el parámetro más importante cuando se busca aumentar la viscosidad de un alimento; por esta razón, si bien las BAL sintetizan EPS en pequeñas cantidades, en bajas concentraciones pueden ser suficientes para modificar la textura de un producto lácteo. Cuando un polisacárido neutro o con una ligera carga positiva interactúa con las caseínas, ocurre un efecto de depleción, que conduce a la formación de agregados de proteínas y EPS en la fase del suero (Buldo y col., 2016). Este fenómeno se relaciona con un detrimento de las propiedades viscoelásticas debido a la interferencia de los EPS con la red proteica, o un aumento de dichas propiedades como consecuencia de la formación de una red densa de caseína (Hassan y col., 2003; Buldo y col., 2016). La presencia de EPS en la fase del suero también genera una mayor capacidad de retención de agua en la red, causando menos sinéresis y aumentos de viscosidad (Gentès y col., 2013).

En cuanto a la estructura química se han descrito, mediante Resonancia Magnética Nuclear (NMR), más de cincuenta estructuras de las unidades repetitivas de EPS de lactobacilos y bifidobacterias representando, en algunos casos, estructuras únicas (Castro-Bravo y col., 2018).

En el caso de los EPS de *L. fermentum* Lf2, la caracterización química y estructural se llevó a cabo a partir del extracto purificado mediante metodologías adecuadas (NMR, SEC-MALS, GC-MS y HPLC), pudiendo dilucidar que el extracto de EPS está compuesto mayoritariamente por dos fracciones de polisacáridos. Por un lado, está formado por un β -glucano de peso molecular relativamente elevado ($1,23 \times 10^6$ Da), cuya unidad repetitiva es un trisacárido (Fig. 1) (Vitlic y col., 2019). La otra fracción consta de un heteropolisacárido formado por glucosa y galactosa, de peso molecular medio ($8,8 \times 10^4$ Da), cuya unidad repetitiva es muy compleja y está formada por diez monosacáridos.

polimerización de las unidades repetitivas (Lebeer y col., 2009). Dichos *clusters* se localizan principalmente en el cromosoma y se encuentran altamente conservados para el género *Lactobacillus* (Castro Bravo y col., 2018).

Para nuestra cepa en estudio, *L. fermentum* 1f2, la organización del *cluster* genético que participa en la síntesis de EPS se llevó a cabo a partir del estudio de la secuencia de su genoma (Harris y col., 2018). A partir de la secuencia *draft* del genoma, se encontraron genes que codifican para enzimas que participan en la síntesis de HEPS mediante análisis bioinformáticos (BLASTX, NCBI *database*), logrando identificar tres *clusters*, ubicados distantes entre sí, y teniendo el primero de ellos sentido opuesto a los otros dos.

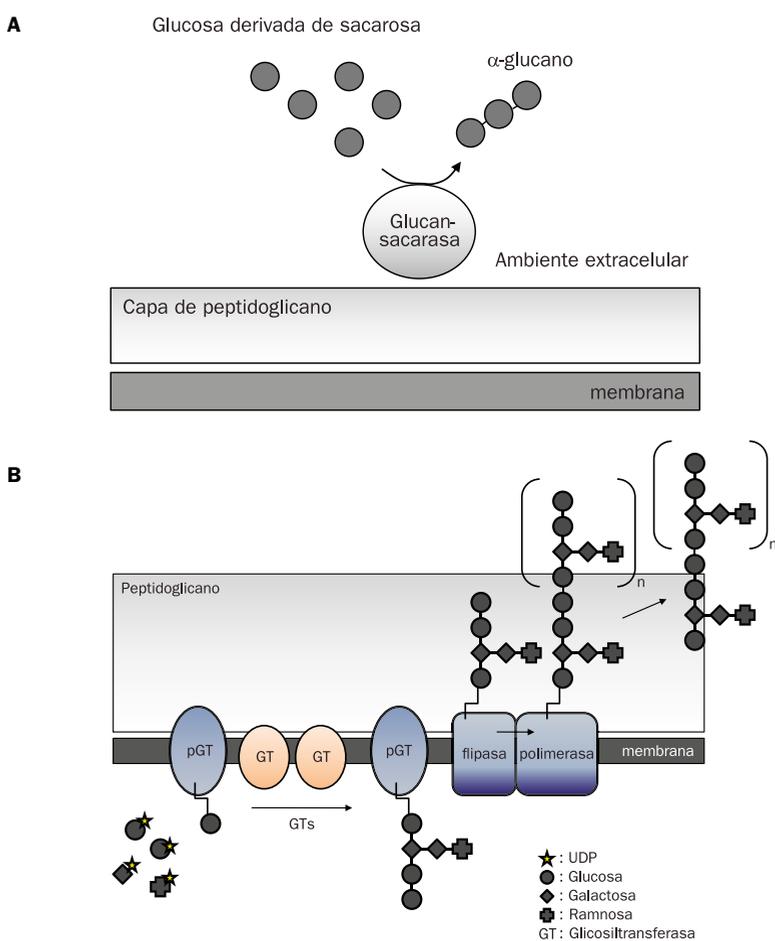


Figura 2. Modelos de biosíntesis de EPS propuestos para homopolisacáridos (HoPS, A) y heteropolisacáridos (HePS, B).

Optimización de la producción de EPS

El rendimiento total de EPS sintetizados por una BAL depende fuertemente de la composición del medio de cultivo (fuentes de C y N) y de las condiciones de desarrollo de la cepa, como temperatura, pH, presencia de oxígeno y tiempo de incubación (Degeest y col., 2001). De este modo, ajustando las condiciones de desarrollo se puede maximizar la producción de EPS, dependiendo de cada cepa y compuesto involucrado (Ale y col., 2016b). Por ejemplo, las modificaciones de la temperatura de desarrollo impactan de un modo particular, habiéndose demostrado que temperaturas subóptimas en las BAL benefician la síntesis de HOPS ya que favorecen la actividad de las glucansucrasas (De Vuyst y Degeest, 1999).

La cepa *L. fermentum* Lf2 rutinariamente se desarrolla en el medio semi-definido SDM (Kimmel y Roberts, 1998), cuyas fuentes nitrogenadas son base nitrogenada de levadura, Bacto Casitona y citrato de amonio, y la fuente de C es glucosa. Este medio es similar al MRS normalmente utilizado para lactobacilos, pero en el cual se reemplazan el extracto de levadura, el extracto de carne y la peptona proteosa, debido a que interfieren significativamente en la recuperación de la fracción de EPS. El método de extracción de EPS más comúnmente utilizado se lleva a cabo por precipitación alcohólica a partir del sobrenadante de un cultivo desarrollado, previa eliminación de las células por centrifugación. Luego el extracto de EPS se resuspende en agua bidestilada y se dializa por tres días, para finalmente liofilizarlo y pesarlo, expresando el rendimiento en g de EPS crudo/L de caldo de cultivo (Ale y col., 2016b). Recientemente, se llevó a cabo la optimización de la síntesis de los EPS de *L. fermentum* Lf2 mediante estrategias de diseño experimental de superficie respuesta (diseño D-Optimal y Central Compuesto) en un fermentador de 2 L (Sartorius Biostat A plus®, Goettingen, Germany). El rango de pH evaluado fue 5 a 7, y se variaron los porcentajes de las 3 fuentes nitrogenadas manteniendo constante el valor total. Se evaluaron también dos fuentes de C, glucosa y sacarosa, y el porcentaje óptimo de aquella que arrojó mejores rendimientos (sacarosa en este caso) (Ale y col., 2019a). Las condiciones óptimas encontradas lograron duplicar la producción obtenida en condiciones no optimizadas, alcanzando 2 g/L. El extracto obtenido bajo condiciones optimizadas (utilizando sacarosa como fuente de C) se caracterizó químicamente, observando que la síntesis del heteropolisacárido se vio favorecida (proporción 1:0,5), mientras que el extracto obtenido en condiciones standard presenta una proporción de 1:1.76 de HOPS y β -glucano, respectivamente (Ale y col., 2019a).

Propiedades tecnológicas de los EPS en matrices lácteas

Los EPS son moléculas muy atractivas por su potencial para ser utilizados como ingredientes en alimentos, ya que son componentes naturales y seguros cuando provienen de un microorganismo reconocido como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), como ocurre con las BAL. Desde el punto de vista tecnológico son capaces de modificar la reología de los alimentos, reduciendo en algunos casos la sinéresis e incrementando la firmeza (Ale y col., 2016b; Dabour y col., 2006).

Si bien los rendimientos son bajos cuando se los compara con EPS producidos por otras bacterias, los EPS de BAL, de acuerdo con sus características químicas y estructurales, son adecuados como texturizantes aun cuando se encuentran presentes en bajas concentraciones. Asimismo, su producción *in situ* es una opción interesante si se aplican cultivos productores de EPS como adjuntos o iniciadores de la fermentación (Ryan y col., 2015).

Para estudiar el impacto de los EPS producidos por *L. fermentum* 1f2 (agregado como aditivo) desde el punto de vista tecnológico, el extracto crudo se adicionó a dos matrices diferentes: yogur y queso Cheddar. En los yogures, el extracto de EPS adicionado otorgó consistencia y dureza (en concentraciones de 300 y 600 mg/L), aumentando la pseudoplasticidad, con un leve efecto positivo sobre la sinéresis y la organolepsis, indicando una suave interacción de la estructura polisacáridica y los componentes de la matriz láctea (micelas de caseína, principalmente) (Ale y col., 2016b). Esta leve interacción probablemente se encuentre asociada a la ausencia de cargas en los EPS identificados en el extracto ya que aquellas moléculas con carga neta negativa serían capaces de interactuar más fuertemente con las caseínas cargadas positivamente del yogur (Duboc y Mollet, 2001). En el caso de los quesos Cheddar, el extracto adicionado en un nivel de 1 g/L en la leche de elaboración no tuvo impacto significativo en la textura del producto final pero no impactó negativamente sobre ningún parámetro tecnológico o sensorial, lo que permitiría su uso como aditivo funcional en estos alimentos (Ale, 2018) teniendo en cuenta los beneficios para la salud que puede aportar su agregado (Ale y col., 2016a).

Propiedades funcionales de los EPS

La presencia de *Lactobacillus* como integrante de la microbiota intestinal se asocia con el estado saludable del hospedador y, en general, su baja concentración se relaciona con problemas de salud específicos como el colon irrita-

ble o IBS (por sus siglas en inglés, *Irritable Bowel Syndrome*) (Liu y col., 2017). Si bien este género representa solo el 0,01% de las bacterias fecales totales (Walter, 2008), juega un rol muy importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, lo que justifica el amplio uso de cepas de esta especie como suplementos probióticos para contribuir al balance de la microbiota intestinal (Staudacher y col., 2017). Los probióticos son «microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio al hospedador» (Hill y col., 2014). Algunas cepas probióticas con propiedades demostradas se han incluido exitosamente en diversos alimentos funcionales pero, si bien los mecanismos por los cuales ejercen su acción se desconocen en la mayoría de los casos, para cepas productoras de EPS se han vinculado estos efectos beneficiosos a la actividad biológica de estos polímeros.

En efecto, existen numerosos trabajos científicos que vinculan los EPS producidos por cepas de *Lactobacillus* con beneficios para la salud humana: modulación del sistema inmune, actividades antioxidante, antitumoral, antiulcerosa y antiolesterolémica (Ruas-Madiedo y col., 2002). Un beneficio indirecto es la generación de SCFA, provenientes de su degradación en el intestino por parte de la microflora del colon, poniendo en evidencia el potencial prebiótico de estas moléculas. Sin embargo, así como no todos los EPS son capaces de mejorar las propiedades tecnológicas de un alimento, no todos son capaces de promover beneficios para la salud, siendo la estructura química y el peso molecular características fundamentales para definir su funcionalidad (Hidalgo Cantabrana y col., 2012).

Como parte de la caracterización del extracto de EPS de *L. fermentum* 1f2, se estudió el rol funcional del extracto crudo obtenido en condiciones no optimizadas en matrices lácteas (leche y yogur) mediante tres modelos *in vivo* (ratones BALB/c): estudio de su capacidad de protección frente a una infección por *Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium, estudio de su rol inmunomodulador a nivel intestinal y estudio de su rol probiótico/simbiótico sobre la microbiota intestinal, en forma individual y combinando el extracto de EPS con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, una cepa probiótica aislada de leche materna (Zacarías y col., 2011; Burns y col., 2017). A partir de estos ensayos, se puso en evidencia la capacidad de proteger a los animales frente a una infección por *Salmonella* cuando se lo administró en leche. Asimismo, se observó un rol inmunomodulador suave, mediado por IGA y por IL-6 (aumentaron los niveles de IGA en fluido intestinal, y disminuyó la citoquina proinflamatoria IL-6 en intestino delgado) (Ale y col., 2016a), que se corresponde con la respuesta generalmente observada para polímeros de relativamente bajo peso molecular ($< 10^6$ Da), como el extracto de EPS estudiado (Caggianello y col., 2016). A partir del estudio de

su rol prebiótico/simbiótico cuando se lo administró como ingrediente alimentario en yogures, se observó un aumento en la producción de ciertos SCFA (ácidos acético y butírico) y en los niveles del grupo *Clostridium coccoides* (productor de estos ácidos) a lo largo del tratamiento por parte del extracto de EPS individualmente, así como un efecto bifidogénico cuando se lo combinó con la bifidobacteria (Ale y col., 2019b).

En un estudio reciente (Vitlic y col., 2019), se analizó el efecto inmunomodulador del β -glucano de mayor peso molecular (que forma parte del extracto completo) sobre células mononucleares de sangre periférica. La exposición de estas células a una solución acuosa de EPS por 24 h aumentó la proliferación y la producción de TNF- α (citoquina proinflamatoria) en comparación con los controles. Sin embargo, cuando las células tratadas (de las que el homopolisacárido fue removido) han sido expuestas posteriormente a LPS bacteriano (lipopolisacárido), se observaron niveles muy bajos de TNF- α . Esto indicaría que el polisacárido de mayor peso molecular brindaría inmunotolerancia a las células, siendo esta habilidad importante para el desarrollo de terapias para el tratamiento de enfermedades como colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (asociadas con la liberación excesiva de mediadores inflamatorios).

Es importante destacar que resulta fundamental demostrar la efectividad del beneficio asociado a la administración de EPS o su cepa productora mediante ensayos *in vivo* y, de ser posible, mediante ensayos clínicos en humanos, ya que la mayoría de los trabajos referentes a propiedades funcionales de EPS se basan en estudios *in vitro* y, por lo tanto, no son válidos para aproximar a una respuesta real para el consumidor.

Conclusiones

En los últimos años se incrementó notablemente el número de cepas de *Lactobacillus* productoras de EPS, evidenciando una gran diversidad entre los polisacáridos que sintetizan. La caracterización integral de las moléculas de polisacáridos (estructura, peso molecular, presencia de residuos cargados, tipo de enlace, etc.) es esencial cuando se pretende aplicar EPS (como ingredientes) o una cepa productora de EPS en una matriz alimentaria. Esta afirmación tiene su base en los estudios más recientes que vinculan, de una forma muy estrecha, estas características con las propiedades reológicas y funcionales que son capaces de impartir al alimento. De este modo, conociendo dichas propiedades se pueden inferir las propiedades tecnofuncionales que tendrá el producto final.

En conclusión, el uso de EPS producidos por *Lactobacillus* ofrece una opción prometedora para su aplicación como ingrediente natural en el desarrollo de nuevos alimentos tecnofuncionales. Un ejemplo interesante de estudio es el extracto de EPS de *L. fermentum* Lf2, que fue caracterizado desde diversos puntos de vista y para el cual se pudo relacionar su comportamiento en diversas matrices lácteas con las características intrínsecas de las moléculas presentes en el extracto crudo. En resumen, fue capaz de aportar, como ingrediente alimentario, un doble rol tecnológico y funcional, mejorando la textura de la matriz alimentaria donde se aplica y ejerciendo beneficios a la salud del consumidor (protección frente a una infección por *Salmonella*, rol inmunomodulador y rol prebiótico/simbiótico). Finalmente, se debe remarcar la importancia de esta cepa que, aislada a partir de un evento negativo de la industria láctea, ha evidenciado propiedades interesantes vinculadas con la producción de una combinación de HOPS y HEPS, característica inédita, al menos, para cepas de *L. fermentum* y con potencial aplicación industrial.

Referencias bibliográficas

- Ale, E.C. (2018).** Potencial funcional (*in vitro* e *in vivo*) y tecnológico de exopolisacáridos (EPS) producidos por bacterias lácticas. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional del Litoral.
- Ale, E.C.; Batistela, V.A.; Correa Oliver, G.; Ferrado, J.B.; Sadiq, S.; Ahmhed, H.I.; Reinheimer, J.A.; Vera-Candiotti, L.; Laws, A.P. y Binetti, A.G. (2019a).** Statistical optimization of the exopolysaccharide extract produced by *Lactobacillus fermentum* Lf2, a potential functional food ingredient, and the impact on its chemical composition. *International Journal of Dairy Technology*, 70, 1–12.
- Ale, E.C.; Bourin, M.; Peralta, G.H.; Burns, P.G., Ávila, O.B.; Contini, L.; Reinheimer, J.A. y Binetti, A.G. (2019b).** Functional properties of exopolysaccharide (EPS) extract from *Lactobacillus fermentum* Lf2 and its impact when combined with *Bifidobacterium animalis* INL1 in yoghurt. *International Dairy Journal*, 96, 114–125.
- Ale, E.C.; Perezlindo, M.J.; Burns, P.; Tabacman, E.; Reinheimer, J.A. y Binetti, A.G. (2016a).** Exopolysaccharide from *Lactobacillus fermentum* Lf2 and its functional characterization as a yogurt additive. *Journal of Dairy Research*, 83(04), 487–492.
- Ale, E.C.; Perezlindo, M.J.; Pavón, Y.; Peralta, G.H.; Costa, S.; Sabbag, N.; Bergamini, C.; Reinheimer, J.A y Binetti, A.G. (2016b).** Technological, rheological and sensory characterizations of a yogurt containing an exopolysaccharide extract from *Lactobacillus fermentum* Lf2, a new food additive. *Food Research International*, 90, 259–267.
- Amatayakul, T.; Halmos, A.L.; Sherkat, F. y Shah, N.P. (2006a).** Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, 16(1), 40–51.
- Amatayakul, T.; Sherkat, F. y Shah, N.P. (2006b).** Syneresis in set yogurt as affected by EPS starter cultures and levels of solids. *International Journal of Dairy Technology*, 59(3), 216–221.
- Buldo, P.; Benfeldt, C.; Folkenberg, D.M.; Jensen, H.B.; Amigo, J.M.; Sieuwerts, S.; Thygesen, K.; van den Berg, F. y Ipsen, R. (2016).** The role of exopolysaccharide-producing cultures and whey protein ingredients in yoghurt. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 189–198.
- Burns, P.; Alard, J.; Hrd, J.; Boutillier, D.; Páez, R.; Reinheimer, J.A.; Pot, B.; Vinderola, G. y Grangette, C. (2017).** Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk-derived *Bifidobacterium lactis* strain on acute and chronic colitis in mice. *Scientific Reports*, 7, 43211.
- Caggianiello, G.; Kleerebezem, M. y Spano, G. (2016).** Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 3877–3886.
- Castro-Bravo, N.; Wells, J.M.; Margolles, A. y Ruas-Madiedo, P. (2018).** Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2426.
- Cerning, J. (1995).** Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 75(1), 463–472.
- Dabour, N.; Kheadr, E.; Benhamou, N.; Fliss, I. y LaPointe, G. (2006).** Improvement of texture and structure of reduced-fat Cheddar cheese by exopolysaccharide-producing lactococci. *Journal of Dairy Science*, 89(1), 95–110.
- De Vuyst, L. y De Vin, F. (2007).** Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. In *Comprehensive Glycoscience*, 477–519.
- De Vuyst, L. y Degeest, B. (1999).** Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Technological bottlenecks and practical solutions. *Macromolecular Symposia*, 140(1), 31–41.
- Degeest, B.; Vaningelgem, F. y De Vuyst, L. (2001).** Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 747–757.
- Duboc, P. y Mollet, B. (2001).** Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11(9), 759–768.
- Fraunhofer, M.E.; Geissler, A.J.; Wefers, D.; Bunzel, M.; Jakob, F. y Vogel, R.F. (2018).** Characterization of β -glucan formation by *Lactobacillus brevis* TMW 1.2112 isolated from slimy spoiled beer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 874–881.

- Gentès, M.-C.; St-Gelais, D. y Turgeon, S. L. (2013).** Exopolysaccharide–milk protein interactions in a dairy model system simulating yoghurt conditions. *Dairy Science & Technology*, 93(3), 255–271.
- Harris, H.M.B.; Ale, E.C.; Reinheimer, J.A.; Binetti, A.G y O'Toole, P. (2018).** Draft genome sequence of *Lactobacillus fermentum* Lf2, an exopolysaccharide-producing strain isolated from Argentine cheese. *Microbiology Resource Announcements*, 7(18), e01072–18.
- Hassan, A.N.; Ipsen, R.; Janzen, T. y Qvist, K.B. (2003).** Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1632–1638.
- Hidalgo-Cantabrana, C.; López, P.; Gueimonde, M.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Suárez, A.; Margolles, A. y Ruas-Madiedo, P. (2012).** Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 227–237.
- Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; Calder, P. y 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 and Hepatology*, 11(8), 506–514.
- Huazano-García, A. y López, M.G. (2013).** Metabolism of short chain fatty acids in the colon and faeces of mice after a supplementation of diets with agave fructans. *Lipid Metabolism*, 163–182.
- Kimmel, S.A. y Roberts, R.F. (1998).** Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1–2), 87–92.
- Kullisaar, T.; Songisepp, E.; Mikelsaar, M.; Zilmer, K.; Vihalemm, T. y Zilmer, M. (2003).** Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *The British Journal of Nutrition*, 90(2), 449–56.
- Lebeer, S.; Claes, I.J.J.; Verhoeven, T.L.A.; Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S.C.J. (2011).** Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine. *Microbial Biotechnology*, 4(3), 368–374.
- Lebeer, S.; Verhoeven, T.L.A.; Francius, G.; Schoofs, G.; Lambrichts, I.; Dufrière, Y.; Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S.C.J. (2009).** Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3554–3563.
- Lee, I.-C.; Caggianiello, G.; van Swam, I.I.; Taverne, N.; Meijerink, M.; Bron, P.A.; Spano, G. y Kleerebezem, M. (2016).** Strain-Specific features of extracellular polysaccharides and their impact on *Lactobacillus plantarum*-host interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3959–3970.
- Lehri, B.; Seddon, A.M. y Karlyshev, A.V. (2017).** Potential probiotic-associated traits revealed from completed high quality genome sequence of *Lactobacillus fermentum* 3872. *Standards in Genomic Sciences*, 12(1), 19.
- Liu, H.-N.; Wu, H.; Chen, Y.-Z.; Chen, Y.-J.; Shen, X.-Z. y Liu, T.-T. (2017).** Altered molecular signature of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome patients compared with healthy controls: A systematic review and meta-analysis. *Digestive and Liver Disease*, 49(4), 331–337.
- Olivares, M.; Díaz-Ropero, M.P.; Sierra, S.; Lara-Villoslada, F.; Fonollá, J.; Navas, M.; Rodríguez, J.M. y Xaus, J. (2007).** Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition*, 23(3), 254–260.
- Olivares, M.; Díaz-Ropero, M.P.; Martín, R.; Rodríguez, J.M. y Xaus J. (2006).** Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), 72–79.
- Peran, L.; Camuesco, D.; Comalada, M.; Nieto, A.; Concha, A.; Adrio, J.L.; Olivares, M.; Xaus, J.; Zarzuelo, A. y Galvez, J. (2006).** *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *International Journal of Colorectal Disease*, 21(8), 737–46.

- Peran, L.; Sierra, S.; Comalada, M.; Lara-Villoslada, F.; Bailón, E.; Nieto, A.; Concha, A.; Olivares, M.; Zarzuelo, A.; Xaus, J. y Gálvez J. (2007).** A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *British Journal of Nutrition*, 97(1), 96–103.
- Pérez-Cano, F.J.; Dong, H. y Yaqoob, P. (2010).** *In vitro* immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology*, 215(12), 996–1004.
- Reid, G. y Burton, J. (2002).** Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, 4(3), 319–24.
- Reid, G.; Charbonneau, D.; Erb, J.; Kochanowski, B.; Beuerman, D.; Poehner, R. y Bruce, A.W. (2003).** Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35(2), 131–134.
- Ruas-Madiedo, P.; Hugenholtz, J. y Zoon, P. (2002).** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2/3), 163–171.
- Ryan, P.M.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Caplice, N.M. y Stanton, C. (2015).** Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food & Function*, 6(3), 679–693.
- Salazar, N.; López, P.; Garrido, P.; Moran, J.; Cabello, E.; Gueimonde, M.; Suárez, A.; González, C.; De Los Reyes-Gavilán, C.G. y Ruas-Madiedo, P. (2014).** Immune modulating capability of two exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains in a wistar rat model. *BioMed Research International*, 2014, ID 106290.
- Salveti, E.; Harris, H.M.B.; Felis, G.E. y O'Toole, P.W. (2018).** Comparative genomics of the genus *Lactobacillus* reveals robust phylogroups that provide the basis for reclassification. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(17), e00993–18.
- Staudacher, H.M.; Lomer, M.C.E.; Farquharson, F.M.; Louis, P.; Fava, F.; Franciosi, E.; Scholz, M.; Tuohy, K.M.; Lindsay, J.O.; Irving, P.M. y Whelan, K. (2017).** A diet low in FODMAPs reduces symptoms in patients with irritable bowel syndrome and a probiotic restores *Bifidobacterium* species: A Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology*, 153(4), 936–947.
- Truusalu, K.; Naaber, P.; Kullisaar, T.; Tamm, H.; Mikelsaar, R.; Zilmer, K.; Rehema, A.; Zilmer, M. y Mikelsaar, M. (2004).** The influence of antibacterial and antioxidative probiotic lactobacilli on gut mucosa in a mouse model of *Salmonella* infection. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 16(4), 180–187.
- Tuinier, R.; van Casteren, W.H.M.; Looijesteijn, P.J.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. y Zoon, P. (2001).** Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis*. *Biopolymers*, 59(3), 160–166.
- Vitlic, A.; Sadiq, S.; Ahmed, H.I.; Ale, E.C.; Binetti, A.G.; Collett, A.; Humphreys, P. y Laws, A. (2018).** Evidence for the modulation of the immune response in peripheral blood mononuclear cells after stimulation with a high molecular weight β -glucan isolated from *Lactobacillus fermentum* Lf2. *BioRxiv*.
- Walter, J. (2008).** Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 4985–4996.
- Werning, M.L.; Notararigo, S.; Náchter, M.; de Palencia, P.F.; Aznar, R. y López, P. (2013).** Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Food Additive*, 5, 83–114.
- Zacarías, M.F.; Binetti, A.; Laco, M.; Reinheimer, J. y Vinderola, G. (2011).** Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. *International Dairy Journal*, 21(8), 548–555.
- Zannini, E.; Waters, D.M.; Coffey, A. y Arendt, E.K. (2016).** Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1121–1135.

7. Fosfatos como antimicrobianos y antivirales en la industria láctea

Uso como antifúngico en quesos de mediana y larga maduración

Viviana Suárez, Jorge Reinheimer y Carlos Meinardi

Los polifosfatos son compuestos ampliamente utilizados como aditivos en la industria de alimentos (principalmente carnes y lácteos) para mejorar algunas propiedades funcionales de los mismos, proteger el color y sabor y aumentar el rendimiento como consecuencia de su capacidad de retener agua y estabilizar emulsiones. Son compuestos reconocidos como seguros (Generalized Recognized as Safe, GRAS) y si bien algunas actividades antimicrobianas han sido reportadas, los fosfatos no se han utilizado hasta el momento con el fin único de inhibir microorganismos.

Usos de fosfatos como aditivos en la industria de alimentos

1) *Acomplejantes de iones metálicos*: los fosfatos son capaces de actuar como intercambiadores de iones y, de este modo, formar complejos solubles con iones polivalentes, interfiriendo con las operaciones de procesamiento de alimentos. Una de las principales ventajas en el uso de fosfatos para acomplejar iones importantes nutricionalmente (calcio, magnesio, hierro) es que estos

iones pueden aún ser absorbidos a través de las paredes intestinales y pueden ser utilizados por el organismo. Los tratamientos de agua usados en el procesamiento de alimentos son una importante aplicación de la capacidad metal-complejo de los fosfatos, dado que los constituyentes minerales a menudo presentes en las aguas naturales pueden tener efectos adversos en los mismos.

Otras funciones de los fosfatos en agua de lavado usada en la industria láctea es la prevención de los depósitos de «piedra de leche» en equipos de uso diario, reduciendo la corrosión y costra en equipos de procesamiento y calentamiento, y la estabilización del hierro disuelto para prevenir la formación de «agua roja».

2) *Estabilizadores del pH (capacidad buffer)*: estos compuestos pueden ser usados para mantener el pH óptimo requerido durante el procesamiento y estabilización de un alimento.

3) *Dispersores de los constituyentes de alimentos*: tienen la capacidad de promover la dispersión y peptización de constituyentes de alimentos relativamente insolubles, tales como las proteínas en leche concentrada y pasteurizada, y en quesos procesados.

4) *Emulsificantes*: estos compuestos poseen la capacidad de estabilizar emulsiones.

5) *Suplementadores de minerales*: fosfatos de calcio, hierro, sodio y potasio son usados para mejorar la capacidad nutricional de algunos alimentos (productos de cereales, harinas, etc.).

6) *Preservadores de alimentos*: los fosfatos, y especialmente los polifosfatos, pueden ser usados para prevenir o retardar la oxidación de grasas insaturadas en sistemas de alimentos húmedos y para inhibir el crecimiento de algunos de los microorganismos involucrados en el deterioro de los alimentos. Generalmente estas funciones se deben a la habilidad de los fosfatos para acomplejar iones metálicos esenciales para la oxidación de las grasas o el deterioro por microorganismos.

Fosfatos como inhibidores del desarrollo de grupos microbianos de interés en alimentos

Como se presentará en esta revisión, la capacidad antimicrobiana de los fosfatos ha sido documentada en numerosas publicaciones científicas. No obstante, según los estudios existentes hasta el momento, estos compuestos no han sido clasificados o aprobados para su uso *específico* como conservantes, agentes microbianos u otra denominación similar relacionada con esta propiedad.

Fosfatos como inhibidores del crecimiento bacteriano

La capacidad inhibitoria de los fosfatos sobre distintos géneros bacterianos se ha relacionado con la capacidad de los mismos de acomplejar cationes divalentes (Jen y Shelef, 1986; Knabel y col., 1991; Lee y col., 1994a, b, c), los cuales resultan esenciales en el mantenimiento de la estructura y desarrollo celular. La mayoría de los estudios sobre el tema coinciden en afirmar que las bacterias Gram positivas son más afectadas en su crecimiento ante la presencia de estos compuestos que las Gram negativas (Molins y col., 1984; Shelef y Seiter, 1993; Rajkowski y col., 1994; Loessner y col., 1997; Suárez y col., 2007a). No obstante, se ha reportado que el Fosfato Trisódico (tsp) en particular demostró tener un importante efecto antimicrobiano sobre bacterias Gram negativas, las cuales son contaminantes naturales de carne de ave (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Pseudomonas* y *Listeria*, entre otras) (Del Río y col., 2005; Kanellos y Burriel, 2005; Mehryar y col., 2005). Por otra parte, Suárez y col. (2007a) demostraron que los polifosfatos A y B (formados por más de 15 unidades fosfato) resultaron más inhibidores de microorganismos en general que los fosfatos de cadena corta o simple, y que ese efecto podría estar relacionado a la mayor capacidad de secuestrar cationes de los mismos (Tabla 1).

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los fosfatos usados en el estudio (Suárez y col., 2007a)

Fosfatos	pH de Agar (y Caldo) Plate Count adicionado (% p/v) de fosfatos					Capacidad secuestrante ^a (g Ca/100g fosfato)	
	0,1	0,3	0,5	1,0	1,5	pH=7,0	pH ^b natural
A	6,95	6,91	6,87	6,82	6,75	15,0	15,0
B	6,92	6,88	6,84	6,79	6,72	15,0	15,0
TAS	7,89	8,05	8,15	8,39	8,44	12,0	13,0
PAS	5,85	5,70	5,55	5,17	5,04	3,0	np
TRI	8,04	8,13	8,23	8,47	8,55	12,0	13,0
N	7,92	8,41	8,53	8,76	8,80	5,0	8,0

a Valores para 1,2% de fosfato (datos suministrados por el fabricante). **b** sin ajuste de pH. **np** no provisto. **A y B** polifosfatos (15 a 20 unidades de fosfato); **TAS** tripolifosfato de sodio – alta solubilidad. **PAS** pirofosfato ácido de sodio; **TRI** tripolifosfato de sodio; **N** pirofosfato neutro de sodio

Se ha demostrado que el pH del medio tiene gran influencia en la capacidad inhibitoria de los fosfatos. Cuando los ensayos inhibitorios se llevan a cabo a pH ácido, la capacidad inhibitoria de los fosfatos se ve disminuida y, por el contrario, cuando el pH alcanza valores alcalinos dicha propiedad se incrementa. El efecto del pH fue estudiado inicialmente por Jen y Sheref (1986) sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* 196E, usando 0,5 % (p/v) de Tripolifosfato de Sodio (STPP) y Hexametáfosfato de Sodio (SHMP), observando un aumento de la inhibición de estos microorganismos con dichos fosfatos a valores de pH por sobre la neutralidad (7,4 y 9,0). Similares resultados fueron observados por Suárez y col. (2007a) en la acción de Tripolifosfato de Sodio—alta solubilidad (TAS), Pirofosfato Ácido de Sodio (PAS), Tripolifosfato de Sodio (TRI) y Pirofosfato Neutro de Sodio (N) sobre cepas de distintas especies del género *Bacillus*. Este efecto se puede relacionar con el aumento de la capacidad secuestrante de cationes divalentes de estos compuestos a pH alcalino, como se muestra en la Tabla 1. A valores de pH alcalinos, los fosfatos estarían más disociados y, como consecuencia, tomarían más cationes del medio lo que disminuiría la disponibilidad de los mismos para el desarrollo celular.

Hasta el momento, ningún modelo ha explicado satisfactoriamente las causas de la mayor susceptibilidad de las bacterias Gram positivas a la acción de los fosfatos. La pared celular de la mayoría de las bacterias Gram positivas consiste en una fina capa de peptidoglicanos y usualmente grandes cantidades de ácidos teicoicos y/o teicurónicos, los cuales sirven de principales sitios de unión de metales divalentes (Ca, Mg, Mn y Fe). La principal función de estos polímeros aniónicos en la pared celular es mantener una alta concentración de cationes divalentes en la región de la membrana, los cuales proveen un buen medio ambiente para los sistemas de membrana catión—dependientes. Debido a que los fosfatos poseen afinidades más elevadas que los peptidoglicanos y los ácidos teicoicos y teicurónicos por los cationes metálicos, la remoción de los cationes de la pared celular podría ser la causa de la inhibición del crecimiento microbiano en este tipo de bacterias. En este sentido, el estudio de Maier y col. (1999) demostró que el polifosfato JOHA® HBS, utilizado en una concentración del 0,1 % (p/v), tuvo un efecto lítico sobre células de *Bacillus cereus* en crecimiento exponencial (descenso de 2 a 3 órdenes log), mientras que el crecimiento de las células sobrevivientes fue inhibido bacteriostáticamente. Las células en fase estacionaria no fueron afectadas por el agregado del polifosfato. Concentraciones subletales de polifosfato (0,05 %, p/v) provocaron la inhibición de la formación de septos (donde participa una proteína denominada FtsZ) durante la replicación celular, por lo que las células obtenidas mostraron una morfología diferente, en forma de lar-

gos filamentos. Es importante aclarar que el agregado de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) revirtió el efecto inhibitor del polifosfato. Este hecho relacionaría directamente la inhibición con el secuestro de cationes indispensables para la replicación celular. Estos autores también informaron sobre el efecto del agregado de polifosfato sobre la germinación de las esporas de *B. cereus*. Con concentraciones bajas de polifosfato (0,05%, p/v) se logró impedir la germinación y el crecimiento de las esporas. Este doble efecto (acción sobre las esporas y las células vegetativas) hace que este polifosfato de cadena larga sea muy eficiente en su acción inhibitoria sobre distintas especies de *Bacillus*. Similares valores de CIM (Concentración Inhibitoria Mínima del desarrollo) fueron reportados por Suárez y col. (2007a) cuando se estudiaron cepas de *Bacillus* de diversas especies con los polifosfatos A y B (mezclas de polifosfatos de cadena entre 15–20 unidades). Con excepción de *Bacillus macerans*, el resto de las especies fueron inhibidas con una concentración de 0,1% (p/v) de estos compuestos.

Fosfatos como inhibidores del crecimiento de mohos

Los mohos son contaminantes indeseables en la industria alimenticia, afectando materias primas y alimentos procesados (Northolt y col., 1995; Pitt y Hocking, 1997). Es realmente escasa la información existente acerca del efecto de los fosfatos sobre el crecimiento de mohos, aunque hay evidencia que los fosfatos pueden interferir con ciertos estados de su metabolismo, tales como diferenciación celular, esporulación, y producción de toxinas y antibióticos (Molins, 1991).

Post y col. (1968) ensayaron la capacidad de inhibición de SHMP, STPP, Tetrafosfato de Sodio (STP) y Pirofosfato de Tetrasodio (TSPP), frente a *Penicillium expansum*, *Rhizopus nigricans* y *Botrytis sp.*, en concentraciones de 1,0; 5,0 y 10,0% (p/v). Todos los compuestos fueron inefectivos a 1,0% (p/v), mientras al 5,0% (p/v) se observó inhibición, siendo el más efectivo STP, seguido de SHMP y STPP, y el menos inhibidor TSPP. Lebron y col. (1989) informaron que el SHMP resultó más inhibidor que el TSPP en el desarrollo de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Al 1,0% (p/v), hubo crecimiento visible después de 3 días con TSPP y en 6 días con SHMP, mientras que al 2,0% (p/v), la germinación de esporos fue inhibida hasta el día 9 por ambos fosfatos. En este trabajo no se reportaron los valores de pH del medio en el cual se realizaron las experiencias. Maier y col. (1999) informaron valores de CIM de 0,5% (p/v) del polifosfato JOHA® HBS, para dos cepas de *Aspergillus flavus* y *Mucor sp.*

Un trabajo más amplio fue realizado por Suárez y col. (2005), en el cual se estudió el efecto de distintos fosfatos (polifosfatos A y B, TAS, PAS TRI y N) en el desarrollo de distintas especies fúngicas comúnmente vinculadas al deterioro de alimentos (lácteos, carnes, carnes procesadas, alimentos ácidos termoprocados, frutas, cereales y oleaginosas). Los resultados reportados en este trabajo confirman que la actividad antifúngica de los fosfatos a pH neutro está directamente relacionada con la longitud de cadena. Los fosfatos que demostraron tener mejor capacidad de inhibición a pH neutro fueron los de cadena larga (A y B), ya que inhibieron el 88,0 % de las cepas estudiadas a una concentración de 1,0 % (p/v) (Tabla 2). También se demostró que el fosfato que presentó valores de pH ácido (PAS) disminuyó la capacidad inhibitoria demostrada a pH 7,0, pasando de 64,7 % al 5,9 % a una concentración de 1,5 % (p/v). Por el contrario, las soluciones de fosfatos que presentaron valores de pH alcalinos (TAS, TRI y N) incrementaron notablemente su actividad inhibitoria respecto a la presentada a pH 7, con valores que variaron entre 53,0–70,6 % y 88,0–100 %, respectivamente. Como en el caso de bacterias, la mayor inhibición estaría relacionada con la capacidad de secuestrar cationes divalentes de los fosfatos y, a su vez, que a pH alcalino esa capacidad se vería incrementada (Tabla 1). Las paredes celulares fúngicas poseen polímeros aniónicos tales como quitina, quitosán y glicoproteínas, los cuales están involucrados en la recepción de cationes divalentes (Knabel y col., 1991). Por lo tanto, la inhibición de mohos por fosfatos podría también atribuirse a la remoción de los cationes metálicos esenciales desde estos sitios localizados en la pared celular.

Fosfatos como inhibidores del crecimiento de levaduras

Las levaduras se encuentran normalmente presentes en alimentos crudos y procesados y son una de las principales causas de deterioro de productos con una concentración alta de azúcares, bajo pH y baja actividad acuosa. Dentro de esta gama de alimentos podemos mencionar productos lácteos, frutas frescas, jugos de fruta y productos con frutas, miel, jarabes de azúcar, melasas y vegetales fermentados (Ray, 2001). Los géneros de levaduras como *Candida*, *Geotrichum*, *Trichosporum*, *Brettanomyces* y *Cryptococcus* están frecuentemente asociadas al deterioro de estos alimentos (ICMSF).

Es realmente muy escasa la información de la acción inhibitoria de los fosfatos sobre levaduras. Suárez y col. (2007c) estudiaron la acción de distintos fosfatos (polifosfatos A y B, TAS, PAS TRI y N) sobre distintos géneros de levaduras de origen alimentario (*Cándida*, *Brettanomyces*, *Geotrichum*,

Tabla 2. Actividad inhibitoria de fosfatos sobre mohos aislados de industrias lácteas (pH neutro) (Suárez y col., 2005)

Género/especie	Fosfato (% p/v)																		
	A						B						N						
	0,1	0,3	0,5	1,0	1,0	1,5	0,1	0,3	0,5	1,0	1,0	1,5	0,1	0,3	0,5	1,0	1,5	1,5	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Fusarium proliferatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Asbidia corymbifera</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Fusarium sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Cladosporium sphaesperum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Penicillium roquefortii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Penicillium commune</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Trichoderma viride</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Epicoccum nigrum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Rhizopus stolonifer</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Aspergillus candidus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Phoma glomerata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Byssochlamys nivea</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Penicillium glabrum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
% de especies inhibidas	17,6	47,0	59,0	76,4	76,4	82,3	88,2	17,6	52,9	70,6	11,8	41,2	64,7	23,5	47,0	64,7	5,9	29,4	53,0

+ Crecimiento (ICR de 0,8 a 1,0); +/-: crecimiento débil (ICR de 0,2 a 0,8); -: ausencia de crecimiento (ICR < 0,2)

* CIM Concentración Inhibitoria Mínima

ICR Índice de Crecimiento Relativo, Método Ecométrico.

Cryptococcus y *Trichosporum*). A pH neutro, los fosfatos más inhibidores del desarrollo de las levaduras estudiadas fueron aquellos con longitudes de cadena mayores a 15 unidades de fosfato (polifosfatos A y B), observándose una elevada cepa-dependencia en los resultados. Un grupo de cepas (9 sobre 20) fue inhibido con concentraciones > 1,0 % (p/v) de polifosfatos, mientras que otro grupo (6 cepas sobre 20) lo hicieron con concentraciones < 0,5 % (p/v). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Maier y col. (1999), quienes habían demostrado que algunas cepas de levaduras, pertenecientes a las especies *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, se inhibían con concentraciones de 0,3 % (p/v) del polifosfato comercial JOHA® HBS (69 ± 1 % P₂O₅). Estos resultados se podrían relacionar, como se hizo en el caso de mohos, con la mayor capacidad secuestrante de cationes divalentes de los polifosfatos (Tabla 1).

En este mismo estudio se investigó la acción inhibitoria de los polifosfatos a valores de pH ácidos, debido a que estos contaminantes se encuentran principalmente relacionados a jugos de frutas (pH entre 2,2 y 4,2; Sobrero, 2002). Los resultados indicaron que los polifosfatos A y B incrementaron su actividad inhibitoria contra las levaduras en condiciones de acidez, como se observa en la Tabla 3. En la misma se muestra que cepas de levaduras capaces de crecer en medios ácidos fueron inhibidas cuando los fosfatos A y B se adicionaron en concentraciones entre 0,5 a 1,0 % (p/v).

Tabla 3. Porcentaje de cepas de levaduras inhibidas (n = 20) a distintos pH, con y sin agregado de fosfatos (% p/v) (Suárez y col., 2007c)

pH	Sin fosfato	Fosfato A		Fosfato B	
		0,5	1,0	0,5	1,0
7,0 (control)	0	35	60	50	80
4,5	10	85	100	100	100
3,5	55	100	100	100	100
2,5	80	100	100	100	100

Estas concentraciones son similares o más bajas que aquellas usadas cuando los polifosfatos son usados como aditivos en alimentos en general (Molins, 1991).

Fosfatos como inhibidores del ciclo lítico de bacteriófagos de bacterias lácticas (BAL)

Las infecciones fágicas en la industria láctea son una de las principales causas de pérdidas económicas debido al retardo o detención del proceso fermentativo por la destrucción de las bacterias del fermento (Moineau y Lévesque, 2005). Debido a la ubicuidad de los bacteriófagos en los ambientes lácteos, y reconociendo que no es posible erradicarlos, las investigaciones se han dirigido al diseño y la implementación de estrategias prácticas que apuntan a minimizar su incidencia. Muchos esfuerzos se siguen realizando con el objeto de enfrentar este problema (Samson y Moineau, 2013; Fernández y col., 2017). Dentro de las medidas de control usadas en la industria se encuentra el uso de sanitizantes, tratamientos térmicos y químicos, rotación de cepas y uso de cepas mutantes fago-resistentes. El uso de medios inhibidores de fagos (Phage Inhibitor Media, PIM) que contienen agentes quelantes (fosfatos y citratos) en su composición pueden controlar la infección debida a bacteriófagos que requieren Ca^{2+} para completar su ciclo lítico (Whitehead y col., 1993). Teniendo en cuenta este concepto, la adición directa de polifosfatos (secuestrantes de cationes divalentes) a la leche destinada para fermentaciones lácticas constituiría una metodología simple para ayudar a las bacterias del *starter* contra el ataque de fagos Ca -dependientes.

Suárez y col. (2007b) ensayaron distintas concentraciones de fosfatos (hasta un máximo de 0,5 %, p/v) para evaluar la detención de las infecciones fágicas producidas por bacteriófagos Ca -dependientes, en cepas de *Lactococcus lactis* (2 cepas), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (1 cepa) y *Lactobacillus paracasei* (1 cepa). Los fosfatos usados fueron los polifosfatos A y B y el fosfato TAS, los cuales fueron seleccionados en base a su alta capacidad de secuestrar cationes divalentes. Los ensayos se realizaron en medio de cultivo y en leche reconstituida estéril (LDR, 10 % p/v). A estas concentraciones no se observaron efectos negativos en la estabilidad de la caseína, ya que se sabe que concentraciones de fosfatos superiores a 1,0 % (p/v) de estos compuestos en leche producen la inestabilidad fisicoquímica de la misma, provocando la completa dispersión de las micelas (Ibrahim y Daguri, 1996). En general, el agregado de tripolifosfato de sodio-alta solubilidad (TAS) a la leche en concentraciones entre 0,3 y 0,5 % (p/v), fue muy efectivo en la inhibición del ciclo lítico. Sin embargo, algunas cepas mostraron una demora en la actividad acidificante, probablemente debido al efecto buffer producido por la adición de fosfatos a la leche. Este fosfato resultó más inhibitorio que los polifosfatos A y B en todos los casos a diferentes concentraciones según el sistema

estudiado (Tabla 4). Los fagos 046 (*L. lactis*) y MLC-A (*Lact. paracasei*) fueron inhibidos en su replicación por los fosfatos A y B solamente a las máximas concentraciones ensayadas.

Tabla 4. Inhibición del ciclo lítico de fagos de BAL por el agregado de fosfatos (Suárez y col., 2007b), en medio de cultivo (Caldo Elliker para lactococos y MRS para lactobacilos)

Fago	Cepa	Control de lisis		Fosfato (% p/v)									
		Con/Ca*	Sin/Ca	A			B			TAS			
				0,1	0,3	0,5	0,1	0,3	0,5	0,1	0,3	0,5	
QF9	CI2 ^a	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-
046	13-3 ^a	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Ib3	Ib3 ^b	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
MLC-A	A ^c	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+/-	-	-

+ lisis completa (O.D.600nm < 0,2, después de 8 h); +/- lisis parcial (O.D.600nm entre 0,2 y 0,8, después de 8 h); - ausencia de lisis (O.D.600nm > 1,0, después de 8 h); ^a*L. lactis*; ^b*Lact. delbrueckii* subsp. *lactis*; ^c*Lact. paracasei*
* concentración final de Ca²⁺: 10mM

Cuando los ensayos fueron realizados en LDR los resultados obtenidos fueron algo diferentes. En leche fue necesaria una concentración de 0,5% (p/v) de fosfato TAS para inhibir las infecciones producidas por los fagos QF9 (*L. lactis*) y MLC-A (*L. paracasei*). Los fosfatos A y B no lograron inhibir el ciclo lítico de los fagos 046 y MLC-A, como si lo habían hecho en medio de cultivo. Por otra parte, en el caso del fosfato TAS y los fagos Ib3 (*Lact. delbrueckii* subsp. *lactis*) y 046 (*L. lactis*) en leche, la concentración inhibitoria se mantuvo en 0,3% (p/v). Estos resultados dan evidencia de que el fosfato TAS, a bajas concentraciones (0,3–0,5%, p/v), puede resultar efectivo en la inhibición del ciclo lítico de fagos de BAL, en leche. No obstante, es importante considerar que en este trabajo una de las cepas hospedadoras (Ib3) sufrió retraso en su desarrollo, lo cual sería un problema al momento de ser usada como cultivo iniciador de un proceso fermentativo.

Utilización de fosfatos en la inhibición del desarrollo fúngico en la superficie de quesos de mediana y larga maduración

Los mohos son contaminantes indeseables en la industria de alimentos, en general, y en la quesera, en particular (Northolt y col., 1995; Pitt y Hocking, 1997). Un problema puntual en la industria quesera es el desarrollo de una

microflora, predominantemente fúngica, en la superficie de los quesos de mediana y larga maduración, el cual se produce durante dicho proceso. Si este desarrollo microbiano no se controla adecuadamente a lo largo de esta etapa se producen defectos en la superficie, que en algunas circunstancias se logran solucionar con la remoción de una parte de la costra por raspado, metodología que requiere mucha mano de obra y una pérdida considerable en el peso de las hormas. En los casos más extremos, y como consecuencia de los mohos desarrollados en la superficie, los quesos pueden ser atacados por ácaros. Estos arácnidos roen la cáscara e ingresan en la masa, pudiendo provocar la pérdida total del producto. Este problema es de difícil erradicación porque, si avanza, se instala no sólo en el queso sino también en las estanterías y en toda la sala de maduración. Para prevenir el desarrollo fúngico, la industria dispone comercialmente de una pintura a base de acetato de polivinilo adicionada con pimaricina (o natamicina) como principio activo, que se usa frecuentemente debido a su elevada eficiencia a pesar de su elevado costo. La pimaricina es considerada GRAS (Generally Regarded As Safe) por la FDA de los EE. UU., aunque en algunos países está cuestionado su uso. Se han llevado a cabo diversos métodos alternativos para controlar el crecimiento de hongos en la superficie de los quesos, entre ellos tratamientos de ahumado (Wendorff y col., 1993), inoculación de mohos antagonistas no tóxicos (Salvadori del Prato, 1998) y aplicación de aceite de oliva (Wendorff y Wee, 1997; Salvadori del Prato, 1998; Quinto y col., 2007) sobre la superficie de los quesos, con resultados diversos. En algunas variedades, este desarrollo superficial es indeseable y puede causar grandes pérdidas económicas y problemas de calidad del producto final (Kure y col., 2001). Por otra parte, algunos mohos pueden producir metabolitos secundarios (micotoxinas) y *flavour* indeseable. Diversos autores han aislado mohos de la superficie de quesos con períodos de mediana maduración, reportando que el *Penicillium* spp. fue, en todos los casos, el género predominante (Kure y col., 2004; Montagna y col., 2004; Hayaloglu y Kirbag, 2007).

Teniendo en cuenta los resultados informados en los pocos estudios existentes sobre inhibición de mohos utilizando fosfatos, Suárez y col. (2012) ensayaron el efecto inhibitorio sobre mohos de una composición basada en una solución acuosa de los polifosfatos A y B, aplicada de diferentes maneras sobre la superficie de quesos de mediana maduración. Los quesos fueron elaborados en una planta industrial cercana al Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) y llegaban para ser ensayados en su periodo de maduración luego de pasar 7 días en salmuera, presentando valores de 62,3% (p/p) de materia seca, 54,8% (p/p) de grasa en materia seca y pH 5,13. Estas hormas fueron tratadas de la siguiente manera, previo a ser enviadas a la

cámara de maduración: Testigo I (T I): queso pintado con pintura comercial antifúngica transparente a base de acetato de polivinilo, agua, sorbato de potasio, pimáricina y ácido cítrico (control); Testigo II (T II): queso pintado con pintura comercial transparente a base de acetato de polivinilo y agua; Experimental I (E I): tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato A (aprox. 45 %, p/v), sin pintar; Experimental II (E II): tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato B (aprox. 45 %, p/v), sin pintar; Experimental III (E III): tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato A + recubrimiento con pintura vinílica; Experimental IV (E IV): tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato B + recubrimiento con pintura vinílica; Experimental V (E V): recubrimiento con pintura vinílica adicionada de 60 % (v/v) de solución saturada de polifosfato A; Experimental VI (E VI): recubrimiento con pintura vinílica adicionada de 60 % (v/v) de solución saturada de polifosfato B; Experimental VII (E VII): tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato A + recubrimiento con pintura vinílica adicionada de 60 % (v/v) de solución saturada de polifosfato A; Experimental VIII (E VIII): tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato B + recubrimiento con pintura vinílica adicionada de 60 % (v/v) de solución saturada de polifosfato B. El proceso de pintado fue realizado a pincel (Fig. 1) y los quesos se colocaron en la cámara de maduración a una temperatura de 14 °C y humedad relativa de $73 \pm 5\%$ (Fig. 2). Se evaluó semanalmente mediante un registro fotográfico, la evolución de cada tratamiento durante todo el período de maduración, que fue de 6 meses.



Figura 1. Pintado manual de los quesos



Figura 2. Disposición de los quesos en la cámara de maduración

Se tomó como criterio considerar sólo el desarrollo fúngico en la cara lateral de la horma, desechando la evolución en las bases, excluyendo de esta manera las posibles desviaciones que se hubieran podido producir por el roce de las bases de las hormas en los sucesivos volteos. El desarrollo fúngico fue evaluado de manera semicuantitativa, considerando la observación del desarrollo fúngico en 5 secciones (de 1 cm² cada una) sobre la superficie de los quesos. La interpretación de los resultados fue la siguiente: (-) ausencia de crecimiento en todas las secciones; (+) desarrollo fúngico en menos del 50 % en todas las secciones; (++) desarrollo fúngico del 50–75 % en todas las secciones y (+++) desarrollo fúngico en el 100 % de todas las secciones.

Los quesos experimentales tratados con solución saturada de polifosfatos y no pintados mostraron resultados negativos, ya que se observó un desarrollo fúngico en toda la horma para ambos fosfatos a los 27 días de maduración (Fig. 3A). Al final de la experiencia, los tratamientos más exitosos fueron

aquellos en los que los quesos habían sido sumergidos en solución saturada de fosfatos y pintados posteriormente con pintura vinílica, con y sin adición de fosfatos. En estos casos, el desarrollo fue (+), al igual que el queso pintado con natamicina (Fig. 3 B).

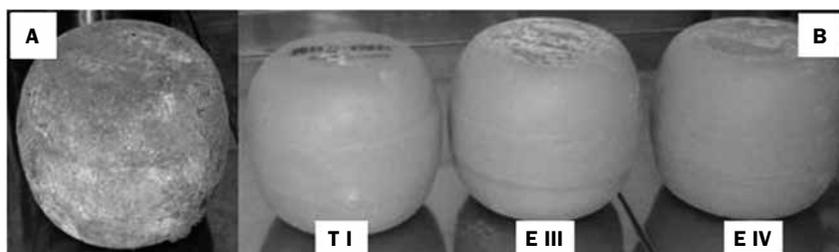


Figura 3. (A) Queso tratado por inmersión en solución saturada de polifosfatos, a los 27 d de maduración; (B) Quesos tratados con pintura comercial antifúngica (T I), inmersión en solución saturada de polifosfato A (E III) o B (E IV) y posteriormente cubiertos con pintura polivinílica, luego de 6 meses de maduración

A fin de determinar si el tratamiento con polifosfatos modificaba sensorialmente la calidad del producto final se compararon los quesos experimentales con el control (T I) utilizando un *test* triangular (*test* de discriminación basado en una diferencia global), de acuerdo con lo sugerido por Santa Cruz y col. (2005). En este *test*, los panelistas (no entrenados) no necesitan discriminar la naturaleza ni el grado de diferencia entre muestras sino solamente identificar aquella que consideran diferente. Los quesos experimentales seleccionados fueron los obtenidos con la aplicación de los tratamientos E III y E IV frente a los obtenidos con E VII y E VIII. Este criterio se adoptó considerando la igualdad de eficiencia en el control de la microflora fúngica y una metodología más sencilla de ser aplicada. Los resultados obtenidos demostraron que el uso de los polifosfatos siguiendo el protocolo propuesto no modificó significativamente las características sensoriales de los quesos en comparación con las mostradas por el queso testigo.

Teniendo en cuenta los resultados de este estudio, el uso de soluciones acuosas saturadas de polifosfatos de cadena larga (15–20 unidades de fosfato) aplicadas sobre la superficie de los quesos por inmersión y protegiendo la película con una capa de pintura de naturaleza vinílica sería una excelente alternativa al uso convencional de la natamicina. La metodología propuesta es muy sencilla, eficiente y además, sumamente económica.

Adicionalmente, se comprobó que las propiedades sensoriales de los quesos se mantienen inalteradas.

Esta metodología novedosa fue objeto de la concesión de la patente N° ARO84987B1 titulada «Una composición protectora que controla el desarrollo de la microflora de superficies de quesos de mediana y baja humedad», Reinheimer, Jorge, Meinardi, Carlos, Suárez, Viviana, Tremmel, Gustavo, Dorbessan, Oscar y Rivera, Mauricio (inventores), por parte del Instituto Nacional de la Propiedad Industrial (INPI) en 2019.

Referencias bibliográficas

- Del Río, E.; Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2005).** Effectiveness of trisodium phosphate treatment against pathogenic and spoilage bacteria on poultry during refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, 68(4), 866–869.
- Fernández, L.; Escobedo, S.; Gutiérrez, D.; Portilla, S.; Martínez, B.; García, P. y Rodríguez, A. (2017).** Bacteriophages in the dairy environment: From enemies to allies. *Antibiotics*, 6(4), 1–14.
- Hayaloglu, A. y Kirbag, S. (2007).** Microbial quality and presence of moulds in Kufllu cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 376–380.
- Ibrahim, S.A. y Daguri, M.H. (1996).** Bulk starter media for mesophilic starter cultures: a review. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 16(12), 823–828.
- International Commission on Microbiological Specifications (ICMSF). (1980).** *Ecología microbiana de los alimentos 2 – Productos alimenticios*. Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Jen, C.M. y Shelef, L.A. (1986).** Factors affecting sensitivity of *Staphylococcus aureus* 196E to polyphosphates. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(4), 842–846.
- Kanellos, T.S. y Burriel, A.R. (2005).** The bactericidal effects of lactic acid and trisodium phosphate on *Salmonella enteritidis* serotype pt4, total viable counts and counts of *Enteriobacteriaceae*. *Food Protection Trends*, 25, 346–350.
- Knabel, S.J.; Walker, H.W. y Hartman, P.A. (1991).** Inhibition of *Aspergillus flavus* and selected Gram-positive bacteria by chelation of essential metal cations by polyphosphates. *Journal of Food Protection*, 54(5), 360–365.
- Kure, C.F.; Skaar, I. y Brendehaug, J. (2004).** Mould contamination in production of semi-hard cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 93(1), 41–49.
- Kure, C.F.; Wasteson, Y.; Brendehaug, J. y Skaar, I. (2001).** Mould contaminants on Jarlsberg and Norvegia cheese blocks from four factories. *International Journal of Food Microbiology*, 70(1/2), 21–27.
- Lebron, C.I.; Molins, R.A.; Walker, H.W.; Kraft, A.A. y Stahr, H.M. (1989).** Inhibition of growth and aflatoxin production of aspergilli in medium containing phosphates. *Journal of Food Protection*, 52(1), 4–6.
- Lee, R.M.; Hartman, P.A.; Olson, D.G. y Williams, F.D. (1994a).** Bactericidal and bacteriolytic effects of selected food-grade phosphates, using *Staphylococcus aureus* as a model system. *Journal of Food Protection*, 57(4), 276–283.
- Lee, R.M.; Hartman, P.A.; Olson, D.G. y Williams, F.D. (1994b).** Metal ions reverse the inhibitory effects of selected food-grade phosphates in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*, 57(4), 284–288.
- Lee, R.M.; Hartman, P.A.; Stahr, H.M.; Olson, D.G. y Williams, F.D. (1994c).** Antibacterial mechanism of long-chain polyphosphates in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*, 57(4), 289–294.
- Maier, S.K.; Scherer, S. y Loessner, M. (1999).** Long-chain polyphosphate causes cell lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 3942–3949.
- Mehyar, G.; Blank, G.; Han, J.H.; Hydamaya, A. y Holley, R.A. (2005).** Effectiveness of trisodium phosphate, lactic acid and commercial antimicrobials against pathogenic bacteria on chicken skin. *Food Protection Trends*, 25, 351–362.
- Moineau, S. y Lévesque, C. (2005).** Control of bacteriophages in Industrial fermentations. En Kutter E. y Sulakvelidze A. (Eds.). *Bacteriophages: biology and applications*. Boca Ratón: CRC Press, 285–296.
- Molins, R.A. (1991). *Phosphates in food*. Boca Raton: CRC Press.
- Molins, R.A.; Kraft, A.A.; Olson, D.G. y Hotchkiss, D.K. (1984).** Recovery of selected bacteria in media containing 0.5% food grade poly- and pyrophosphates. *Journal of Food Science*, 49, 948–949.
- Montagna, M.T.; Santacroce, M.P.; Spilotros, G.; Napoli, C.; Minervini, F.; Papa, A. y Dragoni, I. (2004).** Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. *Mycopathologia*, 158(2), 245–249.
- Northolt, M.D.; Frisvad, J.C. y Samson, R.A. (1995).** Occurrence of food-borne fungi and factors for growth. En Samson, R., Hoekstra, E., Frisvad, J. y Filtenborg, O. (Eds.). *Introduction to food-borne fungi* (4th ed.). Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 243–285.

- Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (1997).** *Fungi and food spoilage*. London: Blackie Academic and Professional.
- Post, F.J.; Coblenz, W.S.; Chou, T.W. y Salumke, D.K. (1968).** Influence of phosphate compounds on certain fungi and their preservative effects on fresh cherry fruit (*Prunus cerasus*, L.). *Applied Microbiology*, 16(1), 138–142.
- Quinto, M.; Spadaccino, G.; Rotunno, T.; Sinigaglia, M.; Ciccarone, C. y Fox, P.F. (2007).** Effects of different surface treatments on ripening of Canestrato Pugliese cheese. *International Dairy Journal*, 17, 1240–1247.
- Rajkowski, K.T.; Calderone, S.M. y Jones, E. (1994).** Effect of polyphosphate and sodium chloride on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in ultra-high temperature milk. *Journal of Dairy Science*, 77(6), 1503–1508.
- Ray, B. (2001).** Spoilage of specific food groups. En *Fundamental Food Microbiology*. Boca Ratón: CRC Press, 239.
- Salvadori del Prato, O. (1998).** *Trattato di Tecnologia Casearia*. Bologna: Edagricole.
- Samson, J.E. y Moineau, S. (2013).** Bacteriophages in food fermentations: new frontiers in a continuous arms race. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 347–368.
- Santa Cruz, M.; Martínez, C. y Varela, P. (2005).** Principios básicos de análisis sensorial. En Hugo, G. y Fiszman, S. (eds.), *Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos*. Madrid: Martín Impresores, S.L., 17–41.
- Shelef, L.A. y Seiter, J.A. (1993).** Indirect antimicrobials. En Davidson, P.M. (Ed.), *Antimicrobials in foods* (2nd ed.). New York: Marcel Dekker, Inc., 539–569.
- Sobrero, M.S. (2002).** *Identificación de mohos en el proceso de elaboración de jugos cítricos* (Tesis para acceder al grado académico de Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos). Universidad Nacional del Litoral (Argentina).
- Suárez, V.B.; Frisón, L.; de Basílico, M.Z.; Rivera, M. y Reinheimer, J.A. (2005).** Inhibitory activity of phosphates on moulds isolated from foods and food processing plants. *Journal of Food Protection*, 68(11), 2475–2479.
- Suárez, V.; Tremmel, G.; Rivera, M.; Reinheimer, J.A. y Meinardi, C. (2012).** Polyphosphates as inhibitors of surface mould growth on hard cheese during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 65(3), 410–415.
- Suárez, V.B.; Carrasco, M.; Frisón, L.; Basílico, M. de; Simonetta, A.; Rivera, M. y Reinheimer, J.A. (2007a).** Inhibición por fosfatos de grupos microbianos alteradores de interés en alimentos. *La Alimentación Latinoamericana*, 0(268), 50–57.
- Suárez, V.B.; Capra, M.L.; Rivera, M. y Reinheimer, J.A. (2007b).** Inactivation of calcium-dependent lactic acid bacteria phages by phosphates. *Journal of Food Protection*, 70(6), 1518–1522.
- Suárez, V.B.; Carrasco, M.; Simonetta, A.; Rivera, M. y Reinheimer, J.A. (2007c).** Phosphates as inhibitors of yeasts isolated from food sources. *Italian Journal of Food Science*, 19(3), 255–262.
- Wendorff, W.L. y Wee, C. (1997).** Effect of smoke and spice oils on growth of moulds on oil-coated cheeses. *Journal of Food Protection*, 60(2), 153–156.
- Wendorff, W.L.; Riha, W.E. y Muehlenkamp, E. (1993).** Growth of moulds on cheese treated with heat or liquid smoke. *Journal of Food Protection*, 56(11), 963–966.
- Whitehead, W.E.; Ayres, J.W. y Sandine, W.E. (1993).** Symposium: Recent developments in dairy starter cultures: Microbiology and Physiology. *Journal of Dairy Science*, 76(8), 2344–2353.

8. Microorganismos alterantes en la industria láctea

Incidencia regional en los últimos 20 años

Daniela Guglielmotti, Viviana Suárez, Ana Binetti,
Diego Mercanti, Andrea Quiberoni, Desireé Llorens,
Mariángeles Briggiler Marcó, Ma. Luján Capra,
Patricia Burns y Jorge Reinheimer

En la actualidad, la amplia variedad de productos lácteos (e insumos) disponibles puede estar sometida a la acción de una gran diversidad de organismos alterantes. Los grupos microbianos alterantes dependerán del tipo de producto lácteo o insumo considerado, del proceso productivo, tipo de almacenamiento y manipulación, entre otros factores. En primer lugar, la leche cruda (materia prima) es alterada principalmente por organismos psicrotrofos y bacterias ácido lácticas (BAL). Sin embargo, la pasteurización destruye a la mayoría de los mismos. En el caso de los productos lácteos ya elaborados, las alteraciones pueden detectarse rápidamente o luego de varios meses, dependiendo del contenido de humedad, pH, parámetros de procesamiento y temperatura de almacenamiento de los mismos (Ledenbach y Marshall, 2009). Las modificaciones indeseables generalmente detectadas incluyen presencia de gas (envases hinchados, presencia de ojos no deseados en quesos), coloraciones, aromas y/o texturas anormales. En la Tabla 1 se detallan los productos lácteos más importantes y los grupos microbianos alterantes más comunes en cada caso.

Tabla 1. Grupos microbianos alterantes generalmente asociados a leche y productos lácteos

Leche / productos lácteos	Organismo alterante
Leche cruda	Psicrotrofos, BAL, bacterias esporígenas, etc.
Leche pasteurizada	Psicrotrofos de recontaminación, bacterias termodúricas
Leche en polvo	Bacterias esporígenas
Yogur y otras leches fermentadas	Levaduras
Quesos blandos/frescos (sin maduración)	Psicrotrofos, coliformes, mohos, BAL heterofermentantes
Quesos semiduros/duros (con maduración)	Mohos, BAL heterofermentantes, bacterias esporígenas

En nuestra experiencia, la principal preocupación de la industria láctea regional se refiere a las alteraciones observadas en quesos, seguido por contaminaciones en la leche utilizada como materia prima en la elaboración de estos productos. En este contexto, a continuación se describirán brevemente las principales alteraciones microbianas asociadas a quesos.

Alteraciones principales en quesos

La producción endógena de gas es el principal defecto microbiano que afecta las elaboraciones casearias debido a la imposibilidad de corrección, elevada frecuencia de aparición y gran impacto económico, afectando grandes volúmenes de producción de una amplia variedad de quesos. La causa se relaciona con la presencia de diferentes bacterias productoras de gas, BAL heterofermentantes (géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*), propionibacterias o bacterias ácido propiónicas (BAP), clostridios, *Bacillus* y coliformes (Otto-galli, 1968; Lodi, 1993), así como levaduras (Jakobsen y Narvhus, 1996). En general, muchos microorganismos presentes en la leche pueden provocar fermentaciones que causan defectos en el queso. Sin embargo, debido a la diversidad observada entre estos, resulta difícil clasificarlos así como también identificar la/s causa/s que los provocan. Aunque el gas (generalmente H₂ y CO₂) puede ser producido a partir de un amplio rango de compuestos presentes en el queso, la lactosa, el lactato, el citrato y la urea son los principales sustratos para estos microorganismos.

En Argentina, el país de mayor producción quesera en América del Sur, se han detectado en los últimos años numerosos problemas relacionados con la hinchazón de quesos causados por microorganismos muy diversos, con las consecuentes pérdidas económicas. Si bien se conocen en gran parte cuáles son dichos agentes microbianos, hasta el momento no se ha encontrado una

única solución que minimice los efectos de su presencia, justamente debido a esa gran diversidad de microorganismos y de quesos en los que se detectan estas alteraciones (Reinheimer y col., 1995; Jakobsen y Narvhus, 1996; Quiberoni y col., 2008).

Entre los factores que influyen en la aparición de este tipo de defectos podemos listar:

1. alimentación del ganado con ensilados;
2. baja calidad microbiológica de la leche (alto contenido de esporos bacterianos y BAL termorresistentes);
3. condiciones deficientes de higiene edilicia y de equipos;
4. uso de un fermento iniciador con baja actividad.

Principales grupos microbianos responsables de la producción de gas en quesos

En la Tabla 2 se resumen los diferentes grupos microbianos responsables de defectos gasógenos en quesos, así como los sustratos involucrados y los gases producidos en cada caso.

Tabla 2. Principales grupos microbianos responsables de defectos gasógenos en quesos (Fontaneto Apoca, 2017)

Grupo microbiano / especie	Sustrato	Tipo de defecto según el momento de manifestación	Productos gaseosos
Coliformes	Lactosa	Hinchazón precoz	CO ₂ , H ₂
Levaduras	Lactosa	Hinchazón precoz	CO ₂
<i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	Citrato /Lactato	Hinchazón precoz y tardía	CO ₂
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Lactosa / Citrato	Hinchazón precoz y tardía	CO ₂
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Lactato	Hinchazón tardía	CO ₂
<i>Bacillus subtilis</i>	Lactosa	Hinchazón tardía	CO ₂ , H ₂
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> <i>Clostridium butyricum</i>	Lactato	Hinchazón tardía	CO ₂ , H ₂
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	Citrato	Hinchazón precoz y tardía	CO ₂

Caracterización de los diferentes ojos producidos por microorganismos

El tipo de ojos presentes en la pasta de un queso es una característica indicativa tanto de la calidad microbiológica de la leche de partida como de la tecnología aplicada en la elaboración del queso. En el primer caso, el origen es el gas producido durante las fermentaciones de determinados microorganismos y, en general, estos ojos suelen ser redondeados, lisos y de diferentes dimensiones (desde el tamaño de una cabeza de alfiler con humedad en su interior, en el caso de las bacterias coliformes, hasta el de un garbanzo, propio de bacterias termófilas). En el caso de los ojos producto del desarrollo de levaduras, los tamaños rondan entre 2 y 4 mm de diámetro y su interior es brillante y liso, y presentan aromas frutales característicos. Cuando los ojos son causados por BAL heterofermentantes, los tamaños son de 1 mm o mayores, presentan forma redondeada y el interior es liso y brillante sin presencia de humedad. En cambio, en el caso de desarrollo de BAP, los ojos característicos son grandes (> 5 mm), redondeados y de bordes lisos, lustrosos en su interior. Además, en la masa del queso se pueden presentar grietas más o menos profundas producidas por bacterias del género *Clostridium*, con generación de olores y sabores desagradables (Fontaneto Apoca, 2017).

Tipos de defectos gasógenos en quesos

De acuerdo con momento en que se manifiesta, el defecto por generación de gases puede surgir en las primeras horas dentro del proceso de elaboración o maduración del queso, dando lugar a la denominada *hinchazón precoz* (primeras 72 h), o puede manifestarse durante las etapas de maduración del queso, fenómeno conocido como *hinchazón tardía*.

La generación temprana de gas es debida a la presencia de bacterias coliformes o levaduras y, en ciertos casos, también puede ser causada por bacterias lácticas no pertenecientes al *starter* o NSLAB (por su sigla en inglés, *Non Starter Lactic Acid Bacteria*). Este grupo está integrado por géneros citrato-positivo, como *Leuconostoc* y algunas integrantes del género *Lactobacillus* capaces de producir CO₂ por fermentación. Este defecto es común en quesos blandos y semiduros debido a su alta actividad acuosa (aw), en comparación con otros tipos de quesos. En el caso del defecto de hinchazón tardía, la generación de gas se produce en etapas más avanzadas de la maduración, por ejemplo en quesos tipo Cheddar, por bacterias pertenecientes al grupo NSLAB como *Lb. brevis* y *Lb. fermentum*, que pueden ingresar al circuito pro-

ductivo por contaminación de la leche y producir gas a partir de la fermentación de lactosa residual y galactosa, generando CO₂, o por bacterias citrato-positivo como *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* que generan CO₂ a partir de citrato (Sheelan, 2007; Hill y Kethireddipalli, 2013).

Asimismo, quesos de mediana y baja humedad y salados en salmuera pueden sufrir las consecuencias de la germinación de esporos del género *Clostridium*, como *Cl. tyrobutyricum* y *Cl. butyricum*, que fermentan lactato y lactosa, respectivamente, y producen CO₂ y H₂.

Algunos quesos de larga maduración (mayor a 14 meses) como el Parmigiano Reggiano o el Grana Padano, son candidatos ideales para sufrir fermentación butírica y ocasionalmente, fermentación propiónica (Fröhlich-Wyder y Bachmann, 2004). Tres especies de clostridios son señalados como los responsables principales de defectos tardíos en quesos de pasta dura de larga maduración: *Cl. butyricum*, que generalmente crece en las primeras etapas de maduración utilizando la lactosa residual como fuente de carbono; *Cl. tyrobutyricum*, que tiene capacidad de crecimiento en etapas tardías de maduración (mayor a un año) y especialmente cuando el pH se vuelve favorable debido a la utilización de ácido láctico y lactato como fuente de carbono, y *Cl. sporogenes*, que crece después del año de maduración del queso, es muy proteolítico y utiliza aminoácidos como fuente de carbono. El desarrollo de BAP es poco frecuente, ya que son necesarias condiciones particulares, como desarrollo de acidez débil en la cuajada o un nivel de salado relativamente bajo (Rossi y col., 1996).

Realidad regional

Los defectos gasógenos en los quesos argentinos figuran quizás, en la actualidad, dentro de las mayores preocupaciones de la industria por las pérdidas económicas asociadas y debido a la no disponibilidad, al día de hoy, de una estrategia para disminuir su incidencia. Esto último se debe sobre todo a la diversidad de microorganismos (a nivel de especies y, sobre todo, de cepas) responsable, a la heterogeneidad en la calidad de las leches y a las tecnologías queseras utilizadas. A pesar de la importancia de esta problemática, no existen en la Argentina estudios realizados en este sentido, a excepción de un trabajo publicado por el INLAIN (Quiberoni y col., 2008). El Instituto ha trabajado en el tema con la industria desde la aparición del problema (1998) y, al día de hoy, se ha procesado un número muy elevado de muestras que refleja las características de la problemática para nuestra industria quesera. Vale aclarar que las oscilaciones en la cantidad y el tipo de muestras analiza-

das a lo largo de estos 20 años responden de manera directa a las variaciones en el envío de las muestras por parte de las empresas interesadas, de acuerdo con sus necesidades, intereses o problemáticas, y no se trata en absoluto de un estudio sistemático por parte de nuestro Instituto.

En este capítulo se pretende mostrar de manera compendiada los resultados obtenidos durante estos 20 años, a lo largo de los cuales se analizó una gran cantidad de muestras con alteraciones microbianas provenientes de la industria láctea, identificando y cuantificando en la mayoría de los casos, el/los agente/s microbiano/s causante/s de la/s alteración/es observada/s. En particular, se detallarán los defectos gasógenos observados en diversas variedades de quesos que, como se mencionó anteriormente, representan el principal tipo de alteración hallado en los productos lácteos de nuestra región. Asimismo, se ofrecerán también algunos resultados de leches pasteurizadas, utilizadas en quesería para indagar la presencia de agentes alterantes (gasógenos o no) termorresistentes en las mismas.

Resultados y discusión

En el transcurso de 20 años de análisis (1998–2018), nuestro Instituto recibió un total de 330 muestras (quesos, leches crudas y pasteurizadas, yogures, suero de quesería, concentrado de suero, entre otros), que revelaron la presencia de microorganismos alterantes (Fig. 1). Particularmente, la mayoría de estas muestras correspondieron a quesos (142 muestras) que evidenciaron principalmente defectos gasógenos, seguido por leches crudas/pasteurizadas (88 muestras) utilizadas para las elaboraciones. El resto de las muestras positivas (líquidas y polvos) fueron consideradas como posibles fuentes de microorganismos alterantes.

Durante 2002 y 2008, el número de muestras analizadas —y positivas para microorganismos alterantes— fue especialmente elevado (32 en 2002 y 66 en 2008) y, salvo en estos años particulares, el período comprendido entre 1998 y 2011 se caracterizó por un número de muestras inferior a 10 por año. A partir de 2012 (con excepción de 2013), dicho número se incrementó a entre 15 y 26 muestras por año.

En la Fig. 2 se puede observar que la gran mayoría de muestras analizadas poseían organismos gasógenos, mientras que principalmente a partir de 2012 se detectaron algunas muestras con otros tipos de alteraciones microbianas (coloraciones, sabores y aromas anormales).

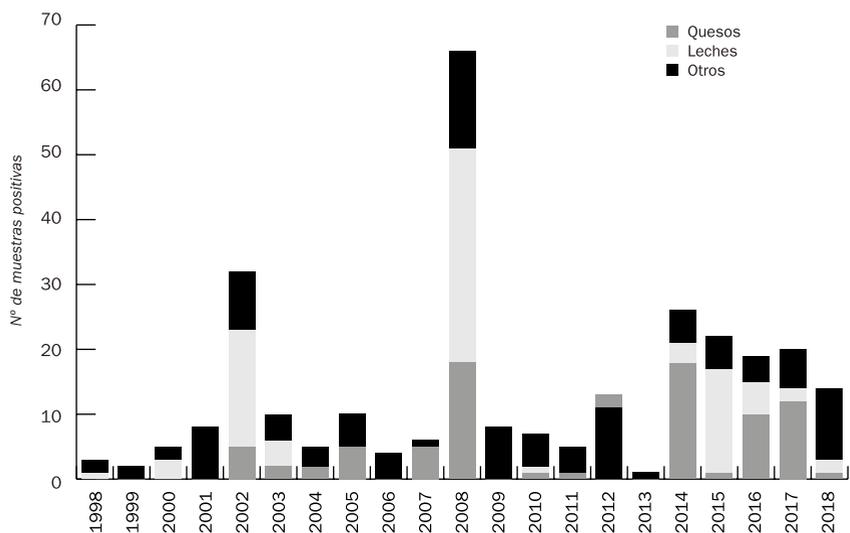


Figura 1. Distribución anual (1998–2018) de muestras analizadas con presencia de microorganismos alterantes

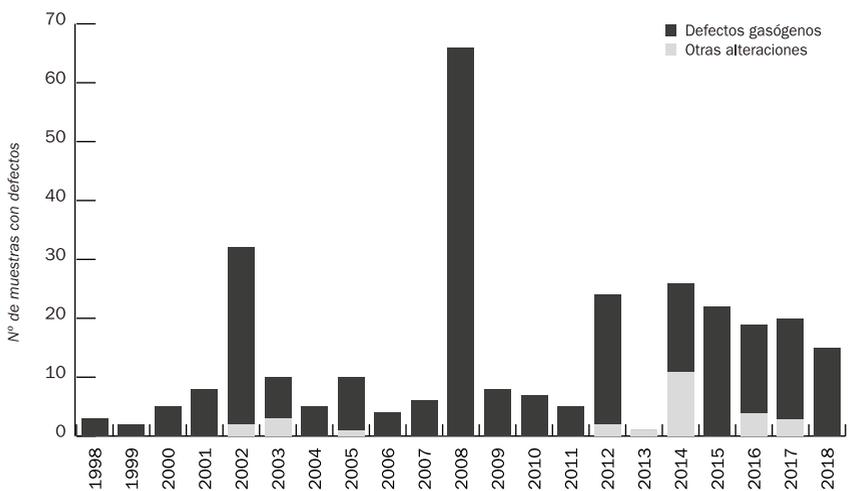


Figura 2. Tipos de alteraciones microbiológicas detectadas en las muestras positivas analizadas (1998–2018). Los defectos gasógenos derivan de la presencia de microorganismos productores de gas. El resto de los defectos incluye coloraciones, sabores y aromas anormales, entre otros

Los grupos microbianos mayormente responsables de los defectos pertenecieron a *Leuconostoc*, lactobacilos heterofermentantes y *Bacillus*, particularmente en el segundo período considerado (2008–2018) (Fig. 3). En paralelo, se detectaron otros grupos microbianos aunque en una proporción sensiblemente menor (clostridios, bacterias propiónicas, coliformes, mohos y levaduras).

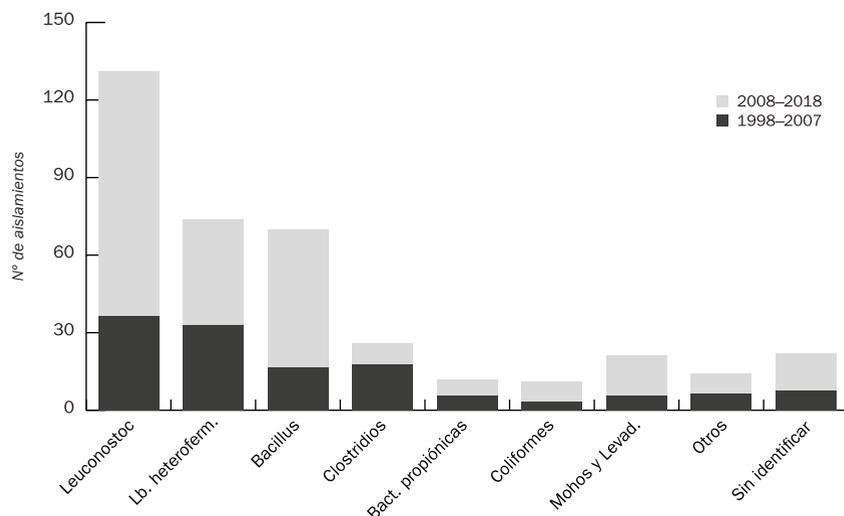


Figura 3. Número y tipo de microorganismos alterantes aislados durante 20 años, presentado en dos períodos de una década cada uno (1998–2007 y 2008–2018)

Considerando sólo los microorganismos gasógenos (Fig. 4), es posible observar que la mayoría de éstos se detectó principalmente en quesos (48%), seguido por muestras de leche (29%). Esto indicaría, de algún modo, que el queso actúa como una matriz propicia para el desarrollo de este tipo de defecto y, por otro lado, la sospecha de que la materia prima (leche) sería, quizás, la principal fuente de tales organismos. En este sentido, el aporte de estos por parte de insumos varios (leche en polvo, concentrado de proteínas de suero o WPC, crema, suero de quesería, fermentos, etc.) resultó minoritario.

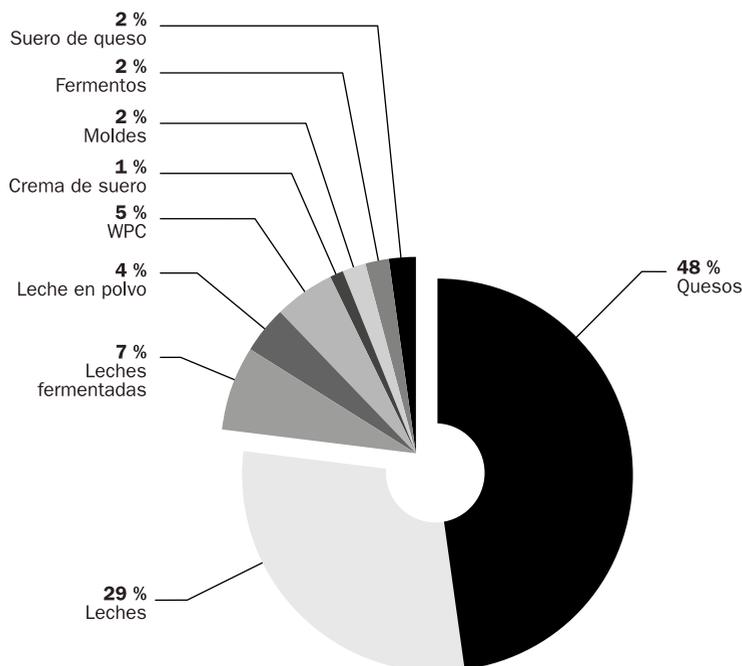


Figura 4. Tipo y cantidad relativa de muestras analizadas que revelaron la presencia de organismos gasógenos (n = 271)

Teniendo en cuenta los dos tipos principales de muestras (quesos y leches) poseedoras de microorganismos gasógenos (Fig. 5), es posible notar que existe una clara diferencia entre los grupos microbianos aislados en cada caso. En quesos, *Leuconostoc* resultó el género bacteriano mayormente responsable de tales defectos (más de 70 cepas aisladas), seguido de lactobacilos heterofermentantes (aproximadamente 30 cepas) y de bacilos esporógenos anaerobios (clostridios, 13 cepas) y aerobios (*Bacillus*, 10 cepas) (Fig. 5A). En cambio, realizando el mismo análisis para las muestras de leche, los microorganismos gasógenos predominantemente aislados pertenecieron al género *Bacillus* (37 cepas), seguido por *Leuconostoc* (23 cepas), clostridios (10 cepas) y lactobacilos heterofermentantes (8 cepas) (Fig. 5B). Para ambos tipos de muestras, fue ocasional el aislamiento de bacterias propiónicas, coliformes y levaduras (un total de 12, 8 y 6 cepas, respectivamente).

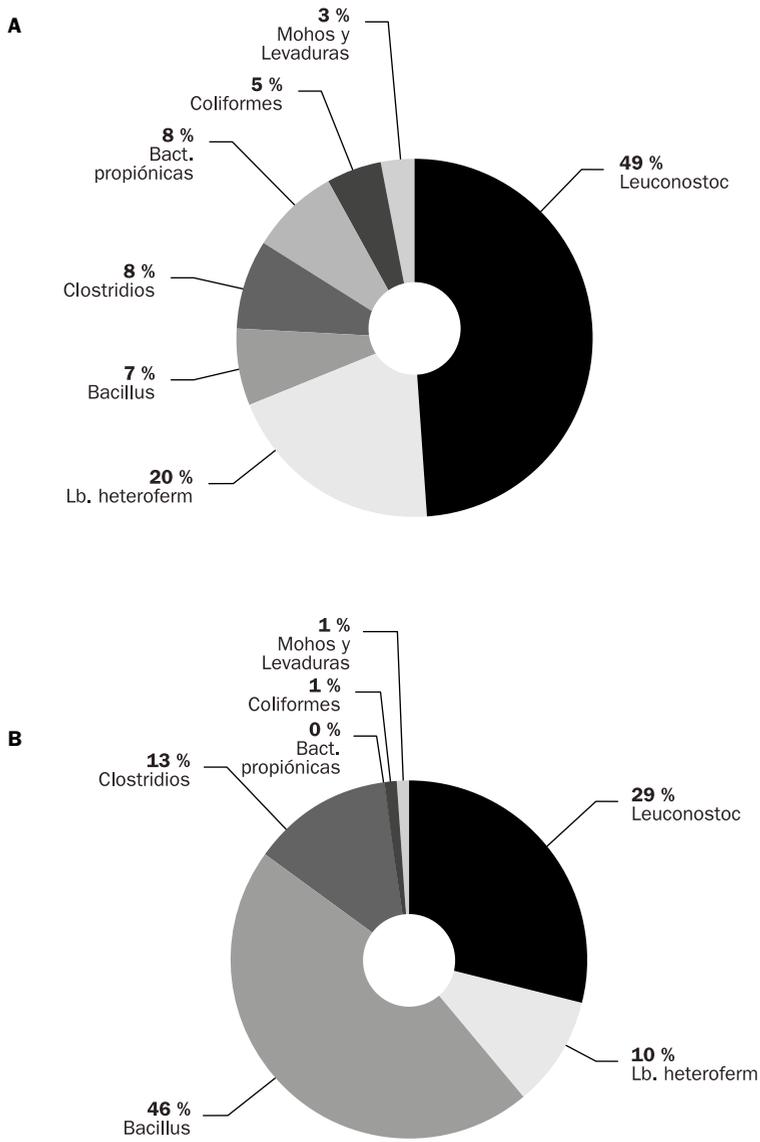


Figura 5. Distribución relativa de grupos microbianos gasógenos en las muestras analizadas de quesos (A) (n = 148) y leches (B) (n = 88)

En particular, se analizaron las diferencias entre quesos blandos y semiduros/duros en cuanto al tipo de microorganismo gasógeno detectado en los mismos (Fig. 6). Es así que en quesos blandos *Leuconostoc* demostró ser el género mayormente responsable de los defectos (51 cepas aisladas), siendo

muy baja la cantidad de lactobacilos heterofermentantes aislados (5 cepas). Por otro lado, los quesos semiduros y duros resultaron sensibles a una mayor diversidad microbiana. En estos últimos, se detectaron los grupos de organismos gasógenos, con mayor proporción de lactobacilos heterofermentantes (26 cepas) y *Leuconostoc* (23 cepas).

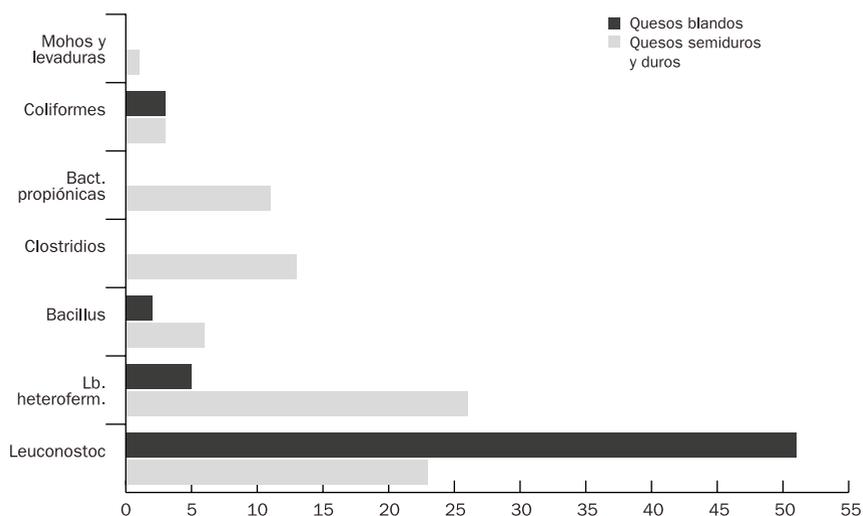


Figura 6. Diversidad y cantidad de microorganismos gasógenos aislados en quesos blandos y semiduros/duros

Los microorganismos alterantes aislados fueron, por su parte, cuantificados en las muestras. Este análisis determinó que en todos los casos, sus niveles resultaron elevados (entre 10^5 y 10^{10} UFC/ml o UFC/g).

Por último, al realizar la identificación de especie de un gran número de los organismos gasógenos aislados, fue posible determinar que el género *Leuconostoc* estuvo representado por las especies *Leuc. pseudomesenteroides* (24 cepas), *Leuc. mesenteroides* (20 cepas), *Leuc. lactis* (9 cepas) y *Leuc. citreum* (1 cepa); mientras que el género *Lactobacillus* lo estuvo por *Lb. fermentum* (27 cepas), *Lb. brevis* (6 cepas) y *Lb. rhamnosus* (2 cepas). Por otro lado, la mayoría de cepas de *Bacillus* no fue identificada a nivel de especie, pero aquellas que sí lo fueron pertenecieron a *B. polymyxa* (2 cepas), *B. macerans* (2 cepas) y *B. licheniformis* (2 cepas). La Fig. 7 muestra imágenes de cortes de hormas de diversos quesos analizados con defectos gasógenos producidos por diferentes microorganismos.

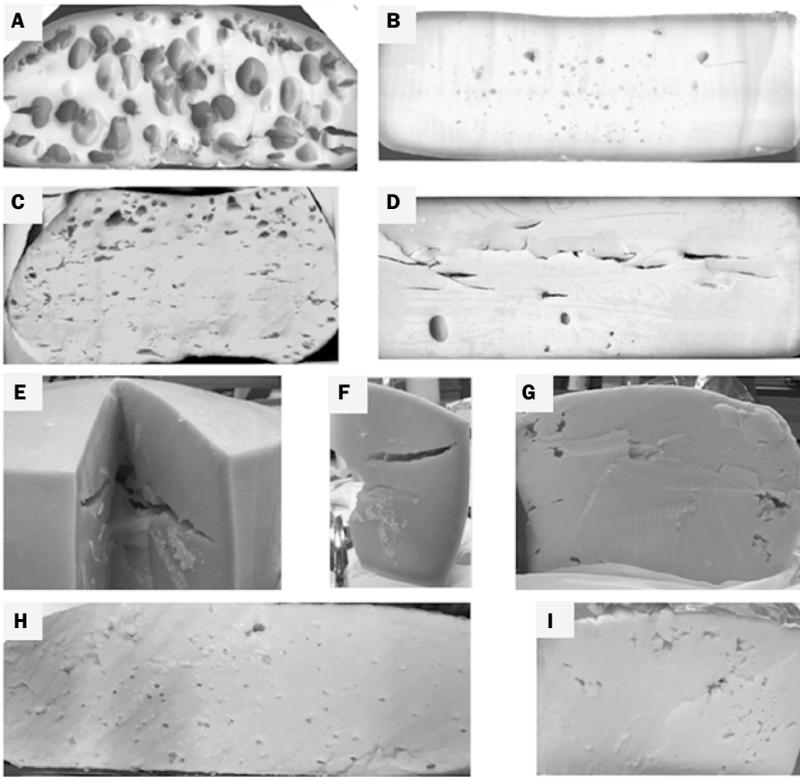


Figura 7. Defectos provocados por microorganismos gasógenos en diversos tipos de quesos: (A) Fontina (bacterias coliformes, propiónicas y lactobacilos heterofermentantes); (B) Colonia (bacterias propiónicas y clostridios); (C) y (H) Cremoso (*Leuconostoc sp.*); (D) Talhuet (*Bacillus sp.* y *clostridios*); (E) y (F) Reggianito (*clostridios*); (G) e (I) Danbo (*Leuconostoc sp.*)

Conclusiones

El trabajo realizado durante 20 años por parte de los microbiólogos pertenecientes al INLAIN puso en evidencia una elevada incidencia de defectos gasógenos en la producción quesera de la región, lo que afectó sensiblemente la calidad de los productos (textura, aroma y/o sabor), con las consecuentes implicancias económicas. Como causa general de esta problemática puede indicarse a la actividad de bacterias lácticas y no lácticas termodúricas presentes principalmente en la leche cruda y, minoritariamente, en diversos insumos usados, producidos o generados (tales como WPC y suero de quesería, entre otros) por estas industrias.

Referencias bibliográficas

- Fröhlich-Wyder, M.T. y Bachmann, H.P. (2004).** Cheeses with propionic acid fermentation. En Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. y Guinee, T.P. (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 2: Major Cheese Groups. Londres, Reino Unido: Elsevier Academic Press, 141–156.
- Fontaneto Apoca, A. (2017).** Defectos gasógenos en quesos provocados por microorganismos. Trabajo Final Integrador, Especialización en Ciencia y Tecnología de la Leche y Productos Lácteos (UNL).
- Hill, A.R. y Kethireddipalli, P. (2013).** Dairy products: cheese and yoghurt. En Eskin, N.A.M. y Shahidi, F. (Eds.). *Biochemistry of foods*. Londres, Reino Unido: Academic Press, 319–351.
- Jakobsen, M. y Narvhus, J. (1996).** Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal*, 6, 755–768.
- Ledenbach, L.H. y Marshall R.T. (2009).** Microbiological Spoilage of Dairy Products. En Sperber, W.H. y Doyle, M.P. (Eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, Food Microbiology and Food Safety. New York, USA: Springer, 41–67.
- Lodi, R. (1993).** *I difetti. L'Industria del Latte*, XXIX(2), 89–96.
- Ottogalli, G. (1968).** Moderni criteri microbiologici di valutazione dei formaggi. *Rivista della Società Italiana di Scienze Alimentari*, 15(5), 333–338.
- Quiberoni, A.; Guglielmotti, D. y Reinheimer, J. (2008).** New and classical spoilage bacteria causing widespread blowing in Argentinean soft and semihard cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 61, 358–363.
- Reinheimer, J.; Suárez, V.; Bailo, N. y Zalazar, C. (1995).** Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinian hard-cheese production. *Journal of Food Protection*, 58(7), 769–799.
- Rossi, F.; Capilongo, V. y Torriani, S. (1996).** Confronto tra diversi terreni selettivi per la conta e l'isolamento dei batteri propionici in latte ovino. *Industria del Latte*, 3, 33–43.
- Sheelan, J.J. (2007).** The microbiology of cheese ripening: What causes the development of gas during ripening? En: McSweeney, P.L.H. (Ed.). *Cheese problems solved*. Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing Limited, 131–132.

9. Fagos en la industria láctea: problemática actual y metodologías alternativas para disminuir su incidencia

Diego Mercanti, Silvina Pujato, Ma. Luján Capra,
Daniela Guglielmotti, Mariángeles Briggiler Marcó,
Viviana Suárez y Andrea Quiberoni

Introducción

Los bacteriofagos (o fagos) son reconocidos como los virus más abundantes y ubicuos del planeta y se encuentran presentes en todos los ecosistemas donde existen bacterias (Émond y Moineau, 2007). Por lo general, estos virus bacterianos infectan de manera específica un subconjunto de células, lo que eventualmente conduce a la lisis celular y liberación de nuevos viriones que están listos para infectar células vecinas susceptibles. Durante la mayoría de las fermentaciones de alimentos a escala industrial, los sustratos fermentables se inoculan con bacterias seleccionadas (cultivos iniciadores) para generar un producto con propiedades y/o funcionalidades organolépticas deseadas. Los principales cultivos iniciadores utilizados en la industria láctea pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) incluyendo cepas de *Lactococcus (Lc.) lactis*, *Streptococcus (Strep.) thermophilus* y diversas especies de *Leuconostoc (Leuc.)* y *Lactobacillus (Lb.)*. Debido a que las fermentaciones industriales de alimentos a menudo se realizan en grandes tinas o reactores y en condiciones que no son completamente estériles, no es sorprendente

que los fagos puedan estar presentes y atacar estos cultivos causando fallas en la fermentación. La elaboración de un producto lácteo fermentado puede verse seriamente comprometida por un ataque fágico, que puede detectarse por disminución o inhibición total de la actividad acidificante de los cultivos lácticos primarios adicionados. Por otra parte, las infecciones fágicas de los cultivos adjuntos adicionados a los productos lácteos no son fáciles de evidenciar, ya que la actividad acidificante de los cultivos primarios no se ve comprometida (Mercanti y col., 2011). El descarte de productos no satisfactorios puede llevar a grandes pérdidas económicas.

Los fagos al infectar toman el control de la maquinaria biosintética bacteriana, enlenteciendo su actividad metabólica normal y poniéndola a disposición de la síntesis y ensamblado de nuevas partículas fágicas, con posterior liberación al medio de las mismas mediante lisis celular bacteriana. Este proceso es conocido como ciclo lítico. Por otro lado, algunos fagos denominados temperados son capaces de integrar el genoma fágico al cromosoma bacteriano, replicándose de manera simultánea al mismo. En este caso, el profago se encuentra en estado de latencia, pudiendo permanecer así durante repetidas multiplicaciones bacterianas, hasta que algún evento externo produzca la liberación del genoma fágico del cromosoma bacteriano y de esta forma, se reanude el ciclo lítico (Capra y Mercanti, 2012). Aunque se han investigado muchas medidas de control en el pasado, ningún método puede erradicar por completo todos los fagos en los ambientes de la industria alimentaria. De hecho, las grandes industrias lácteas han implementado un enfoque preventivo sistemático para la descontaminación de fagos.

En este capítulo se detallan las dificultades derivadas de la presencia de fagos con elevada resistencia térmica en la industria, y las consecuencias del uso de suero de quesería como aditivo en la industria láctea fermentativa, donde es cada vez más frecuente encontrar fagos en elevada concentración. El capítulo se complementa con la revisión de metodologías para disminuir la incidencia de infecciones, tales como tratamientos térmicos, biocidas y empleo de cepas naturalmente mejoradas.

Fuentes de contaminación en la industria láctea

La ubicuidad de los fagos puede ocasionar, en algunos casos, severos problemas durante los procesos fermentativos en la industria láctea. Por tal razón, es crucial identificar las fuentes de contaminación debido a las cuales persisten en el ambiente de la planta, a fin de introducir acciones correctivas que limiten su propagación.

Leche cruda

Una de las principales vías de ingreso de fagos a la industria láctea es la leche cruda, que puede contener hasta 10^4 unidades formadoras de placas (UFP) por ml. Si bien se considera que títulos fágicos entre 10^6 – 10^7 UFP/ml producen importantes fallas en las fermentaciones, bajas concentraciones (del orden de 10^3 UFP/ml) pueden originar complicaciones, aun cuando no sean capaces de frenar completamente el proceso fermentativo (Tayyarcán y col., 2018). Un monitoreo de muestras de leche cruda provenientes de diferentes plantas lácteas en España, evidenció que aproximadamente el 10 % (83 de 900) de las mismas contenían fagos de *Lc. lactis* (Madera y col., 2004). Por otra parte, Del Río y col. (2007) informaron que el 37 % (20 de 54) de las muestras de leche cruda utilizadas (en España) para producción de yogur estaban contaminadas con fagos de lactococos (63 %) y estreptococos (37 %) potencialmente activos. Algunos autores (Capra y col., 2013; Tayyarcán y col., 2018) demostraron que fagos provenientes de leche cruda pueden permanecer infectivos incluso luego de la aplicación de ciertos tratamientos térmicos. Se sabe que las combinaciones tiempo–temperatura aplicadas en los tratamientos de pasteurización de baja (LTLT, 63 °C–30 min) o de alta (HTST, 72 °C–15 s) son generalmente insuficientes para lograr la completa inactivación de los fagos de BAL presentes (Capra y col., 2013; Tayyarcán y col., 2018). En general, los fagos de *Lc. lactis*, *Lb. helveticus*, *Strep. thermophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Leuc. pseudomesenteroides*, *Leuc. mesenteroides* y *Lb. delbrueckii* presentaron una resistencia térmica elevada, siendo necesarios entre 2 y 300 min a 72 °C para lograr la inactivación del 99 % de los bacteriofagos presentes (Atamer y col., 2013). Es importante destacar que la mayoría de estos estudios ensayaron la resistencia térmica de los fagos en tubos de ensayo de vidrio o metálicos sumergidos en baños de agua termostatisados. Cuando los estudios se llevaron a cabo en pasteurizadores de planta piloto, se logró mejorar notablemente la eficiencia de inactivación aplicando la misma combinación tiempo–temperatura, debido a mejoras en la transferencia térmica alcanzada mediante el flujo turbulento continuo a través de los intercambiadores de placa (Wagner y col., 2018).

Ambiente industrial

Con respecto a niveles de contaminación fágica en el aire, algunos autores (Atamer y col., 2013) reportaron valores de concentración cercanos a 10^8 UFP/m³. Los aerosoles se generan por salpicaduras de líquidos y despla-

zamiento del aire en torno a las tinas y otras superficies contaminadas, permanecen en el aire por largo tiempo y son reconocidos como una importante vía de diseminación de los fagos en el ambiente lácteo (Verreault y col., 2011; Briggiler Marcó y col., 2018). Las superficies de trabajo constituyen una fuente de contaminación fágica subestimada en las instalaciones de la industria. Se ha detectado material genético de fagos de lactococos en variadas superficies (paredes y pisos, escaleras, picaportes, mesas, equipamiento, material de limpieza y cañerías) (Verreault y col., 2011). Si bien la detección genética no implica que los fagos se encuentren infectivos, la evidencia enfatiza la necesidad e importancia de aplicar estrategias de sanitización correctas y de contar con personal específicamente entrenado y capacitado en la temática de fagos, con el objetivo de disminuir el riesgo (Briggiler Marcó y col., 2018).

Suero y subproductos de suero

El suero proveniente de la elaboración de quesos puede ser simplemente vertido a cursos de agua o destinado a procesos de mayor o menor complejidad. La disposición directa como efluente a cursos de agua fue una práctica frecuente en el pasado pero, debido a su alto nivel de contaminación ambiental, la misma ha sido reemplazada por otras alternativas de tratamiento que a su vez permiten aprovechar el potencial nutricional y económico de este valioso subproducto de la industria láctea. Estos tratamientos son variados (concentración por evaporación, fraccionamiento de componentes específicos por centrifugación, cromatografía, intercambio iónico y membranas de filtración) y dependen del derivado de suero que se desee obtener (Masotti y col., 2017). Alternativamente, el suero ha sido usado como sustrato de fermentación para producción de biomasa o metabolitos de interés, así como para la producción de determinadas moléculas mediante reacción química. El suero y sus derivados pueden presentarse de diversas maneras: suero nativo, obtenido directamente a partir de leche descremada, concentrado (wPC), aislado (wPI) e hidrolizado (wPH) de proteínas de suero, microparticulado de proteínas individuales de suero, suero de manteca, permeado de suero y suero de quesería en polvo (Masotti y col., 2017). Las proteínas del suero son de elevado valor nutricional y, por este motivo, existe un creciente interés en su utilización como aditivo en suplementos nutricionales, cereales, fórmulas infantiles, bebidas y alimentos lácteos. En estos últimos, la utilización de subproductos de suero contribuye, en algunos casos, al rendimiento, textura y/o calidad de los productos (quesos y leches fermentadas) (Masotti y col.,

2017). La incorporación de suero o sus derivados a otros productos se realiza, en general, antes de la etapa fermentativa, por lo que debe prestarse especial atención al hecho de que pueden contener fagos en alta concentración. Los fagos son capaces de subsistir y multiplicarse en suero de quesería, alcanzando títulos de 10^9 UFP/ml luego de la elaboración (Atamer y col., 2009, 2011). Además, el título de los mismos puede aumentar en 1 orden logarítmico cuando el suero se concentra mediante centrifugación, filtración por membranas o secado *spray* (Samtlebe y col., 2017a). La problemática en relación con la presencia de fagos en productos lácteos en polvo (leche en polvo, suero en polvo, WPC y WPI) así como la caracterización de los mismos no ha recibido la debida atención sino hasta los últimos años (Wagner y col., 2017a, 2017b). La persistencia de fagos en el ambiente industrial y el volumen creciente de suero que se recicla y se incorpora en sus diferentes formas a los productos lácteos, puede derivar en un gran problema en términos económicos. Otro factor muy importante es, como ya ha sido mencionado anteriormente, que muchos fagos de BAL son capaces de sobrevivir a tratamientos de pasteurización. Más aún, en los últimos años se han encontrado fagos con muy elevada o incluso extrema termo estabilidad, muy probablemente asociada a la presión selectiva ejercida por el uso creciente de suero tratado térmicamente como ingrediente de la industria láctea (Samtlebe y col., 2015, 2017a, 2017b; Wagner y col., 2017a, 2017b). Recientemente, Wagner y col. (2017a) encontraron que los fagos específicos de BAL eran capaces de sobrevivir en títulos elevados luego de 4 años de almacenamiento, ya sea en suero en polvo o formulaciones de suero en polvo. La capacidad infectiva de estos fagos se mantuvo a pesar de las elevadas temperaturas alcanzadas durante la pasteurización del suero y el secado *spray*, y de las condiciones restrictivas existentes durante el almacenamiento (baja actividad de agua, elevada presión osmótica). En ese estudio, se monitoreó un total de 35 muestras (30 de suero en polvo y cinco de formulaciones de suero en polvo) en busca de fagos infectivos para *Strep. thermophilus*, *Lc. lactis* y *Leuc. (Leuc. mesenteroides y Leuc. pseudomesenteroides)*, los cuales pudieron ser aislados del 100, 50 y 40% de las muestras, respectivamente. La resistencia térmica de estos fagos fue investigada por Wagner y col. (2017b), quienes encontraron que la mayoría de los fagos de *Lc. lactis* (88%, 28 de 32) y *Leuc. pseudomesenteroides* (83%, 10 de 12) sobrevivieron a un tratamiento de 80°C durante 5 min. Más aún, el 16% de los fagos de *Lc. lactis* no pudo ser completamente inactivado luego de un tratamiento térmico de 95°C durante 1 min. Estos resultados confirmaron que los fagos aislados de suero y derivados de suero en polvo, deshidratados por secado *spray*, son significativamente más termo resistentes que aquellos aislados a partir de otras fuentes en la industria láctea.

La detección de fagos en suero de quesería y sus derivados (suero en polvo, WPC, WPI y permeado de suero) está siendo estudiada en el INLAIN debido a la demanda de la industria láctea que los utiliza como ingredientes para la obtención de diversos productos lácteos fermentados. Los resultados obtenidos, aún preliminares, están de acuerdo con los reportados previamente por grupos de investigación europeos, demostrando la presencia de fagos de BAL en suero, frecuentemente en títulos elevados.

Bacterias lisógenas

Los profagos se encuentran en la mayoría de las cepas comerciales usualmente utilizadas en la industria láctea (Zaburlin y col., 2017). Estudios recientes analizaron la presencia de profagos en cepas de lactobacilos del grupo *casei* (Mercanti y col., 2011; Zaburlin y col., 2017), evidenciándose la presencia de profagos o remanentes en los genomas del 92% de las cepas, mientras que el 71% contenía profagos completos e inducibles con mitomicina c. Cuando una cepa lisógena se encuentra bajo ciertas condiciones de estrés ambiental (calor, sales, antimicrobianos, escasez de nutrientes) se puede producir la liberación de los profagos que contiene, constituyendo un elevado riesgo debido a que pueden ser líticos frente a otras cepas utilizadas como fermento y, en estos casos, derivar en otra fuente de contaminación fágica. Además, los fagos temperados pueden perder sus genes de lisogenia y volverse virulentos para la propia cepa hospedadora. Si bien este fenómeno es inusual, debe ser considerado como una fuente extra de contaminación con fagos que aumenta el riesgo de infecciones (Samson y Moineau, 2013).

Estrategias de control de fagos en plantas lácteas

La erradicación de los fagos en los ambientes de la industria láctea es prácticamente imposible debido a diversas razones. En primer lugar, y como ya se mencionó, los fagos se encuentran naturalmente presentes en la leche cruda y de esta manera ingresan continuamente en la industria láctea. Además, son capaces de resistir los tratamientos térmicos aplicados más comúnmente durante los procesos industriales, se pueden diseminar entre distintas áreas de producción por vía aérea a través de salpicaduras y aerosoles, pueden persistir durante tiempos prolongados en la superficie de equipos y *biofilms*, así como también alcanzar altos títulos en el suero proveniente de la elaboración de quesos y otros efluentes industriales. Por todo

lo expuesto, resulta necesaria la aplicación de estrategias que deben dirigirse a reducir los niveles de fagos presentes y minimizar su diseminación en las plantas lácteas. Las estrategias aplicadas en este sentido, que serán discutidas en detalle a continuación, pueden ser de naturaleza física (calor, filtración, uso de altas presiones, radiación UV, tratamientos de electro-impulso), química (biocidas) o biológica (rotación de cepas, uso de cepas con fagorresistencia mejorada).

Diseño de la planta e higiene

Entre los factores clave para reducir la proliferación fágica en una planta industrial encontramos el diseño de la planta láctea, la aplicación de medidas higiénicas adecuadas, la limpieza regular del equipamiento y un flujo de aire adecuado. En primer lugar, el personal de la planta debe ser entrenado para aplicar correctamente los procedimientos de control de fagos. Por su parte, la planta debería ser diseñada contemplando la minimización del riesgo de contaminación cruzada entre los diferentes sectores, usando áreas separadas físicamente para cada proceso. Como ejemplo, las zonas donde se manipulan medios de cultivos deberían estar distanciadas de aquellas que manejan subproductos de fermentación (Briggiler Marcó y col., 2012). Entre los sanitizantes que comúnmente se utilizan en la industria láctea para la limpieza de equipos, cañerías y laboratorios, el ácido peracético ha demostrado buena eficiencia en la remoción de partículas fágicas infectivas, llegando a niveles no detectables luego de 5 minutos de tratamiento usando la concentración de producto recomendada por el fabricante (0,15% v/v). La misma eficiencia se observó para algunos productos de amonio cuaternario y biocidas con pH extremo tales como la espuma de cloro alcalina (pH 12,7) o el nonilfenoletoxilado con ácido fosfórico (pH 1,7) (Ebrecht y col., 2010; Mercanti y col., 2012; Pujato y col., 2014). En este sentido, es importante considerar que los fagos son usualmente muy sensibles a condiciones ácidas (pH < 4) o alcalinas (pH > 11). Comparativamente, el hipoclorito de sodio, el etanol y el isopropanol, ensayados en numerosos estudios independientes, no han demostrado buena capacidad para reducir el número de partículas fágicas infectivas. En particular, el hipoclorito de sodio ha demostrado ser efectivo sólo a concentraciones mayores al límite máximo admitido en la industria de alimentos (200 ppm) (Mercanti y col., 2012; Pujato y col., 2014). En referencia a la presencia de fagos en el aire, Atamer y col. (2012) reportaron recuentos cercanos a 10^8 UFP/m³, resaltando así la necesidad de limitar lo máximo posible la generación de bioaero-

les. Otra medida tendiente a colaborar en la disminución de la carga viral en el aire de la planta sería someterlo a un proceso de filtración. Asimismo, los sectores de preparación de cultivos iniciadores deberían estar aislados y contar con un sistema de presión positiva de aire para evitar la llegada de un flujo de aire con elevada carga fágica. Por otro lado, la fotocatalisis, un proceso que emplea radiación UV en combinación con TiO_2 como catalizador y que ha demostrado una buena eficiencia en la inactivación de bacterias, esporos, hongos y virus (tanto en medio líquido como en fase gaseosa), podría emplearse para reducir la carga fágica (Kakita y col., 2000; Ditta y col., 2008). En este sentido, el fago PL-1, de *Lactobacillus casei*, fue inactivado eficientemente en medio líquido cuando fue sometido a radiación UV-A en presencia de TiO_2 (Kakita y col., 2000). De manera similar, Briggiler Marcó y col. (2009, 2011) lograron la eficiente inactivación de diversos fagos de BAL presentes en bioaerosoles simulados mediante un reactor fotocatalítico (UV-A/ TiO_2) a escala laboratorio. Más recientemente, el mismo grupo de trabajo diseñó un reactor a escala semipiloto para estudiar la inactivación de fagos contenidos en una corriente gaseosa (Briggiler Marcó y col., 2018). Empleando dicho reactor se lograron reducciones de 2,7 órdenes logarítmicos en el número de fagos infectivos, luego de solo 1 h de tratamiento.

Manejo adecuado de la leche cruda, ingredientes y subproductos

En general, la leche cruda es recolectada y enfriada para prevenir el desarrollo bacteriano, manteniéndose en estas condiciones hasta la aplicación del proceso de pasteurización (u otro tratamiento térmico), inmediatamente luego de su arribo y descarga en plantas lácteas. Estas medidas apuntan a eliminar microorganismos patógenos y reducir significativamente las concentraciones de bacterias alterantes, pero indirectamente ayudan también a bajar la carga de fagos. Con este último objetivo, los tratamientos térmicos continúan siendo los más comúnmente aplicados. No obstante, muchos fagos sobreviven la pasteurización e incluso tratamientos térmicos más severos. Este fenómeno parece haber cobrado especial importancia en los últimos años, probablemente como consecuencia de la aplicación, en la actualidad, de combinaciones tiempo/temperatura más enérgicas, lo cual ha favorecido la selección y prevalencia de fagos con resistencia térmica cada vez mayor.

Aunque se encuentren en bajos títulos en la leche antes de un tratamiento térmico, los fagos con elevada termorresistencia pueden propagarse hasta alcanzar títulos de 10^8 – 10^9 UFP/ml durante la etapa de fermentación si encuentran una cepa bacteriana sensible. La presencia de altos

niveles de fagos termorresistentes ha sido reportada en numerosos subproductos, siendo los principales el suero y las formulaciones de suero, que comúnmente se agregan como ingredientes en procesos lácteos con el objetivo de aumentar el valor nutricional y rendimiento del producto, pero también en salmuera y crema de leche (Briggiler Marcó y col., 2012). Por esta razón, el reciclaje de cualquiera de estos subproductos para ser agregados en otro proceso antes de una etapa de fermentación debe evitarse, a menos que se tomen medidas efectivas para la remoción de fagos. Así, resulta necesario aplicar tratamientos con el objetivo de disminuir la carga viral en estos subproductos. Tal como se explicó más arriba, el calor no resulta ser una herramienta segura para la eliminación de fagos. Además, el calentamiento suele ser poco enérgico para evitar efectos negativos en las propiedades funcionales de las proteínas de suero nativas, que representan el componente más valioso del suero pero son muy sensibles al calor. En cuanto al secado *spray* convencional del suero (y otros productos y subproductos lácteos), si bien presenta muchas ventajas tecnológicas y económicas (Písecký, 2005), no garantiza un control eficiente de los fagos. Esto puede explicarse por el hecho de que, si bien las temperaturas de entrada de aire caliente alcanzan los 180–200 °C, el agua se evapora muy rápidamente durante el proceso, produciendo un enfriamiento repentino que lleva a las gotas de suero a alcanzar temperaturas internas de 60 °C o aun menores (Wagner y col., 2017b). Sobre la base de la elevada resistencia a los tratamientos térmicos evidenciada por los fagos en los últimos años, en la industria láctea se ha prestado notable atención a metodologías alternativas de inactivación, tales como la filtración por membranas. Específicamente, con respecto al proceso de ultrafiltración del suero, el cual se utiliza para retener y concentrar las proteínas para comercializarlas posteriormente como WPC, el mismo presenta como inconveniente que, al mismo tiempo, también son retenidos los fagos cuando se usan membranas con un *cut-off* de 20 kDa. Esto se debe a que los viriones tienen un tamaño algo mayor al de las moléculas de proteínas de suero aisladas. Recientemente, se han logrado avances importantes en el estudio de la eficiencia de la filtración de suero de quesería a través de diferentes tipos de membranas, de modo de disminuir su carga fágica sin comprometer el valor nutricional debido a la pérdida de proteínas solubles (Samtlebe y col., 2015, 2017a, 2017b). Samtlebe y col. (2015) optimizaron un proceso de filtración por membranas de flujo cruzado, de modo de encontrar el mejor balance entre un buen permeado de la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, las proteínas mayoritarias del suero, y una elevada retención de fagos. En dicho estudio, la mejor relación (elevada retención del fago

de lactococos 0008 con respecto al permeado de las proteínas de suero) se obtuvo cuando se empleó una membrana de poliéter sulfona con un *cut-off* de 300 kDa, mientras que una membrana con un *cut-off* de 100 kDa retuvo demasiadas proteínas, y otra con un *cut-off* de 500 kDa permitió un elevado pasaje de fagos a través de la misma. Posteriormente, Samtlebe y col. (2017b) determinaron la influencia del tamaño y forma de fagos de lactococos, así como el efecto del agregado de bacterias sensibles tratadas bajo diferentes condiciones, en su retención a través de membranas de poliéter sulfona. No se observó una correlación clara entre morfología y capacidad de retención para los diferentes fagos, pero la presencia de bacterias sensibles alteradas mecánicamente mejoró significativamente la retención de los fagos. Samtlebe y col. (2017a) filtraron suero de quesería a través de membranas cerámicas de 0,1 μm con un diseño tubular, tanto a escala laboratorio como planta piloto. Los resultados obtenidos fueron mucho mejores a escala planta piloto, tanto en lo que respecta a la reducción de fagos como al permeado de proteínas, lo cual se atribuyó al gradiente de permeabilidad longitudinal que no se encuentra presente en los sistemas de membranas a escala laboratorio. En resumen, es conveniente usar una combinación de tecnologías, cada una de ellas con una intensidad moderada, en lugar de realizar tratamientos únicos pero muy violentos, lo cual aumenta el riesgo de daño y/o pérdida significativa de funcionalidad de las proteínas de suero.

Más allá de las tecnologías discutidas para reducir la contaminación con fagos, hay algunas reglas básicas y generales que deben ser tenidas siempre en mente para lograr un control eficiente. Un ejemplo, conceptualmente sencillo, sería que cuando se recicle el suero proveniente de un proceso que involucra un tipo de cultivo iniciador determinado (por ejemplo, bacterias termófilas), sea adicionado solamente a procesos que no conlleven un proceso de fermentación, o bien que este sea llevado a cabo por bacterias no relacionadas (por ejemplo, bacterias mesófilas). Por otro lado, las tinas en las cuales se elaboran quesos usando cultivos de adición directa (*Direct Vat Set*, DVS) nunca deberían entrar en contacto con sueros provenientes de elaboraciones hechas con fermentos naturales, ya que estos últimos poseen una diversidad de fagos muy grande, poniendo en alto riesgo a las pocas cepas presentes en los cultivos DVS seleccionados. Finalmente, el agua que se utiliza para el procesamiento industrial de productos lácteos, debería ser siempre segura desde el punto de vista microbiológico, no sólo en cuanto a la ausencia de microorganismos sino también de partículas virales.

Correcta selección y uso de cultivos iniciadores

Los cultivos de BAL usados para la manufactura de quesos pueden estar compuestos por un número discreto de cepas definidas (cultivos comerciales seleccionados) o por un ecosistema natural compuesto por una gran diversidad microbiana (cultivos naturales) (Spus y col., 2015). En estos últimos, la microbiota dominante está compuesta por cepas de bacterias lácticas que actuarán como cultivos iniciadores del proceso fermentativo (Powell y col., 2011). La elevada biodiversidad de los cultivos iniciadores naturales produce quesos con sabores y aromas similares a aquellos hechos a partir de leche cruda, y hace que los cultivos sean altamente resistentes a las infecciones fágicas, ya que las poblaciones de bacterias y fagos coexisten en un ambiente compartido y autorregulado (Spus y col., 2015). En Canadá, muchos quesos Cheddar de larga maduración se elaboran con estos fermentos, dado que los cultivos comerciales seleccionados no han logrado reproducir la calidad y las características organolépticas esperadas. Sin embargo, la composición y actividad variables de estos fermentos no permiten controlar parámetros clave durante las fermentaciones lácteas, siendo el motivo principal por el cual han sido progresivamente reemplazados por cultivos DVS. Los cultivos DVS contienen pocas cepas seleccionadas que producen ácido láctico a partir de lactosa a una velocidad controlada y predecible, dando como resultado productos con características homogéneas a lo largo del tiempo, disminuyendo además el riesgo de aparición de contaminaciones no controladas. La selección correcta de cepas para los cultivos DVS es un proceso largo y complejo, que se basa en criterios microbiológicos, bioquímicos y tecnológicos, los cuales dependerán del producto específico a elaborar. Como los cultivos DVS contienen un escaso número de cepas, si existen fagos específicos contra las mismas, ya sea en la leche cruda o pasteurizada, en la superficie de equipos o en el ambiente de la planta láctea, las infecciones pueden volverse evidentes rápidamente (Verreault y col., 2011). En consecuencia, la fagorresistencia se vuelve uno de los principales criterios de selección de cepas a ser incluidas en los cultivos DVS.

La rotación de cultivos es otra alternativa simple para reducir las propagaciones fágicas a través de elaboraciones de quesos sucesivas (Mahony y col., 2013). Las cepas rotadas en tales esquemas deben poseer una actividad acidificante similar, pero perfiles de resistencia a fagos diferentes, y no deberían contener profagos inducibles en su genoma. Sin embargo, esta estrategia no es válida en el caso de las bacterias probióticas, ya que las mismas poseen características únicas y no pueden ser reemplazadas fácilmente (Capra y Mercanti, 2012). Algunas cepas de BAL son naturalmente resistentes a fagos

por medio de diversos mecanismos, tales como la inhibición de la adsorción, bloqueo de la inyección de ADN, sistemas de restricción/modificación, infección abortiva (*Abortive Infection*, Abi) y sistemas CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (Moineau y Lévesque, 2005; Doron y col., 2018). En este sentido, varios estudios describen el aislamiento de cepas mutantes resistentes a fagos (Bacteriophage Insensitive Mutants, BIMs) a partir de cepas sensibles de *Strep. thermophilus*, *Lactococcus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus*, *Leuc. mesenteroides* y *Leuc. pseudomesenteroides*, con adecuadas características tecnológicas además de su fagorresistencia (Guglielmotti y col., 2007; Briggiler Marcó y col., 2014; Pujato y col., 2018). En las dos últimas décadas se ha revelado el rol esencial que juegan los sistemas CRISPR en la generación de BIMs de *Strep. thermophilus* (Mills y col., 2010; Hynes y col., 2016), lo cual sentaría las bases para la producción de BIMs de grado alimentario como cultivos iniciadores para la industria láctea. Este sistema permite obtener BIMs naturalmente, luego de enfrentar cepas sensibles con fagos virulentos (de Melo y col., 2018). Sin embargo, actualmente se ha mejorado mucho la investigación de los sistemas CRISPR, al punto de que es posible obtener BIMs resistentes a múltiples fagos en un ensayo rápido y único, mediante la programación de los sistemas CRISPR-Cas (McDonnell y col., 2018). La creación de bancos de BIMs derivados de la misma cepa sensible original pero con fagorresistencia mejorada y diversificada, podría utilizarse para la aplicación de esquemas de rotación de cultivos (Mills y col., 2010). Con este objetivo, el grupo DuPont™ (DuPont Nutrition Biosciences APS) subsidió estudios sobre la generación de BIMs basados en CRISPR, obteniendo finalmente una patente europea (EP 2325332 B1, European Patent Specification, 31.10.2012 Bulletin 2012/44) (Barrangou y Horvath, 2012). Otro desarrollo basado en CRISPR ofrece cultivos iniciadores compuestos por una combinación de cepas de *Strep. thermophilus* para la elaboración de queso para pizza (CHOOZIT™ SWIFT, DUPONT™) (Barrangou y Horvath, 2012). Además, la rotación de las cepas que fueron obtenidas mediante esta tecnología podría extenderse a los cultivos probióticos, siempre que los genomas no sufran ningún cambio por fuera de la región CRISPR que pudiera alterar la actividad funcional de la cepa.

No obstante los grandes avances en la obtención de cepas de BAL mediante ingeniería genética (tecnología de ARN antisentido, clonado del origen de replicación, fragmentos de anticuerpos neutralizantes, sistemas suicidas activados por fagos, sobreproducción de proteínas fágicas) (Samson y Moineau, 2013), existen aún muchas barreras legales que deberían ser resueltas antes de poder usar de manera irrestricta organismos genéticamente modificados en alimentos.

Referencias bibliográficas

- Atamer, Z.; Ali, Y.; Neve, H.; Heller, K.J. y Hinrichs, J. (2011).** Thermal resistance of bacteriophages attacking flavour-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. *International Dairy Journal*, 21, 327–334.
- Atamer, Z.; Dietrich, J.; Müller-Merbach, M.; Neve, H.; Heller, K.J. y Hinrichs, J. (2009).** Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *International Dairy Journal*, 19, 228–235.
- Atamer, Z.; Neve, H.; Heller, K. y Hinrichs, J. (2012).** Thermal resistance of bacteriophages in the dairy industry. En: Quiberoni, A. y Reinheimer, J. (Eds.). *Bacteriophages in dairy processing*. New York, USA: Nova Science Publishers, 195–214.
- Atamer, Z.; Samtlebe, M.; Neve, H., K; J.H. y Hinrichs, J. (2013).** Review: elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Frontiers in Microbiology*, 4, art. 191.
- Barrangou, R. y Horvath, P. (2012).** CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 143–162.
- Briggiler Marcó, M.; De Antoni, G.; Reinheimer, J. y Quiberoni, A. (2009).** Thermal, chemical, and photocatalytic inactivation of *Lactobacillus plantarum* bacteriophages. *Journal of Food Protection*, 72, 1012–1019.
- Briggiler Marcó, M.; Moineau, S. y Quiberoni, A. (2012).** Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*, 2, 149–158.
- Briggiler Marcó, M.; Negro, A.C.; Alfano, O.M. y Quiberoni, A. (2018).** New semi-pilot-scale reactor to study the photocatalytic inactivation of phages contained in aerosol. *Environmental science and pollution research international*, 25(22), 21385–21392.
- Briggiler Marcó, M.; Quiberoni, A.L.; Negro, A.C.; Reinheimer, J.A. y Alfano, O.M. (2011).** Evaluation of the photocatalytic inactivation efficiency of dairy bacteriophages. *Chemical Engineering Journal*, 172, 987–993.
- Briggiler Marcó, M.; Zacarías, M.F.; Vinderola, G.; Reinheimer, J.A. y Quiberoni, A. (2014).** Biological and probiotic characterisation of spontaneous phage-resistant mutants of *Lactobacillus plantarum*. *International Dairy Journal*, 39, 64–70.
- Capra, M.L. y Mercanti, D. (2012).** Lysogeny in probiotic lactobacilli. En Quiberoni, A. y Reinheimer, J. (Eds.). *Bacteriophages in dairy processing*. New York, USA: Nova Science Publishers, 123–148.
- Capra, M.L.; Neve, H.; Sorati, P.C.; Atamer, Z.; Hinrichs, J.; Heller, K.J. y Quiberoni, A. (2013).** Extreme thermal resistance of phages isolated from dairy samples: Updating traditional phage detection methodologies. *International Dairy Journal*, 30, 59–63.
- De Melo, A.G.; Lévesque, S. y Moineau, S. (2018).** Phages as friends and enemies in food processing. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 185–190.
- Del Río, B.; Binetti, A.; Martín, M.; Fernández, M.; Magadán, A. y Alvarez, M. (2007).** Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiology*, 24, 75–81.
- Ditta, I.B.; Steele, A.; Liprot, C.; Tobin, J.; Tyler, H.; Yates, H.M.; Sheel, D.W. y Foster, H.A. (2008).** Photocatalytic antimicrobial activity of thin surface films of TiO₂, CuO and TiO₂/CuO dual layers on *Escherichia coli* and bacteriophage T4. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 127–133.
- Doron, S.; Melamed, S.; Ofir, G.; Leavitt, A.; Lopatina, A.; Keren, M.; Amitai, G. y Sorek, R. (2018).** Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*, 359(6379), eaar4120.
- Ebrecht, A.; Guglielmotti, D.; Tremmel, G.; Reinheimer, J. y Suárez, V. (2010).** Temperate and virulent *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages: comparison of their thermal and chemical resistance. *Food Microbiology*, 27, 515–520.
- Émond, E. y Moineau, S. (2007).** Bacteriophages in food fermentations. En: McGrath, S. y van Sinderen, D. (Eds.). *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. Wymondham, Reino Unido: Caister Academic Press, 93–123.
- Guglielmotti, D.; Briggiler Marcó, M.; Vinderola, C.; de Los Reyes Gavilán, C.; Reinheimer, J. y Quiberoni, A. (2007).** Spontaneous *Lactobacillus delbrueckii* phage-resistant mutants with acquired bile tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 236–242.

- Hynes, A.P.; Labrie, S.J. y Moineau, S. (2016).** Programming Native CRISPR arrays for the generation of targeted immunity. *mBio*, 7(3), e00202–16.
- Kakita, Y.; Obuchi, E.; Nakano, K.; Murata, K.; Kuroiwa, A.; Miake, F. y Watanabe, K. (2000).** Photocatalytic inactivation of *Lactobacillus* PL-1 phages by a thin film of titania. *Biocontrol Science*, 5, 73–79.
- Madera, C.; Monjardín, C. y Suárez, J. (2004).** Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7365–7371.
- Mahony, J.; Kot, W.; Murphy, J.; Ainsworth, S.; Neve, H.; Hansen, L.H.; Heller, K.J.; Sorensen, S.J.; Hammer, K.; Cambillau, C.; Vogensen, F.K. y van Sinderen, D. (2013).** Investigation of the relationship between lactococcal host cell wall polysaccharide genotype and 936 phage receptor binding protein phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 4385–4392.
- Masotti, F.; Cattaneo, S.; Stuknytė, M. y De Noni, I. (2017).** Technological tools to include whey proteins in cheese: Current status and perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 102–114.
- McDonnell, B.; Mahony, J.; Hanemaaijer, L.; Kouwen, T. y van Sinderen, D. (2018).** Generation of bacteriophage-insensitive mutants of *Streptococcus thermophilus* via an antisense RNA CRISPR-Cas silencing approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(4), e01733–17.
- Mercanti, D.J.; Carminati, D.; Reinheimer, J.A. y Quiberoni, A. (2011).** Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 503–510.
- Mercanti, D.J.; Guglielmotti, D.M.; Patrignani, F.; Reinheimer, J.A. y Quiberoni, A. (2012).** Resistance of two temperate *Lactobacillus paracasei* bacteriophages to high pressure homogenization, thermal treatments and chemical biocides of industrial application. *Food Microbiology*, 29, 99–104.
- Mills, S.; Griffin, C.; Coffey, A.; Meijer, W.C.; Hafkamp, B. y Ross, R.P. (2010).** CRISPR analysis of bacteriophage-insensitive mutants (BIMs) of industrial *Streptococcus thermophilus*—implications for starter design. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 945–955.
- Moineau, S. y Lévesque, C. (2005).** The control of bacteriophages in industrial fermentations. En: Kutter, E. y Sulakvelidze, A. (Eds.). *Bacteriophages: Biology and applications*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 285–296.
- Písecký, J. (2005).** Spray drying in the cheese industry. *International Dairy Journal*, 15, 531–536.
- Powell, I.; Broome, M. y Limsowtin, G. (2011).** Cheese starter cultures: general aspects. En: Fuquay, J.W., Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (Eds.). *Encyclopedia of dairy sciences*. San Diego, USA: Academic Press, 552–558.
- Pujato, S.A.; Guglielmotti, D.M.; Ackermann, H.-W.; Patrignani, F.; Lanciotti, R.; Reinheimer, J.A. y Quiberoni, A. (2014).** *Leuconostoc* bacteriophages from blue cheese manufacture: long-term survival, resistance to thermal treatments, high pressure homogenization and chemical biocides of industrial application. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 81–88.
- Pujato, S.A.; Quiberoni, A. y Guglielmotti, D.M. (2018).** Technological performance of spontaneous phage-resistant derivatives of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 78, 46–52.
- Samson, J.E. y Moineau, S. (2013).** Bacteriophages in food fermentations: new frontiers in a continuous arms race. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 347–368.
- Samtlebe, M.; Wagner, N.; Neve, H.; Heller, K.J.; Hinrichs, J. y Atamer, Z. (2015).** Application of a membrane technology to remove bacteriophages from whey. *International Dairy Journal*, 48, 38–45.
- Samtlebe, M.; Wagner, N.; Brinks, E.; Neve, H.; Heller, K.J.; Hinrichs, J. y Atamer, Z. (2017a).** Production of phage free cheese whey: Design of a tubular laboratory membrane filtration system and assessment of a feasibility study. *International Dairy Journal*, 71, 17–23.
- Samtlebe, M.; Wagner, N.; Neve, H.; Heller, K.J.; Hinrichs, J. y Atamer, Z. (2017b).** Reduction of *Lactococcus lactis* phage contamination in whey by means of membrane filtration: Impact of phage morphology and of bacterial host cells functioning as «phage fishing tool». *International Dairy Journal*, 68, 88–94.

- Spus, M.; Li, M.; Alexeeva, S.; Wolkers-Rooijackers, J.C.M.; Zwietering, M.H., Abee, T. y Smid, E.J. (2015).** Strain diversity and phage resistance in complex dairy starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 98, 5173–5182.
- Tayyarcan, E.K.; Acar Soykut, E. y Boyaci, I.H. (2018).** A Raman-spectroscopy-based approach for detection and discrimination of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* phages at low titer in raw milk. *Folia Microbiologica*, 63, 627–636.
- Verreault, D.; Gendron, L.; Rousseau, G.; Veillette, M.; Masse, D.; Lindsley, W.; Moineau, S. y Duchaine, C. (2011).** Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 491–497.
- Wagner, N.; Brinks, E.; Samtlebe, M.; Hinrichs, J.; Atamer, Z.; Kot, W.; Franz, C.M.A.P.; Neve, H. y Heller, K.J. (2017a).** Whey powders are a rich source and excellent storage matrix for dairy bacteriophages. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 308–317.
- Wagner, N.; Samtlebe, M.; Franz, C.M.A.P.; Neve, H.; Heller, K.J.; Hinrichs, J. y Atamer, Z. (2017b).** Dairy bacteriophages isolated from whey powder: Thermal inactivation and kinetic characterisation. *International Dairy Journal*, 68, 95–104.
- Wagner, N.; Matzen, S.; Walte, H.-G.; Neve, H.; Franz, C.M.A.P.; Heller, K.J. y Hammer, P. (2018).** Extreme thermal stability of *Lactococcus lactis* bacteriophages: Evaluation of phage inactivation in a pilot-plant pasteurizer. *LWT*, 92, 412–415.
- Zaburlin, D.; Mercanti, D.J. y Quiberoni, A. (2017).** A fast PCR-based method for the characterization of prophage profiles in strains of the *Lactobacillus casei* group. *Journal of virological methods*, 248, 226–233.

10. Lechería ovina y producción de quesos como alternativa innovadora y generadora de alto valor agregado

Carlos Meinardi, Mario Candiotti, Silvina Rebechi,
Facundo Cuffia, Carina Bergamini y Susana Palma

Lechería ovina en Argentina

A diferencia de lo que ocurre en otros países del mundo, donde la producción de leche de oveja es una práctica milenaria, en Argentina se puede decir que se trata de una actividad incipiente y que en ocasiones pierde rentabilidad por falta de conocimientos. A esto se suman algunas cuestiones que restringen el potencial que entraña un rebaño ovino, como ser la notable heterogeneidad en los planteles con que se opera los que, además de no estar formados por una raza definida, poseen un limitado nivel de productividad, o bien el obsoleto criterio que aún persiste en muchos establecimientos de considerar que la leche de oveja solo puede ser destinada a la alimentación de sus crías (Meinardi y col., 2012). En estas condiciones, la leche producida es escasa y se destina mayoritariamente a la elaboración de quesos artesanales que muy a menudo no poseen una óptima calidad (Bain, 2007).

Esta realidad se contrapone con lo que sucede a escala mundial donde en países como Italia, Grecia, España, Rumania, Francia, Turquía, Siria e Irán, entre otros, la lechería ovina está muy desarrollada. En estos países se pueden encontrar los quesos de oveja más famosos del mundo, como por

ejemplo el Pecorino Romano, el Fiore Sardo y el Pecorino Sardo en Italia, el Feta y el Teleme en Grecia, el Manchego y el Idiazábal en España y el Roquefort en Francia, productos todos amparados por la Denominación de Origen Controlada (DOC) (Ottogalli, 2005). En la Tabla 1 se presentan algunos de los principales quesos de leche de oveja elaborados en distintos países, indicando el tipo de consistencia y las características globales de su composición.

Tabla 1. Contenido promedio (% p/p) de materia grasa, proteínas, calcio y fósforo en quesos de oveja de diferentes países (Ramos y Juárez, 2011)

País	Nombre	Tipo de queso	Materia Grasa	Proteína	Calcio	Fósforo
Bulgaria	Kaschkaval	Pasta hilada	45	20	–	–
Chipre	Halloumi	Madurado en salmuera	48	24	–	–
Francia	Roquefort	Varietad azul	50	21	0,62	0,42
Grecia	Feta	Madurado en salmuera	40	18	0,65	0,40
Italia	Pecorino	Duro	42	29	0,40	0,32
Portugal	Serra da Estrela	Semiduro	56	26	0,65	0,53
Rumania	Teleme	Madurado en salmuera	50	18	0,53	0,40
España	Manchego	Semiduro	50–65	23	0,68	0,54

Según recientes registros, en nuestro país el ganado ovino cuenta con más de 15 millones de animales (Mueller, 2013). De estos, se estima que existen unas 4 000 ovejas en ordeño, distribuidas en unos 45 tambos que producen anualmente alrededor de 500 000 litros de leche, lo que permite elaborar aproximadamente 91 000 kg de quesos (Buseti y Suárez, 2009). Muchos de estos quesos fueron desarrollados sobre la base del aporte realizado por expertos europeos, fundamentalmente italianos, quienes trajeron la tecnología utilizada en su región incluyendo el nombre que, en muchos casos, pertenecía a quesos protegidos por la Denominación de Origen. Esto propició la adopción de metodologías que frecuentemente no eran las más adecuadas para las características de la leche que se disponía. En efecto, las diferencias atribuibles a la genética de los planteles, la región de cría, las pasturas y, fundamentalmente, a la escasa tradición en el manejo de los rebaños para la producción de leche, imponen la adopción de metodologías adecuadas a cada caso. Sin embargo, para cuando se comenzaron a visualizar estos problemas, la situación económica del país había cambiado y resultaba muy costoso traer expertos extranjeros. En este contexto, fueron muy pocos los establecimientos que tuvieron la capacidad de adaptar la tecnología a las característi-

cas de su materia prima para obtener quesos de calidad, con un valor acorde a los costos de producción. Las empresas que no lograron alcanzar esta meta se vieron obligadas a cerrar o bien a volcarse a otras producciones.

En la provincia de Santa Fe, parte importante de la región agrícola-ganadera e industrial de la Argentina, se concentran grandes extensiones de territorio que son explotadas principalmente por pequeñas y medianas empresas, para quienes la producción ovina representa un rubro más, orientado fundamentalmente a la comercialización de corderos jóvenes para consumo cárnico en el mercado interno. Ante esta situación, desde la Universidad Nacional del Litoral se iniciaron acciones tendientes a impulsar el desarrollo e investigación de la lechería ovina.

Características de la leche ovina

En general, las leches no tradicionales están asociadas a economías regionales, pequeñas escalas de elaboración artesanal de productos de elevado valor agregado. En este sentido, la leche ovina ocupa un lugar preponderante por cuanto constituye una excelente fuente de proteínas, calcio, fósforo y lípidos que, además, aporta vitaminas, macrominerales y oligoelementos, los que actúan como cofactores de numerosas enzimas. En comparación con la leche bovina, la leche de oveja puede ser considerada como un producto naturalmente concentrado, puesto que contiene mayores niveles de sólidos totales y nutrientes indispensables que le confieren, entre otras cosas, una mayor viscosidad y resistencia a la proliferación bacteriana tras el ordeño, debida a su elevada actividad inmunológica (Ramos y Juárez, 2011).

En la Tabla 2 se muestran los valores de composición global típica para leche de oveja y de vaca.

Tabla 2. Composición global de leche de oveja y de vaca. Los valores están expresados en g/100 mL de leche¹

Especie	Sólidos totales	Materia grasa	Proteínas	Lactosa	Cenizas	Agua
Ovina	19,30	7,40	4,50	4,80	1,00	80,7
Bovina	12,70	3,70	3,40	4,80	0,70	87,3

¹ Valores medios obtenidos a partir de diferentes fuentes.

Es importante destacar que la composición de la leche de oveja cambia durante el período de ordeño (que se extiende desde octubre a mayo) dado que se va concentrando a medida que avanza el ciclo de lactación. Así, los sólidos totales aumentan desde ~16 % (p/v) a los 30–45 días después del parto (momento del destete de las crías e ingreso al tambor) hasta el ~26 % (p/v) al final de la lactación, con un valor promedio de 19,30 %. Esta tendencia se ve reflejada en los niveles de materia grasa y de proteínas, para los que se verifican incrementos del 5,45 al 11,20 % (p/v) y del 5,47 al 8,39 % (p/v), respectivamente, lo cual tiene un impacto directo en el rendimiento del proceso, tal como ha sido demostrado por Mercanti y col. (2008). Mediante un método rápido y sencillo estos autores realizaron una predicción del rendimiento caseario de 421 muestras individuales de leche de oveja de raza Pam-pinta (EEA INTA Anguil, La Pampa) provenientes del mismo rebaño, a tres tiempos distintos durante un período de lactación. Los resultados obtenidos, presentados en la Fig. 1, muestran que, si bien a los 108 días de lactación hubo un ligero incremento en el rendimiento quesero, este último fue muy superior hacia el final de la misma (213 días), en concordancia con el aumento en el contenido de materia grasa y caseína en las leches.

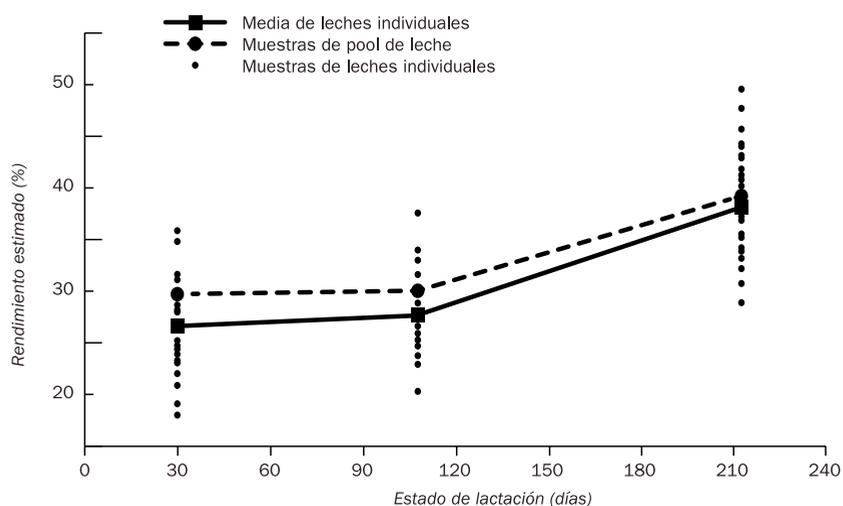


Figura 1. Rendimiento quesero (% p/p) durante el período de lactación estimado por un ensayo de predicción para muestras de leche provenientes de ovejas individuales del mismo rebaño (Mercanti y col., 2008)

Tecnología de elaboración de quesos

Existe una gran diversidad de tecnologías de elaboración de quesos con las que es posible obtener productos con características muy distintas, principalmente en lo atinente al tipo de pasta. En términos generales, puede decirse que cuando se desea fabricar quesos con pasta más o menos elástica, el proceso se debe orientar a la obtención de una cuajada predominantemente enzimática. Por esta razón, para garantizar el éxito de la elaboración es fundamental que tanto la formación del gel, la deshidratación y eventualmente la cocción del mismo, se realicen manteniendo un bajo nivel de acidez. Estas condiciones se logran cuando el desuerado precede a la acidificación, de modo que esta comience a manifestarse durante el moldeo, alcanzando su valor óptimo al finalizar el prensado. De esta forma, el grado de mineralización del gel obtenido y, consecuentemente su poder buffer, será el aconsejado para este tipo de quesos, con niveles superiores a los de una cuajada básicamente ácida.

Sobre la base de lo expuesto, en la Fig. 2 se presenta un diagrama de bloque de un proceso general de elaboración de queso semiduro (o semicocido), en el que se busca obtener una cuajada predominantemente enzimática.

Desarrollo de tecnologías de elaboración de quesos de oveja, tradicionales y probióticos

Desde la Universidad Nacional del Litoral se llevaron a cabo diversas acciones tendientes a impulsar el desarrollo e investigación de la lechería ovina. En primera instancia, en la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja (EAGYG), dependiente de las Facultades de Ciencias Agrarias y Ciencias Veterinarias, se comenzó con la instalación de un tambo ovino con el objetivo de generar una alternativa viable para mejorar la rentabilidad de las explotaciones agropecuarias que se desarrollan en pequeñas parcelas de tierra. Esta etapa concluyó con la puesta en marcha del primer tambo de ovejas en la Región Litoral, actualmente consolidado en el predio de la EAGYG.

La potencial disponibilidad de leche que conlleva la presencia de un tambo ovino despertó el interés de investigadores del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), por lo que comenzaron a desarrollarse proyectos de investigación relacionados a esta nueva materia prima y a los productos casearios derivados de la misma. A fin de conocer la composición y aptitud tecnológica de la leche producida por la EAGYG, se llevaron a cabo

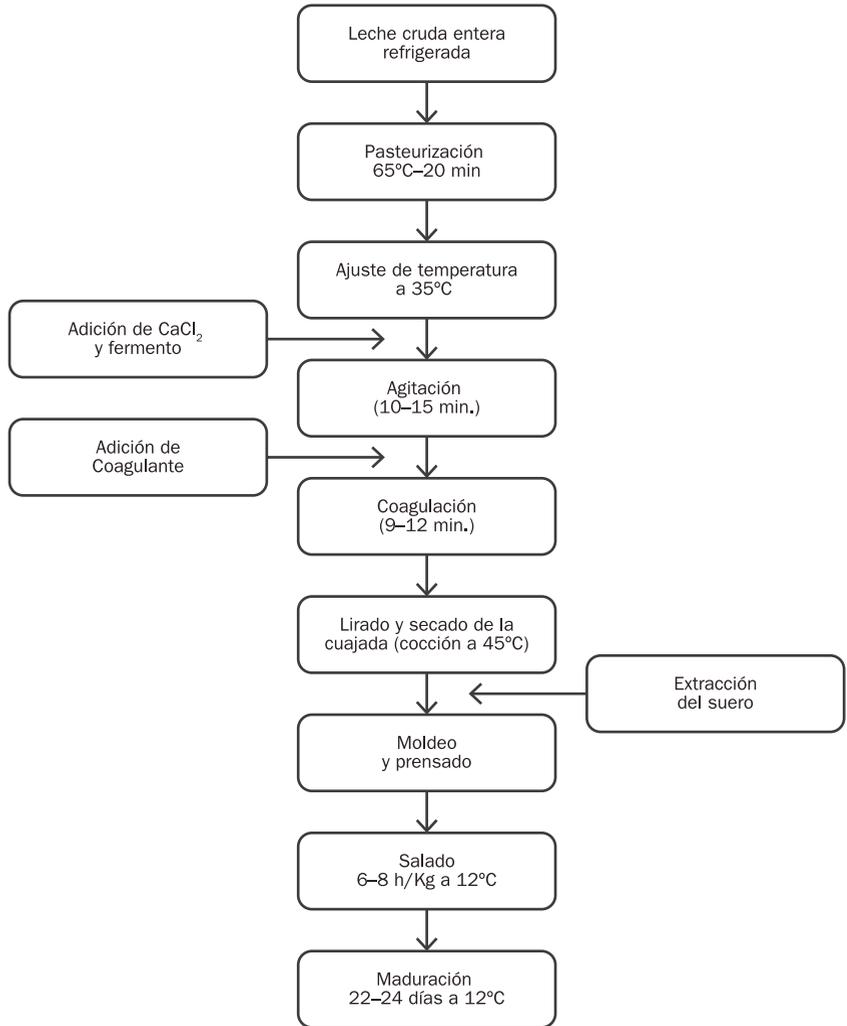


Figura 2. Diagrama de bloque para un proceso típico de elaboración de queso semiduro

estudios comparativos con la leche proveniente de ovejas Pampinta del tambo modelo ubicado en la Estación Experimental del INTA Anguil (La Pampa). A partir de ello, se desarrollaron tecnologías adaptadas a la producción de quesos de oveja con el objetivo de lograr productos nacionales típicos, de buena calidad y con características bien definidas. Teniendo en cuenta la disponibilidad estacional de la leche de oveja (solo se produce durante aproximadamente 6 meses al año), esta primera etapa estuvo orientada al desarrollo de dos tecnologías que, utilizando la misma leche, per-

mitieran elaborar quesos bien diferenciados y que pudieran ser obtenidos en cualquier época del año (Candiotti y col., 2009; Bergamini y col., 2010). Sobre esa base, se optimizaron dos protocolos:

a) Para la fabricación de quesos semiduros de corta maduración, que se pudieran consumir a los 40–45 días como «quesos de mesa». Este protocolo comprende una cocción suave de la cuajada en la tina y el empleo de un fermento primario compuesto exclusivamente por cepas de *Streptococcus thermophilus*, lo que permite obtener quesos con mayor contenido de humedad, de sabor suave y ligeramente ácido, cuyas características organolépticas óptimas se alcancen a los 45 d de elaboración.

b) Para la elaboración de quesos duros, con períodos de maduración más extensos, cercanos a los 6 meses. Para estos quesos se utilizó un fermento primario constituido por cepas de *Streptococcus thermophilus* y lactobacilos termófilos, y la cuajada fue reducida (por lirado) a granos de menor tamaño, los cuales fueron sometidos a una mayor temperatura de cocción. Bajo estas condiciones, se pudieron obtener quesos más secos, con un mayor nivel de proteólisis y acidez, textura más granulosa, y de sabor y aroma más intensos.

Frente a los logros alcanzados con la implementación del tambo ovino y los resultados obtenidos con las tecnologías diseñadas para la producción de quesos, la Secretaría de Vinculación Tecnológica de la UNL, con recursos propios y con la ayuda de proyectos nacionales, construyó una planta procesadora en dependencias de la EAGYG cuya función, además de tener una finalidad docente, permite mostrar a los emprendedores una unidad de producción de quesos de leche de pequeños rumiantes. Esta planta, inaugurada en septiembre del 2008, está habilitada para la fabricación y comercialización a nivel nacional de cinco tipos de quesos ovinos, inscriptos bajo la marca «De La Escuela».

Para diferenciarlos y darles una característica de tipicidad, sus nombres fueron tomados de vocablos de los pueblos originarios, antiguos habitantes de este territorio. A tal efecto, se adoptaron las siguientes denominaciones: *Arandu* (del guaraní que significa: «sabiduría»), para los quesos de humedad intermedia y baja; *Alhua* (del toba que significa: «tierra»), para el queso con pimienta; *Sayaten* (del toba que significa: «saber»), para el queso con nueces; y *Kamby* (del guaraní que significa: «leche»), para el queso de alta humedad.

En una etapa posterior, en un intento por acrecentar aún más el magnífico potencial que presentan los quesos de oveja, se comenzó a trabajar para hacer de estos un *alimento funcional*, es decir que, más allá de su calidad nutricional, provean al consumidor beneficios extras que contribuyan a mejorar su salud y reducir el riesgo de padecer enfermedades.

Con este propósito, en el INLAIN se estudió la forma más conveniente de enriquecer los quesos de oveja a través de la incorporación, como fermento secundario, de bacterias probióticas de probada idoneidad.

Para estas experiencias se adoptaron dos tipos de quesos (de aproximadamente 800 g/horma) elaborados con las tecnologías desarrolladas en el INLAIN ya mencionadas. En ambos casos se estudiaron, individualmente, dos cultivos adjuntos, probióticos comerciales: *Bifidobacterium bifidum* BB12 y *Lactobacillus acidophilus* LA5. Los quesos se maduraron durante 45 días a 12 °C y 85% de humedad relativa. Durante dicho período, en los quesos semiduros el probiótico BB12 exhibió un buen nivel de supervivencia mientras que el LA5 mostró una disminución de su viabilidad de un orden logarítmico. Por otra parte, en los quesos que por su fermento y tecnología aplicada, se asemejaban a quesos duros, la viabilidad de los dos probióticos se mantuvo a lo largo de los 45 días de maduración. El análisis sensorial realizado por un panel entrenado, si bien evidenció ligeras diferencias entre los quesos experimentales elaborados con bacterias probióticas, concluyó que todos ellos presentaron excelentes características organolépticas (Zalazar y col., 2010; Palma y col., 2011; Perotti y col., 2011; Cuffia y col., 2018).

Más recientemente, con el objetivo de mejorar y estandarizar la calidad de estos productos, se comenzó a trabajar en el desarrollo de un fermento natural. Para ello, el estudio se orientó hacia la obtención de una leche fermento (LF), que es uno de los fermentos naturales más antiguos utilizados en la elaboración de quesos. Si bien actualmente en las grandes industrias la LF se ha ido reemplazando por fermentos comerciales (desarrollados para leche bovina), para las pequeñas industrias continúa siendo una alternativa interesante debido a que presenta una buena resistencia a bacteriófagos, es de bajo costo y los quesos elaborados con ella exhiben características sensoriales imposibles de reproducir mediante fermentos comerciales.

Para estas experiencias, la LF fue obtenida a partir de leche de oveja por selección térmica (10 min a 62 °C) y posterior incubación a 42 °C por aproximadamente 2,5 h. Este fermento tuvo un valor medio de pH igual a $4,90 \pm 0,16$ y una acidez Dornic de $90,0 \pm 15,4^{\circ}D$, y su análisis microbiológico arrojó los siguientes resultados: gérmenes totales 10^9 UFC/mL, contaminantes (coliformes, mohos y levaduras) < 10 UFC/mL y enterococos < 10 UFC/mL (Suárez y col., 2013). Los estudios se realizaron en quesos de aproximadamente 700 – 800 g a los que se maduró durante 120 días en cámara a 12 °C y 85% de humedad relativa.

Los resultados obtenidos demostraron que mediante el empleo de fermentos naturales es posible obtener quesos con una calidad sensorial constante a lo largo de todo el período de lactación, lo cual no se pudo lograr

utilizando fermentos comerciales. Asimismo, el análisis sensorial, a cargo de un panel entrenado, reveló que los quesos elaborados con LF presentaron un flavor residual amargo, picante y salado en intensidad muy baja, que las puso por encima de los elaborados con fermentos comerciales (Rebechi y col., 2013, 2014).

Como colofón puede decirse que, más allá de la riqueza composicional que entraña la leche ovina, con la tecnología adecuada es posible obtener productos de altísima calidad, placenteros al paladar y que, sin detrimento de estos atributos, pueden convertirse en un alimento funcional.

Referencias bibliográficas

- Bain, I. (2007).** Elaboración de quesos artesanales con leche de oveja. *Revista IDIA XXI Lechería*, (INTA – Chubut), 208–211.
- Bergamini, C.V.; Wolf, I.V.; Perotti, M.C. y Zalazar, C.A. (2010).** Characterization of biochemical changes during ripening in Argentinean sheep cheeses. *Journal of the Small Ruminant Research*, 94, 79–89.
- Busetti, M. y Suárez, V.B. (2009).** Situación actual de los tambos ovinos en Argentina. http://www.minagri.gov.ar/site/ganaderia/ovinos/05=Documentación%20Tecnica/03-Leche%20ovina/_archivos/000000_Situación%20actual%20de%20tambos%20ovinos%20en%20Argentina.pdf
- Candiotti, M.C.; Bergamini, C.V.; Palma, S.B.; Busetti, M.; Meinardi, C.A. y Zalazar, C.A. (2009).** Characterization of proteolysis profile of Argentinean sheep cheeses made with two different technologies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 36–42.
- Cuffia, F.; Candiotti, M.C. y Bergamini, C.V. (2018).** Probiotic soft sheep's cheese: evaluation of probiotic survival and its influence on proteolysis and organoleptic characteristics. *International Food Research Journal*, 25(1), 399–407.
- Meinardi, C.A.; Cuffia, F.; Matozo, E. y Zalazar, C.A. (2012).** Lechería Ovina: Una Alternativa Innovadora y Generadora de Alto Valor Agregado. Actas del IVº Jornadas «Relación Universidad–Entorno Socioprodutivo–Estado» «La cooperación interinstitucional para afrontar los desafíos del desarrollo». 16 de noviembre de 2012, Santa Fe, Argentina.
- Mercanti, D.J.; Busetti, M.R.; Meinardi, C.A. y Zalazar C.A. (2008).** Studies on a fast method for determining the yield in the production of Argentinean sheep cheeses. *Food Chemistry*, 107, 1717–1723.
- Mueller, J. (2013).** La Producción Ovina en la Argentina. inta.gov.ar/documentos/caprina-y-ovina
- Ottogalli, G. (2005).** *Atlante Dei Formaggi*. Milan, Italia: Ulrico Hoepli Editore.
- Palma, S.B.; Bergamini, C.V.; Hilgert, S.; Candiotti, M.C y Meinardi, C.A. (2011).** Optimización de la tecnología para la incorporación de bacterias Probióticas en quesos de oveja. *Actas del XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos* organizado por CYTAL, 19 al 21 de octubre de 2011. Buenos Aires, Argentina.
- Perotti, M.; Wolf, V.; Addis, M.; Comunian, R.; Paba, A. y Meinardi, C. (2011).** Alimentos funcionales de leche de oveja: influencia de la adición de bacterias probióticas en la maduración de quesos. *Actas del XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos* (CYTAL) 19 al 21 de octubre de 2011. Buenos Aires, Argentina.
- Ramos, M. y Juarez, M. (2011).** Sheep Milk. En *Encyclopedia of Dairy Science* (2º Edition). Ed. Elsevier Academic Press London, England, Vol. 3, 494–502.
- Rebechi, S.; Suárez, V.; Mautone, L.; Aranguiz, E.; Baroni, D. y Meinardi, C. (2013).** Características tecnológicas de fermentos naturales de leche obtenidos a partir de leche ovina. *Actas del XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos* (CYTAL). 23 al 25 de octubre de 2013, Rosario, Argentina.
- Rebechi, S.; Suárez, V.; Vélez, A.; Sabbag, N.; Baroni, D. y Meinardi, C. (2014).** La leche fermento y su impacto en la diferenciación de quesos artesanales de oveja. *Actas del V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos* (CICYTAC 2014) 19 de noviembre de 2014. Córdoba, Argentina.
- Suárez, V.; Binetti, A.; Briggiler Marcó, M.; Sabbag, N. y Meinardi, C. (2013).** Quesos de leche de oveja elaborados con fermentos naturales: características microbiológicas y sensoriales. *Actas del V XIII Congreso Argentino de Microbiología*, 2013. 23 al 26 de septiembre de 2013. Buenos Aires, Argentina.
- Zalazar, C.; Bernal, S.; Meinardi, C. y Blazic, M. (2010).** Health nutrition - Sheep cheeses with addition of probiotic bacteria. *Actas del 3º International Professional and Scientific Conference «Occupational Safety and Health»*. September 22/25, 2010. Zadar, Croacia.

11. Nuevas tendencias en la industrialización de la leche bubalina

Silvina Rebecchi, Carlos Meinardi, Facundo Cuffia,
Mario Candiotti y Guillermo George

Si bien la leche de vaca tiene un claro protagonismo en la producción mundial, las leches de otras especies están ganando rápidamente popularidad debido a los beneficios nutricionales e incluso propiedades medicinales atribuidas a su consumo (Smiddy y col., 2012). En este sentido, la producción mundial de leche bubalina ha experimentado un sostenido crecimiento a nivel internacional, lo que la posiciona actualmente en el segundo lugar con más del 13,2 % de la producción mundial. Aproximadamente el 90 % de esta leche se produce en la India y Pakistán y se consume como leche fluida, productos fermentados y cuajadas frescas (Sindhu y Arora, 2011).

Desde el punto de vista taxonómico, el búfalo pertenece a la familia Bovidae, existiendo en el mundo dos tipos de búfalos: los búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) y los búfalos de pantano (*B. carabanesis*) (Khedkar y col., 2016). Si bien en su constitución anatómica es similar al bovino, su mayor resistencia a las enfermedades, su larga vida productiva (ya que puede ser explotado por 9 a 10 períodos de lactación), su adaptabilidad a ambientes hostiles e incluso anegados y su capacidad de producir una leche de buenas características tecnológicas y nutricionales consumiendo pastos de mediana y baja calidad hacen que los búfalos ocupen zonas marginales donde el ganado bovino difícilmente se adapte (Sindhu y Arora, 2011; Khedkar y col., 2016).

La Argentina posee la tercera población bubalina de América del Sur. Cuenta con más de 120 000 búfalos que se distribuyen principalmente en el noreste argentino (NEA) y en menor escala en zonas anegadas del delta entrierriano–bonaerense (Crudelli y col., 2014). Las razas que predominan en la región son la Mediterránea, la Murrah (dos de las razas de mayor importancia económica en el mundo) y sus cruces, todas buenas productoras de leche (Mignaqui, 2010; Crudelli y col., 2014).

El principal destino que se le da en el país a esta especie es la producción de carne, siendo la producción de leche incipiente. Esta actividad se inició en 1992 y actualmente existen algunos establecimientos lecheros en las provincias de Formosa, Corrientes, Misiones, Santa Fe, Tucumán y Buenos Aires cuyos productos son poco difundidos (Patiño, 2004; Almiron, 2011). Además, nuestro país posee un importante potencial para la explotación bubalina ya que cuenta con 8 millones de hectáreas bajas y anegadizas donde el ganado vacuno no se adapta, que podría albergar hasta 4 millones de búfalos, animales que se adaptan perfectamente a estas zonas adversas. En particular, el 25 % de estas áreas se encuentra en Santa Fe, en los bajos submeridionales y la costa del Paraná. Por otra parte, es importante considerar que la recurrencia de inundaciones en nuestra región en los últimos años ha incrementado la extensión de estos terrenos (Crudelli y col., 2014).

La utilización de leches no tradicionales (bubalina, ovina y caprina) en la elaboración de productos lácteos, en particular quesos, está impulsada por pequeñas producciones regionales que han visto en la industrialización de estas leches una fuente de recursos económicos más allá del tradicional aprovechamiento de la carne. Por lo expuesto, el crecimiento de esta industria dependerá en gran medida de los mercados que puedan crearse basándose en la aceptabilidad de los productos lácteos que se desarrollen, y de la investigación que respalde a esta incipiente rama de la industria láctea.

Importancia de la leche bubalina

La leche bubalina se caracteriza por su coloración blanca opaca (debido a la ausencia de β -caroteno) y su marcado sabor dulce. Recibe una creciente atención e inversión en investigación en muchos países debido a su perfil nutricional único. Comparándola con la leche bovina es más rica en grasa, proteína, lactosa, sólidos totales, vitaminas y minerales (como Ca, P y Mg), y posee menor contenido de colesterol y de los minerales Na y K (Tabla 1). Desde el punto de vista tecnológico, la elevada concentración en componentes de interés caseario, sumado al tamaño de sus micelas, hacen de la

leche bubalina una excelente materia prima para la elaboración de quesos por cuanto permite lograr productos con mayor rendimiento y un inmejorable perfil nutricional (Sindhu y Arora, 2011). Sin embargo, dichas diferencias composicionales derivan en que la aplicación de los procesos tecnológicos convencionales sean a menudo inadecuados. Las tendencias emergentes en investigación y desarrollo en el procesamiento de la leche bubalina sugieren que hay un amplio margen para adaptar la tecnología. Varios productos lácteos tradicionales deben sus características únicas a esta leche y en particular los quesos elaborados a partir de leche bubalina son cada vez más populares en todo el mundo (Khedkar y col., 2016).

Tabla 1. Diferencias composicionales en los constituyentes mayoritarios de la leche bubalina y la bovina

Tipo de leche	País	Composición % (p/v)					
		Sólidos totales	Grasa	Sólidos no grasos	Proteínas	Lactosa	Cenizas
Bubalina	Italia	16,86	7,22	9,64	3,95	4,88	0,81
Bubalina	Egipto	16,40	6,37	10,03	3,87	5,00	0,79
Bubalina	Unión Soviética	18,00	8,00	10,00	4,32	4,96	0,84
Bubalina	India	17,02	7,06	9,96	3,90	5,28	0,78
Bubalina	Argentina*	15,07	5,08	9,99	4,68	4,49	0,83
Bovina	India	13,93	4,90	9,43	3,42	4,91	0,70
Bovina	Estados Unidos	13,39	4,14	9,25	3,58	4,96	0,71

Fuente: Khedkar y col. (2016)

* Datos de argentina fuente propia: Rebechi y col. (2012)

Productos lácteos. Quesos

Si bien la mayoría de las variedades conocidas de quesos se elaboran a partir de leche bovina, particularmente en quesos donde se desean ciertas características como textura fibrosa y masticabilidad la leche bubalina es más adecuada para su elaboración, como el queso Mozzarella, Panner y Queso Blanco Salado. En la Tabla 2 se presentan algunas variedades de quesos, con su país de origen. Además de estos quesos algunas variedades que tradicionalmente se fabrican con leche bovina, han sido elaboradas con leche bubalina (Sindhu y Arora, 2011; Khedkar y col., 2016).

Tabla 2. Principales variedades de quesos elaboradas con leche bubalina

País de origen	Quesos
Italia	Mozzarella
India	Paneer
Egipto	Domiatí
América del Sur y Central	Queso Blanco
Países Balcánicos	Queso Blanco salado y encurtido

Fuente: Arora y Khetra (2017)

Mozzarella

El queso Mozzarella tradicionalmente se elabora exclusivamente con leche bubalina y sus orígenes se remontan al siglo VII, cuando se introduce el ganado bubalino en el sur de Italia. En 1979 se le da el reconocimiento de queso típico y en 1993 adquiere, bajo el nombre de *Mozzarella di Bufala Campana*, la categoría «producto con denominación de origen protegida» (DOC 10/05/93) (Zicarelli, 2001).

Es un queso blando sin maduración, de alto contenido de humedad y pertenece a la familia de los quesos de pasta hilada que se distinguen por la estructura de su pasta que deriva de una tecnología de producción especial. La característica más distintiva de esta tecnología es la etapa de hilado que consiste en el amasado de una cuajada acidificada sumergida en agua muy caliente. Se identifica por su color blanco, superficie brillante y textura suave. Por sus características es un producto que no encuentra comparación, por su sabor particularmente delicado y altamente exquisito, en derivados obtenidos de otros tipos de leches (Citro, 1981).

Paneer

El Paneer es un queso muy popular de la India, similar a un queso blando no madurado que se utiliza para preparar una variedad de platos y aperitivos. Se lo obtiene por coagulación ácida y alta temperatura. Contiene grandes agregados estructurales de proteínas formados por caseínas, proteínas del suero desnaturalizadas, grasa y una porción de sales y lactosa. Se caracteriza por un color blanco marmolado, sabor dulce y ligeramente ácido, cuerpo esponjoso y una textura muy unida. Tiene un excelente perfil nutricional ya que retiene aproximadamente el 90 % de la materia grasa y proteínas, el 50 % de los minerales y el 10 % de la lactosa de la leche original (Kumar y col., 2014)

Domiatí

El queso Domiatí es una variedad, muy popular en Egipto y países árabes, de queso blando, blanco y encurtido. En su elaboración se agrega entre 8 y 15 % de NaCl antes de la coagulación lo que produce una solubilización parcial del fosfato de calcio coloidal, resultando en un incremento del calcio soluble. La utilización de la leche bubalina compensa la formación de un coágulo débil provocado por la alta adición de NaCl (Hamad, 2015).

Queso Blanco

Es un queso fresco elaborado con ácidos orgánicos o con fermentos. Tiene un característico sabor ácido suave y cuerpo similar a la Mozzarella, con buenas propiedades de corte. En la elaboración del Queso Blanco, la leche bubalina se estandariza al 3% (p/v) de materia grasa y se precalienta a 80°C, seguida de la adición del ácido orgánico diluido bajo agitación suave (Arora y Khetra, 2017).

Nuestro grupo de trabajo

En la provincia de Santa Fe, en el año 2009 se instala un plantel de búfalos provenientes de la provincia de Formosa, en el predio de la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja (EAGYG) dependiente de UNL, destinado a la producción de leche bubalina a fin de incrementar la productividad.

Para nuestro grupo, que tiene una trayectoria de trabajo en conjunto con la EAGYG, se presentó el desafío de transformar en un producto lácteo, específicamente queso, una materia prima desconocida hasta el momento como la leche bubalina. A partir de ello se desarrollaron tecnologías que se adapten a la producción de diferentes tipos de quesos bubalinos con características distintivas definidas por el tipo de leche.

Quesos de pasta hilada de corta y mediana maduración

Se inició optimizando la tecnología para obtener un queso fresco de pasta hilada, tipo Mozzarella, que si bien es un queso muy difundido en Italia y alcanza su máxima expresión de calidad en la *Mozzarella di Bufala Campana*, en nuestro país es muy poco conocido. Para lograr este queso, se trabajó siguiendo el proceso tradicional italiano, con las modificaciones requeri-

das para lograr un producto de características fisicoquímicas y organolépticas adecuadas. En la Fig. 1 se presenta el perfil de temperaturas y las principales etapas tecnológicas requeridas en la elaboración de un queso fresco de pasta hilada.

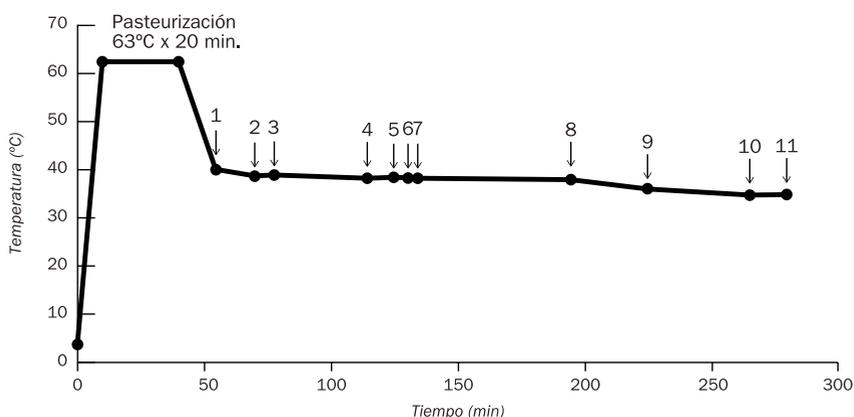


Figura 1. Perfil de temperaturas y principales etapas tecnológicas requeridas en la elaboración de un queso fresco de pasta hilada con leche bubalina

Referencias: 1. Agregado de fermento; 2. Agregado del cuajo; 3. Visualización de la coagulación; 4. Lirado; 5-6-7. Agitación muy suave; 8. Cuajada bajo suero pH:6,2; 9. Extracción de la cuajada pH:5,45; 10. pH:4,95 comienzo del cortado de la cuajada; 11. Inicio del hilado.

Fuente: Rebecchi y col. (2016)

Los productos presentaron parámetros fisicoquímicos (humedad y materia grasa en el extracto seco) encuadrados en lo que estipula el CAA en su artículo 618 para el queso Mozzarella y, además, el valor proteína/materia grasa fue superior (0,862) al reportado para la *Mozzarella di Bufala Campana* (0,684) (Rebecchi y col., 2016).

Por tratarse de un producto prácticamente desconocido en nuestro país, la realización de un estudio de mercado se hace necesaria, o cuanto menos muy útil, para el posterior análisis de las variables económicas. Es por ello que, en el marco de una tesina de grado se llevaron a cabo estudios para determinar las características sensoriales del queso Mozzarella elaborado con leche bubalina de la región, al igual que aspectos tales como conservación y aceptabilidad en el mercado, profundizando así el estudio de estos aspectos (Zanardi, 2013a). Las características sensoriales se determinaron mediante el análisis descriptivo cuantitativo con un panel sensorial y los ensayos de acep-

tabilidad se llevaron a cabo con grupos de personas seleccionadas al azar que representen la población en estudio. Ambas metodologías de evaluación se llevaron a cabo para diferentes tiempos de maduración. Las mozzarellas se envasaron al vacío a las 24 horas de elaboradas y se conservaron refrigeradas durante 5 semanas y congeladas por 15 semanas (Zanardi, 2013a). Los resultados obtenidos fueron satisfactorios ya que los mismos cumplieron con las características sensoriales estipuladas en el CAA (art. 618). Los quesos recién elaborados presentaron olor poco intenso, color blanco claro casi neutro, dureza, elasticidad y masticabilidad relativamente baja, flavor global intermedio y con leve sabor a crema. A las 4 semanas de conservación para los quesos refrigerados y a las 15 semanas para los congelados el panel sensorial detectó apreciables modificaciones en los parámetros de textura, resultando un queso más blando, con menor elasticidad y masticabilidad (Zanardi, 2013b).

En cuanto a los ensayos de aceptabilidad, los de mayor aceptación fueron los que se conservaron refrigerados durante 3 semanas y los conservados congelados durante 6 semanas (Zanardi, 2013a).

Es oportuno aclarar que estos resultados son más que alentadores por cuanto en nuestro país, a diferencia de Italia, la zona de producción lechera se encuentra alejada de los grandes centros de consumo por lo que la comercialización sería factible ya que la mayor aceptabilidad la obtuvo el producto con un cierto período de maduración.

Continuando con la línea de pasta hilada, se elaboraron quesos semicocidos de pasta hilada de forma cilíndrica y a partir del trozado se obtuvieron Provoletas. La provoleta es un queso típico argentino de aproximadamente 10 mm de altura y 120 mm de diámetro con poca maduración (aproximadamente 20 a 25 días) envasado al vacío, y que se consume previo calentamiento en la tradicional parrilla del asado. El producto obtenido de leche bubalina aportó, además de las conocidas características nutritivas y el sabor exquisito, la ventaja de soportar más tiempo de calentamiento sin escurrirse de la parrilla comparándolo con el elaborado con leche bovina (Rebechi y col., 2017a).

Quesos de pasta semicocida

En un intento por acrecentar el potencial que presenta la leche bubalina se desarrollaron protocolos para elaborar quesos de pasta semicocida. Si bien la leche bubalina no está considerada una buena materia prima para elaborar este tipo de quesos, existen diferentes estrategias para obtenerlos.

Esta variedad se caracteriza por su cuerpo, textura y sabor agradable otorgados por la maduración, por lo que el empleo de leche bubalina como materia prima resultará un producto con cuerpo y textura dura, gomosa, seca y poco sabor desarrollado (Sindhu & Arora, 2011). Estos defectos se deben principalmente a un lento desarrollo de acidez, menor retención de humedad y menor tasa de cambios bioquímicos, que juegan un rol importante en el desarrollo del sabor, cuerpo y textura característicos de estos quesos (Arora y Khetra, 2017). Se han sugerido en la bibliografía ciertas modificaciones para mejorar la calidad de los quesos, las que incluyen un tratamiento térmico intenso a la leche, mayor adición de fermentos, adición de fermentos adjuntos y NaCl, así también como tecnologías novedosas como la filtración por membrana y el tratamiento de alta presión (Arora y Khetra, 2017).

Los quesos obtenidos presentaron, contrariamente a lo reportado por la bibliografía, una pasta homogénea, sin ojos y una textura comparable a los quesos semicocidos elaborados con leche de vaca, aunque con algo menos de sabor, lo que es coincidente con lo informado por Sindhu y Arora (2011), y Arora y Khetra (2017). Los quesos con un período de maduración de entre 30 y 45 días fueron presentados en tres ferias provinciales y por esto, mediante el ensayo de aceptabilidad, se puede decir que el 75% de los consumidores encuestados (950 personas) catalogó al queso como bueno o muy bueno (Rebecchi y col., 2014).

Los resultados del análisis sensorial (30 y 150 días de maduración) reflejaron que durante la maduración se produjo una disminución en la elasticidad, la cohesividad y la masticabilidad, conjuntamente con un incremento en el olor. Sin embargo, el flavor global no evolucionó por cuanto no se detectaron variaciones significativas en los atributos analizados (Rebecchi y col., 2014).

Debido a que los quesos semicocidos obtenidos se caracterizaron por tener un flavor poco acentuado, este hecho presentó el desafío tecnológico de lograr quesos con sabor más desarrollado en tiempos deseados de maduración, dadas las particularidades fisicoquímicas de la leche.

Teniendo presente que los quesos semicocidos que se elaboran con leche ovina tienen un flavor muy acentuado debido a las características fisicoquímicas y microbiológicas de esta leche, se utilizó como estrategia la mezcla de leche de bubalina con leche ovina para mejorar las características organolépticas de los quesos. Esta práctica, el empleo de mezcla de leches de diferentes especies de mamíferos es una práctica arraigada y común en la elaboración de algunos quesos típicos europeos (Rebecchi y col., 2015).

Sobre la base de lo expuesto, en la Fig. 2 se presenta el diagrama de bloques del proceso de elaboración de queso semicocido con una mezcla de leche que consistió en un 80% de leche bubalina y un 20% de leche ovina.

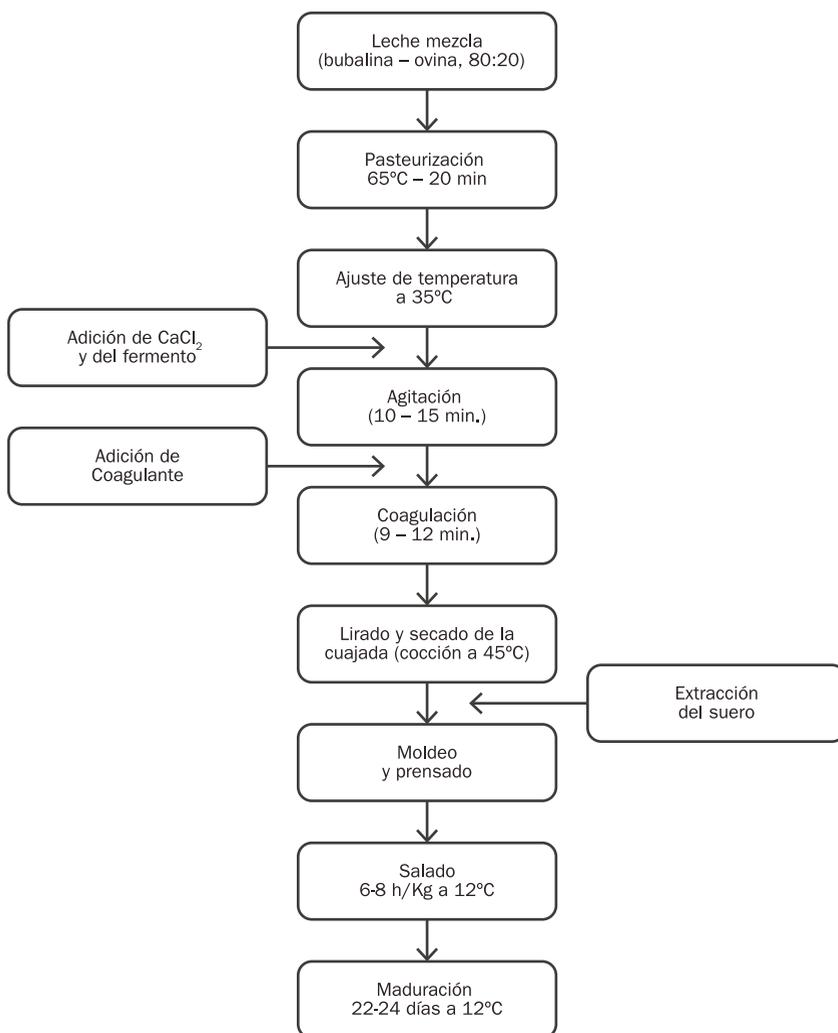


Figura 2. Diagrama de bloques para el proceso de elaboración del queso semicocido

Los quesos obtenidos mejoraron sustancialmente el flavor con respecto a los elaborados con el 100% de leche bubalina, lo cual indica que la adición parcial de leche ovina mejora las propiedades organolépticas del queso. En este sentido, los parámetros evaluados en la lipólisis (ácidos grasos libres cuantificados por GC) y en la proteólisis (fracciones nitrogenadas y péptidos solubles identificados por HPLC) reflejaron un incremento en los quesos elaborados con la mezcla de leches (Rebecchi y col., 2017b). Estos hechos se

relacionan con el aumento de las NSLAB (enterococos), microorganismos con mayor capacidad proteolítica y lipolítica que los microorganismos del starter. En la Fig. 3 se presenta la evolución del recuento de enterococos durante la maduración (Súarez y col., 2015).

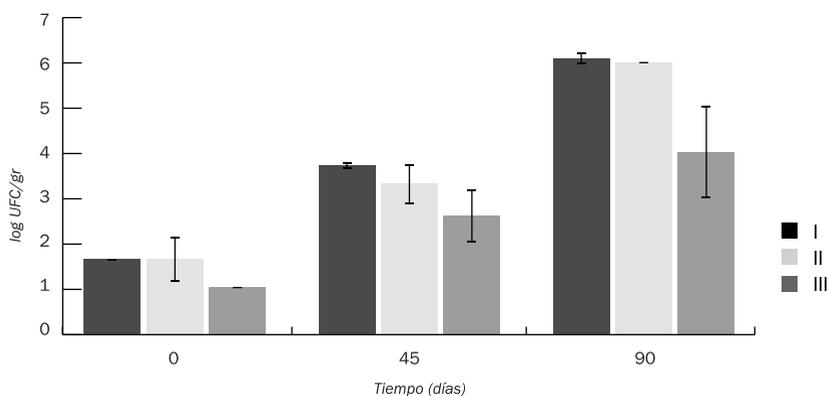


Figura 3. Evolución del recuento de enterococos en quesos ovinos, bubalinos y bubalino/ovino durante la maduración

Referencia: I. queso ovino. II. queso bubalino/ovino. III. queso bubalino.

Fuente: Suárez y col. (2015)

En la actualidad, nuestro grupo continúa con la línea de investigación de la leche bubalina. Recientemente, los estudios se han orientado a utilizar esta materia prima como complemento de la leche bovina en la elaboración de quesos semicocidos a fin de mejorar la calidad nutricional del producto, sin afectar sus características organolépticas.

Referencias bibliográficas

- Almiron, L.R. (2011).** Aportes para el posicionamiento de la leche bubalina. En Patiño, E.M.; Crudeli, G.A.; Valdés, A.M.; Simplicio de Oliveira, J.F.; Gusmão Couto, A.; Jacobo, R.A.; Lopez, O.C.; Sanchez Negrette, M. y Rebak, G.I. (Eds). *Bubalinocultura de las Américas*. Corrientes, Argentina: Moglia SRL, 207–229.
- Arora y Khetra (2017).** Chapter 42- Buffalo Milk Cheese. En McSweeney, P.L.H.; Fox, P.F.; Cotter, P.D. y Everett, D.W. (Eds). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Cambridge, Massachusetts, 1093–1101.
- Citro, V. (1981).** Dal latte di bufala un tipico prodotto locale «La mozzarella». *Sci. Tec. Latt.-Cas.*, 32, 263–270.
- Crudeli, G.A.; Patiño, E.M.; Maldonado Vargas, P. y Konrad, J.L. (2014).** Pasado, presente y futuro del búfalo en Argentina. *Revista Veterinaria*, 25(2), 140–145.
- Hamad, M.N.F. (2015).** Comparative study between traditional Domiati cheese and recombined Feta cheese. *Indian J. Dairy Sci.*, 68(5).
- Kumar, S.; Rai, D.C.; Niranjan, K. y Bhat, Z.F. (2014).** Paneer-An Indian soft cheese variant: a review *J Food Sci & Technol*, 51(5), 821–831.
- Khedkar, C.D.; Kalyankar, S.D. y Deosarkar, S.S. (2016).** Buffalo Milk. En: Caballero, B.; Finglas, P. y Toldrá, F. (Eds.). *The Encyclopedia of Food and Health*. Vol. 1. Oxford: Academic Press, 522–528.
- Mignaqui, E.T. (2010).** Boletín Bubalino. *IX Congreso Mundial de Búfalos*. Ministerio de agricultura, ganadería y pesca. Presidencia de la Nación. Argentina.
- Patiño, E.M. (2004).** Factores que afectan las propiedades físicas y la composición química de la leche de búfalas (*Bubalus bubalis*) en Corrientes, Argentina. *Revista Veterinaria*, 15(1), 21–25.
- Rebecchi, S.; Sánchez, R.; Deseta, L. y Meinardi, C. (2012).** Desarrollo de un protocolo para la elaboración regional de mozzarella de búfala. *Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas CLICAP*. San Rafael, Mendoza, Argentina.
- Rebecchi, S.; Baroni, D.; Sabbag, N.; Candiotti, M. y Meinardi C. (2014).** Características fisicoquímicas de quesos semicocido elaborados a partir de leche de Búfala. *International Conference on FoodInnovation-FoodInnova®*. Concordia, Argentina.
- Rebecchi, S.; Baroni, D. y Meinardi, C. (2016).** Mozzarella de Búfala: una contribución a las economías regionales de Argentina. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 96, 44–48.
- Rebecchi, S.; Perotti, F.; George, G. y Meinardi, C. (2017a).** Provoleta elaborada con leche de búfala: un producto novedoso con características mejoradas. *XVI Congreso CYTAL*. Mar del Plata, Argentina.
- Rebecchi, S.; Wolf, I. Perotti, C. y Meinardi, C. (2017b).** Quesos elaborados con mezcla de leches de búfala y oveja. Efecto del tipo de leche en la lipólisis y formación de compuestos volátiles. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 100, 32–37.
- Sindhu, J. and Arora, S. (2011).** Buffalo Milk. En Fuquay, J.W.; Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. San Diego, United States: Academic Press, 503–511.
- Smiddy, M.; Huppertz, T. y van Ruth, S. (2012).** Triacylglycerol and melting profiles of milk fat from several species. *International Dairy Journal*, 24, 64–69.
- Suárez, V.; Binetti, A.; Costa, S.; Briggler Marcó, M. y Meinardi, C. (2015).** Incidencia de la composición microbiológica de quesos elaborados con leche mezcla oveja-búfala en el flavor del producto final. *CYTAL 2015 – AATA*. Buenos Aires, Argentina.
- Zanardi, M.V. (2013a).** *Características nutricionales y sensoriales del queso Mozzarella elaborado con leche de búfala*. (Tesina de grado). Universidad Nacional del Litoral.
- . (2013b). Características sensoriales de queso Mozzarella de búfala en distintos tiempos de maduración. *XVII Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UNL*. Santa Fe, Argentina.
- Zicarelli, L. (2001).** La bufala mediterranea italiana: esempio di una razza autóctona in exoancione. *Sci. Tec. Latt.-Cas.*, 52, 279–284.

Otros

Adulteración de leche y productos lácteos

Silvina Rebecchi, Susana Palma,
Verónica Wolf y Ma. Cristina Perotti

Consideraciones generales

El estudio de genuinidad y/o adulteración de productos e ingredientes alimenticios son tópicos emergentes en el sector alimentario. Si bien se ha practicado por años, se ha ido sofisticando con el tiempo (Van Ruth y col., 2010).

La leche es un fluido biológico y representa uno de los sistemas fisicoquímicos más complejos. Sus componentes tienen importantes propiedades nutricionales y tecnológicas (Ulberth, 2000; Van Ruth y col., 2010).

La adulteración de la leche y de los productos lácteos es una práctica intencional y fraudulenta impulsada por una motivación económica para reducir los costos de producción, aumentar los márgenes de beneficios y que impacta negativamente en la calidad de los productos y en algunos casos también en la salud pública (Park y col., 2014).

La leche es considerada genuina y no adulterada cuando desde la producción hasta el consumo no se han modificado de forma voluntaria sus constituyentes naturales ni se han hecho manipulaciones destinadas a ocultar defectos de calidad. Las principales adulteraciones que se realizan sobre la leche son el agregado de grasas extrañas, proteínas vegetales, leches de diferentes especies, suero, y aguado. Por el contrario, algunos adulterantes pueden ser perjudiciales para la salud (urea, detergentes, sulfato de amonio,

melanina, entre otros) (Ulberth, 2000; Abernethy y col., 2016; Nascimento y col., 2017). En particular, el agregado de suero de quesería a la leche fluida y en polvo, y de grasas de origen animal o vegetal a la grasa láctea, son procedimientos no avalados por la Legislación Alimentaria Argentina (CAA).

En este capítulo, se describen los métodos reportados y los resultados obtenidos en el INLAIN relacionados a la detección de grasas de origen animal y vegetal en grasa láctea bovina a través del empleo de técnicas cromatográficas y quimiométricas. En cuanto al agregado de suero en leche, se discuten los métodos analíticos utilizados para su detección y los estudios llevados a cabo por nuestro grupo en relación a esta temática.

Adulteración de la grasa láctea con grasas extrañas

La grasa láctea, al igual que otras grasas de origen animal y aceites/grasas de origen vegetal, tienen una contribución muy significativa en nuestra dieta para cocinar, freír, preparar ensaladas o en la formulación de alimentos. Particularmente, la grasa láctea es un componente alimentario importante y juega un rol significativo en la economía, nutrición y propiedades físicas y químicas de la leche y los productos derivados (Kumar y col., 2010; Azadmard–Damirchi y col., 2015). La determinación de la pureza, identidad, genuinidad o, por el contrario, de la adulteración de la grasa láctea en particular y de los aceites y grasas comestibles, en general, es un tópico de enorme interés y que ha sido objeto de muchos estudios desde hace décadas (Azadmard–Damirchi y col., 2015). En algunos casos, la adulteración suele no representar un problema de salud; sin embargo, puede ocasionar serios problemas en la industria alimentaria ya que el uso de grasas o aceites adulterados puede afectar los procesos. La grasa láctea al igual que otros aceites y grasas comestibles (aceite de oliva, manteca de cacao) tienen un precio elevado por lo que resulta tentador su reemplazo con grasas o aceites de menor costo con fines económicos (Azadmard–Damirchi y col., 2015). Entre las diferentes formas de adulteración de la grasa láctea, aquellas llevadas a cabo con grasas de origen animal son las más difíciles de detectar (Ulberth, 1994, 1995; Kumar y col., 2009). Es una práctica antigua e ilegal en la mayoría de los países; sin embargo, aún se sigue practicando y, además, las adulteraciones de alimentos o ingredientes se han sofisticado por lo que las estrategias analíticas tradicionales en muchos casos no son completamente adecuadas o suficientes para descubrirlas y garantizar la calidad del producto (Park y col., 2014). Es por ello que se han desarrollado metodologías de análisis cada vez más avanza-

das, rápidas, no destructivas, pero que en muchos casos tienen la desventaja de ser complejas, requerir personal calificado y tener un costo elevado (Van Ruth y col., 2010). En algunos casos se puede usar la presencia/ausencia de un componente particular que caracteriza a una determinada grasa/aceite como marcador o *target*; por ej., la presencia de fitosteroles (stigmasterol, campesterol, sitosterol) en manteca indica que la misma se ha mezclado con grasas/aceites vegetales (Azadmard–Damirchi y col., 2015), el compuesto 5–metil–2–hepten–4–ona (filbertona) presente en el aceite de avellana se ha usado como marcador para determinar adulteración de aceite de oliva con aceite de avellana (Čížková y col., 2013), y el brasicasterol, un esteroles que se encuentra exclusivamente en el aceite de canola y el sesamol, sesamina y sesamolina, que son componentes únicos del aceite de sésamo, cuya presencia puede usarse para detectar el agregado de aceite de canola o sésamo, respectivamente (Azadmard–Damirchi y col., 2015).

Características y composición de la grasa láctea bovina

La grasa en la leche existe como glóbulos grasos en su estado natural. Estas entidades biológicas (de aproximadamente 4 μm de diámetro) tienen una arquitectura compleja compuesta por un núcleo rico en triacilgliceroles (TAG) envuelto por una membrana biológica (membrana del glóbulo graso, MFGM por sus siglas en inglés), la cual es responsable de la integridad y la estabilidad del glóbulo graso en el medio acuoso. La composición y estructura únicas de los glóbulos de grasa de la leche conducen a funcionalidades específicas (Lopez, 2011).

El contenido de grasa en la leche cruda bovina varía del 3 al 6% (p/v). Diversos factores tales como la alimentación, la raza, el período de lactación, el estado fisiológico del animal y el intervalo entre ordeños influyen no sólo en el contenido total de grasa en la leche sino también en la composición de la misma (MacGibbon y Taylor, 2006; Yoshinaga y col., 2013).

Los lípidos de la grasa de leche son en su mayoría triacilglicéridos (TAG) (95–98%), ésteres del glicerol con diferentes ácidos grasos (AG). Son una fuente de energía y nutrientes, y responsables de ciertas propiedades físico–químicas y de superficie que posee la grasa láctea tales como hidrofobicidad, densidad, fusión y cristalización. Además, la grasa es un importante ingrediente que aporta características deseables de textura y flavor a los alimentos. En ella, también están presentes en menores cantidades diacilglicéridos, monoacilglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos, todos correspondientes a la fracción saponificable, y niveles trazas de AG en estado libre. En bajos niveles

y pertenecientes a la fracción insaponificable se encuentran los esteroides, vitaminas liposolubles y carotenos (Jensen, 2002; MacGibbon y Taylor, 2006).

La composición de TAG de la grasa láctea es extremadamente compleja debido a que muchos AG, con diferentes longitudes de cadena y grado de insaturación, pueden esterificar las tres posiciones del esqueleto de glicerol. Considerando solamente los AG que están en concentraciones superiores a 1 % (p/p) (que son aproximadamente 15), se tendrían 2744 posiciones potenciales de ubicación si la distribución fuera al azar; sin embargo, este número se simplifica bastante ya que los AG se esterifican preferencialmente en posiciones específicas durante los mecanismos de síntesis. Se tienen muchas especies de TAG que varían considerablemente en un amplio rango de pesos moleculares, desde 470 a 890 g/mol, lo que corresponde a un rango de carbonos acilo desde 24 a 56, distinguiéndose dos nodos compuestos por especies dominantes de TAG con carbonos acilo desde 36 a 40 y desde 46 a 52, para la grasa de leche bovina (Lopez, 2011). Estos TAG principales están compuestos por una combinación de AG de cadena larga saturados ($C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$) e insaturados ($C_{18:1\ c}$) y AG de cadena corta. Se ha reportado que el 35–40 % de los TAG de la grasa láctea bovina está constituido por $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ y $C_{18:1}$ en las posiciones $sn-1$ y $sn-2$, y $C_{4:0}$ y $C_{6:0}$ en la posición $sn-3$ (por ej. 18:1/16:0/4:0, 16:0/16:0/4:0, 16:0/14:0/4:0). Este perfil difiere sustancialmente de aquellos de las grasas lácteas procedentes de otras especies de animales rumiantes y no rumiantes y de grasas/aceites vegetales (Jensen, 2002; MacGibbon y Taylor, 2006; Lopez, 2011; Fontecha y col., 2019).

En cuanto a las características químicas de los AG que componen las especies de TAG de la grasa láctea bovina, se han reportado alrededor de 400 diferentes empleando técnicas cromatográficas y espectroscópicas avanzadas. De allí que está considerada como la grasa natural más compleja (Ulberth, 2000). A pesar de ello, la mayor parte está presente en pequeñas cantidades (<0,01 % p/p). Alrededor de 15 AG se encuentran en concentraciones superiores a 1,0 % p/p y son los considerados mayoritarios. Los AG saturados, lineales y de número par de átomos de carbono (C_4 a C_{18}) representan aproximadamente el 65–70 % del total. También están presentes AG insaturados, lineales y de número par de átomos de carbono. Entre los monoinsaturados con isomería geométrica *cis*, el ácido oleico ($C_{18:1\ c}$), representa entre 18 y 24 % del total, mientras que los ácidos palmitoleico ($C_{16:1}$) y miristoleico ($C_{14:1}$) están en niveles del 1,0 %. De los AG poliinsaturados, solamente los ácidos linoleico ($C_{18:2}$) y α -linolénico ($C_{18:3}$) están presentes, aunque en bajas proporciones debido a las reacciones de biohidrogenación que se llevan a cabo en el rumen. Otros AG con mayor longitud de cadena, ramificados, con número impar de átomos de carbono y con isomería *trans*, se encuentran en cantidades trazas. Actualmente, a varios de ellos

se los considera importantes desde el punto de vista nutricional (Jensen, 2002; MacGibbon y Taylor, 2006).

De este modo, las concentraciones de las especies individuales de TAG son variables como resultado del amplio rango de concentraciones de los AG individuales que los conforman.

Metodologías analíticas utilizadas para el estudio de la adulteración

La detección de adulteraciones con grasas extrañas en grasa láctea presenta dificultades ocasionadas por la variabilidad natural en el contenido de sus constituyentes, como se indicó anteriormente. Además, la disponibilidad en el mercado de grasas de otros orígenes con composiciones que simulan lo más posible la composición de la grasa láctea, atenta contra el objetivo que se persigue (Ulberth, 2000; Destailats y col., 2006; Rebechi, 2009).

La producción de leche de Argentina se aglutina en las provincias de Santa Fe y Córdoba, y en menor medida en Buenos Aires, concentrando la cuenca lechera central Santa Fe–Córdoba aproximadamente el 70% (Montenegro, 2016). En nuestro país, la adulteración de grasa láctea con grasas extrañas es un problema que no ha sido aún resuelto. La información publicada acerca de la caracterización de la grasa láctea genuina y del estudio de su adulteración es muy escasa (Páez y col., 2006).

La legislación Argentina estipula una serie de parámetros que debe cumplir la grasa láctea bovina. En este sentido el CAA en su artículo 555 bis establece:

La materia grasa de los productos lácteos y/o la materia grasa de la base láctea de los productos lácteos de origen bovino con agregados, deberá responder a los siguientes requisitos:

Punto de Fusión	28–37 °C
Índice de Refracción (40 °C)	1,4520–1,4566
Índice de Iodo	26–38
Índice de Reichert–Meissl (IRM)	24–36
Índice de Polenske (IRP)	1,3–3,7
Índice de Saponificación (Kottstorfer)	218–235

Determinación de grasa de origen vegetal: Negativo.

Método: detección de grasas vegetales en grasa de leche por cromatografía en capa delgada de los esteroides (FIL 38: 1966, confirmada 1983) y/o detección de grasas vegetales en grasa de leche por cromatografía gas líquido de los esteroides (FIL 54:1969).

Determinación de grasas de origen animal: deberán ser cumplidas las siguientes relaciones de ácidos grasos determinadas por cromatografía gaseosa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (Boletín FIL 265/1991 página 39).

$$\begin{aligned} 14:0 / 18:1 &= > 0,30 \\ 14:0 / 12:0 &= (3,0-4,1) \\ 12:0 / 10:0 &= (0,95-1,3) \\ 10:0 / 8:0 &= (1,85-2,3) \end{aligned}$$

Cuando se demuestre fehacientemente que estos valores no se corresponden parcial o totalmente con los obtenidos sobre la grasa láctea de una determinada región lechera, estos últimos podrán ser tomados en cuenta como valores normales para dicha región.

De acuerdo con lo que se reporta en bibliografía (Ulberth, 2000; van Ruth y col., 2010; Azadmard-Damirchi y col., 2015) y a resultados propios obtenidos por nuestro grupo de trabajo, los índices basados en las propiedades fisicoquímicas y el análisis de los constituyentes de la fracción insaponificable y de los ácidos grasos volátiles solubles e insolubles en agua (índices de Reichert-Meissl y Polenske, respectivamente), no permiten en muchos casos determinar bajos porcentajes de agregado de grasas extrañas.

A lo largo de los años, varias técnicas analíticas instrumentales novedosas en combinación con herramientas estadísticas (disciplina conocida como quimiometría) se han aplicado para el estudio de la adulteración de la grasa láctea, tales como la cromatografía gaseosa combinada con espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alta performance en fase reversa (RP-HPLC), cromatografía en capa delgada (TLC), espectroscopía isotópica (IS), resonancia magnética nuclear (NMR), análisis térmico, espectrometría de masas MALDI-TOF (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador tiempo de vuelo), entre otras (Ntakatsane y col., 2013; Park y col., 2014; Poonia y col., 2017). Los métodos estadísticos multivariados son una herramienta de gran utilidad en muchas áreas del análisis de alimentos (Goudjil y col., 2003; Fontecha y col., 2006; van Ruth y col., 2010).

En lo que a métodos cromatográficos se refiere, la determinación del perfil de AG por cromatografía gaseosa (GC) es un procedimiento muy utilizado para caracterizar la grasa láctea. Sin embargo, por la variabilidad natural en los contenidos de los AG individuales, no resulta del todo adecuado para resolver el problema. A partir de estos perfiles se pueden calcular las cuatro relaciones establecidas en el CAA y otras establecidas en bibliografía; sin embargo, según resultados propios y datos publicados (Ulberth, 1994;

2000), esta estrategia tampoco resulta de utilidad en la mayoría de los casos. En efecto, los estudios llevados a cabo por nosotros consistieron en analizar por GC el perfil de AG de muestras de grasas lácteas genuinas y adulterantes de origen animal (grasa vacuna y porcina) y de origen vegetal (aceites de girasol, soja y grasa de coco), y simular matemáticamente muestras adulteradas con 2, 5, 10 y 15 % de agregado de dichos adulterantes, como se indica en detalle más adelante. En particular, se calcularon 22 relaciones de concentración de dos o más AG reportadas en bibliografía, incluyendo las 4 relaciones del CAA para grasa de origen animal (Rebechi, 2009). Para cada una de las relaciones se determinaron los rangos normales para las grasas lácteas genuinas y posteriormente se calcularon las relaciones para las muestras adulteradas y se evaluó la eficiencia de las mismas en la detección de los adulterantes utilizados. En el caso del agregado de grasas de origen vegetal se encontraron 3 relaciones que resultaron útiles ya que detectaron un bajo porcentaje (2 %) de adulteración en el 100 % de las mezclas. Estas relaciones fueron $C_{14:0}/C_{18:2}$ y $C_{18:2}/C_{8:0}$ para aceite de soja y de girasol, y $C_{12:0}/C_{10:0}$ para grasa de coco. Para el caso de las muestras adulteradas con grasas de origen animal no se obtuvieron relaciones útiles para detectar bajos niveles de adulteración; solamente las relaciones $C_{14:0}/C_{18:2}$ y $C_{18:2}/C_{8:0}$ permitieron detectar el 15 % de adulteración en el 100 % de las mezclas con grasa porcina, y para grasa vacuna el porcentaje detectado fue bajo, menor al 50 % para el 15 % de adulteración. De esta manera, se comprobó que las relaciones establecidas por el CAA para detectar el agregado de grasa animal no resultaron eficaces para detectar el agregado de hasta el 15 % de grasas animales (Tabla 1).

Tabla 1. Relaciones de ácidos grasos propuestas en el CAA para la detección de grasas animales

Relación de Ácidos grasos	Rango de Variación
$C_{10:0} / C_{8:0}$	1,85 – 2,30
$C_{12:0} / C_{10:0}$	0,95 – 1,30
$C_{14:0} / C_{12:0}$	3,0 – 4,1
$C_{14:0} / C_{18:1}$	> 0.30

En la actualidad, la metodología recomendada por la Comunidad Económica Europea (CE Reglamento de la Comisión nº 213/2001) que dio origen a una norma internacional (ISO/IDF 17678:2010/202: 2010) para

determinar la pureza de la grasa láctea, se basa en el análisis del perfil de TAG por cromatografía de gases y la aplicación de ecuaciones o fórmulas matemáticas (definidas una para cada adulterante), obtenidas por Regresión Lineal Múltiple (RLM). Estas fórmulas tienen la siguiente expresión general: $\sum a_i C_i = S + e$, donde i es el número de carbonos, C_i es el porcentaje de TAG con número de carbonos i , a_i es el coeficiente que se estimó previamente basado en el estudio de grasas lácteas genuinas, S es una constante definida como 100 para la grasa láctea pura y e es un error aleatorio. Las primeras investigaciones que sirvieron como base para desarrollar este procedimiento analítico normalizado surgieron de los trabajos llevados a cabo en las décadas del 80 y 90 por Timms (1980), Precht (1992a, 1992b) y Ulberth (1995, 1994).

Cuando se analiza una muestra incógnita, los porcentajes obtenidos para cada TAG se introducen en dichas fórmulas y para cada una de ellas se calcula el parámetro s . Este valor se compara con los rangos de valores de s establecidos para la grasa láctea genuina en cada una de las ecuaciones; si el valor de s de la muestra incógnita está dentro de dichos rangos se considera genuina, mientras que si está fuera de alguno de ellos se considera adulterada. Con este método ha sido posible detectar niveles de grasas extrañas tan bajos como 2–5 % (Poonia y col., 2017).

Aplicación de quimiometría a perfiles de AG de grasas lácteas argentinas

En nuestro país, la aplicación de la quimiometría en la detección de adulteración de grasa de leche con grasas de otros orígenes solo ha sido encarada, de acuerdo con lo conocido, por nuestro grupo de investigación (Rebechi y col., 2016).

El estudio consistió en determinar el perfil de AG característico de la grasa láctea bovina a partir del análisis de muestras de mantecas de primera línea y leches fluidas (72 muestras en total) provenientes de la cuenca central durante un período de 3 años y procesar los datos con técnicas de regresión multivariada. También se analizaron las materias grasas que se consideraron adulterantes: grasas vacuna ($n=10$) y porcina ($n=7$), y aceites de girasol ($n=5$), de soja ($n=2$) y grasa de coco ($n=2$). En la Tabla 2 se indica el valor promedio y los rangos de concentraciones para cada uno de los 16 AG cuantificados.

Tabla 2. Valores en g de AG / 100 g grasa para las grasas lácteas genuinas de la cuenca lechera central

Ácidos grasos	Media	Valor mínimo	Valor máximo
C _{4:0}	3,56	2,83	4,30
C _{6:0}	2,13	1,86	2,37
C _{8:0}	1,11	0,91	1,31
C _{10:0}	2,38	1,74	3,03
C _{10:1}	0,29	0,22	0,35
C _{12:0}	2,96	2,14	3,89
C _{14:0}	10,20	8,69	11,27
C _{14:1}	0,86	0,65	1,01
C _{15:0}	1,36	1,14	1,66
C _{16:0}	24,10	22,78	25,63
C _{16:1}	1,21	0,87	1,42
C _{18:0}	10,71	9,61	12,19
C _{18:1} ¹	25,78	23,05	28,87
C _{18:2}	1,68	1,28	2,19
C _{18:3}	0,93	0,49	1,43
C _{18:2conj.} ²	1,45	0,85	2,03

¹ Mayoritariamente 9cis (incluye un mínimo porcentaje de los otros ácidos grasos C_{18:1} que se solapan en las corridas cromatográficas. ² Mayoritariamente 9c – 11t (ácido ruménico)

Con estos perfiles obtenidos experimentalmente se simularon perfiles «adulterados», es decir, cada uno de los perfiles de las muestras genuinas de grasas lácteas se mezcló matemáticamente con los perfiles de cada uno de los adulterantes en diferentes porcentajes (2, 5, 10 y 15%), empleando la siguiente ecuación:

$AGn \text{ (en la mezcla)} = \% GL \times AGn \text{ (en la grasa láctea)} + \% A \times AGn \text{ (en la grasa adulterante)}$, donde AGn es g de ácido graso «n»/100g de grasa, % GL es porcentaje de grasa de leche en la mezcla y % A es porcentaje del adulterante en la mezcla.

Estos porcentajes se propusieron para considerar un valor muy bajo de adulteración como es el de 2% y un valor medio como el de 15%, difíciles de detectar con los índices clásicos.

Posteriormente, tomando como base el procedimiento llevado a cabo para la fórmula del TAG, nos propusimos aplicar RLM para obtener ecuaciones que nos permitieran determinar el porcentaje de adulteración con grasas porcina, vacuna, aceite de girasol, de soja y grasa de coco. Para ello, los perfiles de AG obtenidos experimentalmente por GC para las grasas lácteas genuinas y los perfiles de las grasas «adulteradas» obtenidas por simula-

ción matemática, fueron organizados en forma matricial. Es decir, se tuvo una matriz de concentraciones de AG para cada adulterante en estudio. Estas matrices, denominadas de «calibración», se procesaron por RLM y se obtuvo una ecuación que relacionó el porcentaje de adulteración % A (variable respuesta o dependiente) con los ácidos grasos seleccionados C_i (variables independientes o predictoras), por cada adulterante. El modelo general fue el siguiente:

$$\% A = b_0 + b_1 C_i + \dots + b_n C_k$$

donde b_0, b_1, \dots, b_n son los parámetros de calibración que se estiman procesando por RLM la matriz de calibración para cada adulterante. Posteriormente, para comprobar la habilidad predictiva de las ecuaciones obtenidas, se aplicaron a otras muestras de grasas lácteas que también se habían adulterado matemáticamente y se organizaron en forma matricial, conformando lo que se denominó matriz de «predicción», una para cada adulterante. Con los modelos obtenidos se lograron detectar adulteraciones iguales o mayores al 10 % para grasa vacuna, del 5 % para grasa porcina y del 2 % para las materias grasas vegetales. Como se puede observar, el límite de detección para la grasa bovina es mayor que para las restantes grasas. De acuerdo con los datos reportados por otros autores (Ulberth, 1994, 1995; Kumar y col., 2009), la detección de adulteraciones de grasa bovina en grasa láctea es un gran desafío analítico ya que la gran similitud en los perfiles de AG impide la detección de bajos niveles. Es decir, cuanto más diferentes son los perfiles de AG entre la grasa láctea y la grasa adulterante, más fácil es la detección de una adulteración (Ulberth, 1994).

Adulteración de leche en polvo con suero de quesería

El suero (o lactosuero) obtenido como subproducto de la producción de quesos y caseinatos es usualmente muy empleado como adulterante ya que aporta proteínas (de suero) a bajo costo y no afecta adversamente la percepción sensorial del producto (Neelima y col., 2013). Por ello, se ha dado especial atención a la detección de suero que se adiciona de forma fraudulenta a la leche o productos lácteos, en especial leche en polvo y leche fluida UHT.

Metodologías analíticas utilizadas para el estudio de la adulteración de leche con suero en polvo

Diversos procedimientos analíticos han sido desarrollados con este propósito. Los métodos tradicionales se basan principalmente en la determinación de la relación proteínas de suero/proteína total (PS/PT) y en el análisis del caseinomacropéptido (CMP) o del ácido siálico asociado al mismo. En los últimos años, con los avances alcanzados en la instrumentación y análisis de los datos, nuevos métodos han sido propuestos.

Determinación de la relación PS/PT

Estos métodos se basan en la diferencia composicional entre el suero y la leche, y determinan por diversos procedimientos la relación entre las caseínas y las proteínas de suero o la relación proteínas de suero y proteína total (PS/PT).

Se clasifican en métodos directos e indirectos (Oancea, 2009). La determinación directa se basa en la separación de los diferentes componentes proteicos aplicando efectivos pero laboriosos métodos electroforéticos, cromatográficos e inmuniturbidimétricos, mientras que los ensayos indirectos evalúan ciertas fracciones de proteínas aplicando análisis electroforéticos, polarográficos y la espectroscopía visible o UV derivativa. En particular, el uso de la cuarta derivada del espectro de absorción para la determinación rápida de proteínas de suero y caseínas ha mostrado ser un indicador muy sensible para detectar adición de suero de quesería en leches UHT (Ramírez Ayala y col., 2009).

Investigación de la presencia de CMP

La detección y cuantificación del caseinomacropéptido (CMP) o también denominado glicomacropéptido (GMP) se considera un buen marcador del agregado del suero de quesería al ser un componente específico del mismo, encontrándose en muy bajos niveles en la leche no adulterada. La acción del cuajo o quimosina (proteasa) sobre el enlace Phe 105–Met 106 de la κ -caseína durante la elaboración de los quesos coagulados enzimáticamente genera un grupo de péptidos; lo que se conoce como CMP o GMP corresponde a la fracción terminal de residuos Met 106–Val 169 y contienen 64 residuos aminoácidos (Manso y López–Fandiño, 2004). El CMP es considerado un grupo heterogéneo de polipéptidos debido a la existencia de variantes genéticas y modificaciones posttraduccionales tales como fosforilación y glicosilación. Por otro lado, diversas enzimas pueden atacar otros enlaces peptídicos de la κ -caseína. Se ha reportado que las proteasas de la pared celular de la mayoría de las bacterias lácticas

usadas como fermentos pueden romper el enlace Met 106–Ala 107, liberando por lo tanto, un péptido más corto. Del mismo modo, las bacterias psicrotrofas son capaces de crecer en leche durante el almacenamiento refrigerado produciendo enzimas termoestables que hidrolizan la κ -caseína en diferentes enlaces. También se ha reportado que la quimosina y algunas proteasas de las bacterias lácticas podrían hidrolizar los CMP en el enlace Arg 160–Thr 161 particularmente a pH ácidos (Manso y López-Fandiño, 2004).

El CMP es el único glicopéptido de la leche, y contiene diferentes cantidades y tipos de oligosacáridos unidos covalentemente a la cadena aminoacídica, tales como ácidos *N*-acetilneuramínico (NANA) o ácidos siálicos, galactosa (Gal) y *N*-acetilgalactosamina (Gal–NAC) (Thomä–Worringer y col., 2006). Se estima que al menos 5 cadenas de azúcares diferentes se encuentran presentes en el CMP bovino unidos a través de enlaces *O*-glicosídicos a los residuos de Ser o Thr.

Las metodologías analíticas tradicionales para la identificación y cuantificación del CMP incluyen electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE–SDS), electroforesis capilar (CE) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), entre otras.

Diversos trabajos reportan el uso de PAGE–SDS para detectar la adulteración de leche con suero de quesería (Galindo–Amaya y col., 2006; Ramírez Ayala y col., 2009). Esta metodología permite detectar la adulteración de suero en leche en polvo y fluida, en niveles superiores al 2% (p/p). Del mismo modo, los métodos de CE han mostrado ser altamente confiables en la detección de suero en leches fluidas (Van Riel y Olieman, 1995; Recio y col., 2000).

La metodología de HPLC en fase reversa (RP–HPLC) con detección UV y fluorimétrica se ha aplicado con buenos resultados en la detección de suero en leches fluidas (Fukuda y col., 2004; Ramírez Ayala y col., 2009; Neelima y col., 2012) y leche en polvo descremada (Ferreira y Oliveira, 2003).

Estas metodologías, en general, tienen como desventajas el hecho de dar falsos positivos en el caso de leches refrigeradas en las que hayan desarrollado una elevada población de bacterias psicrotrofas, las cuales poseen proteasas que liberan péptidos de características similares al CMP.

Para el análisis de leche en polvo adulterada con suero, la Comisión Europea adoptó el RP–HPLC como uno de los métodos oficiales (CEE N° 213/2001, Anexo XVIII). De igual modo, el Ministerio de Agricultura de Brasil en 2006 estableció la cuantificación del CMP por cromatografía líquida de alta resolución–filtración por gel (HPLC–GF) como un método oficial, y se ha aplicado con éxito al análisis de bebidas de leche fermentada (Andrade y col., 2014).

Recientemente, nuevas estrategias basadas en ensayos inmunológicos han sido desarrolladas para analizar CMP tales como inmunoensayos con un biosensor,

inmunoblot, test inmunocromatográficos y ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Estas técnicas son en general más rápidas, sensibles y precisas que los métodos tradicionales debido a la alta especificidad de los anticuerpos hacia un antígeno. De este modo, el altamente sensible método ELISA resultó satisfactorio en la detección de suero líquido en leche cruda (Chávez y col., 2012). También se ha reportado el uso de un inmunoensayo mediante la técnica de *western blot* usando anticuerpos policlonales anti-GMP para detectar este péptido en diversos productos lácteos (Chávez y col., 2010).

La compañía OPERON desarrolló un test inmunocromatográfico rápido (Immunostick c-GMP) basado en anticuerpos monoclonales contra el GMP. Este procedimiento se aplicó satisfactoriamente al análisis de muestras de leche cruda, procesada, leche condensada, leche en polvo, bebidas lácteas, etc. (Oancea, 2009). Este test puede detectar 15–30 µg/mL de suero adicionado a la leche.

Investigación de la presencia del ácido siálico asociado al CMP

El CMP contiene casi la totalidad de los ácidos siálicos de las caseínas, razón por la cual, la concentración de los mismos se considera como un indicador del CMP presente.

En este caso la muestra es usualmente tratada con ácido tricloroacético (TCA) para precipitar proteínas interferentes y con ácido fosfotúngstico (PTA) para precipitar el CMP. Luego el CMP precipitado se hidroliza en medio ácido para liberar los ácidos siálicos y estos últimos son determinados por diferentes métodos. Los métodos colorimétricos se basan en la reacción de los ácidos siálicos con reactivos tales como el ácido tiobarbitúrico (Warren, 1959), el resorcinol (Svennerholm, 1957) y la ninhidrina ácida (Fukuda y col., 2004).

La Comunidad Económica Europea (CEE) adoptó a partir de 1981 la determinación de ácidos siálicos con el reactivo resorcinol como método de referencia para detectar la adición de suero a leche en polvo. En este caso se cuantifican solo los ácidos siálicos asociado al GMP, lo que es conocido como ácido siálico libre.

En 2003, el Ministerio de Agricultura de Brasil aprobó como oficial la técnica colorimétrica basada en la reacción de ácidos siálicos con la ninhidrina ácida. Este método ha mostrado ser rápido y eficiente para la detección de adición fraudulenta de suero a leche, y permite cuantificar tanto el ácido siálico libre como enlazado a glicoproteínas (Fukuda y col., 2004).

Otros métodos

El alto número de interferencias y falsos positivos que se suelen presentar con la aplicación de las técnicas tradicionales ha impulsado en la última década

el desarrollo de sofisticados métodos instrumentales, y por tanto más costosos y que requieren personal calificado. La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) permite distinguir entre el CMP adicionado y el generado por la acción de diversas proteasas (Abernethy y Higgs, 2013; la microespectroscopía del infrarojo medio (MIR) y análisis quimiométrico mostró ser un método de *screening* para detectar diversos adulterantes, entre ellos el suero (Aparecida de Carvalho y col., 2015) y la espectroscopía de descomposición inducida por láser (LIBS) también se ha aplicado satisfactoriamente a la detección de suero en leche en polvo (Bilge y col., 2016). Finalmente, se han propuesto estudios sensométricos para identificar descriptores sensoriales que caractericen muestras de leche adulteradas con suero. Las muestras son luego evaluadas por análisis descriptivo y los datos son analizados usando métodos estadísticos multivariados. Sin embargo, los resultados inconsistentes obtenidos mostraron una limitada contribución de este procedimiento para investigar la autenticidad de la leche (Aquino y col., 2014).

Resultados de nuestro grupo de investigación

En el INLAIN las primeras investigaciones relacionadas con la adulteración de leche en polvo con suero datan de 1980. En un primer momento se implementó el método adoptado por la Comunidad Europea que se basa en la determinación del ácido siálico libre para detectar el agregado de suero en polvo a productos alimenticios tales como leche en polvo y dulce de leche (Zalazar y col., 1988).

Posteriormente, se hicieron estudios sobre el efecto de la conservación en frío de la leche en los niveles de ácido siálico (Zalazar y col., 1992) y sobre el uso de los valores de ácido siálico durante la fase primaria de la coagulación enzimática de la leche como un modo eficaz y sencillo de seguir la cinética de dicha reacción (Zalazar y col., 1996).

La determinación del ácido siálico en diversos productos lácteos ha permitido establecer rangos de valores para los productos genuinos (no adulterados). Por otra parte, teniendo en cuenta que el ácido siálico es un compuesto bioactivo clave en el desarrollo neuronal de los niños, actualmente se está trabajando en la determinación del ácido siálico en ingredientes lácteos (leche en polvo, concentrados y aislados proteicos) y en yogures elaborados con los mismos, y en el análisis del potencial bioactivo de estos productos, tales como la actividad anticariogénica y la absorción de ca.

Referencias bibliográficas

- Abernethy, G. y Higgs, K. (2013).** Rapid detection of economic adulterants in fresh milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1288, 10–20.
- Abernethy, G.A.; Bendall J.G. y Holroyd S.E. (2016).** Advances in Testing for Adulteration and Authenticity of Dairy Products. Cap. 17. Woodhead Publishing Series in *Food Science, Technology and Nutrition*, Sawston, Cambridge, 461–490.
- Andrade, E.; Sousa, M.; Fonseca, L.; Penna, C.; Cerqueira, M.; Roza, T.; Seridán, B.; Resende, M.; Pinto, F.; Villanueva, C. y Leite, M. (2014).** Detection of cheese whey and caseinomacropeptide in fermented milk beverages using high performance liquid chromatography. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66, 959–964.
- Aparecida de Carvalho, B.; Millena de Carvalho, L.; dos Reis Coimbra, J.; Minim, L.; de Souza Barcellos, E.; da Silva Júnior, W.; Detmann, E. y de Carvalho, G. (2015).** Rapid detection of whey in milk powder samples by spectrophotometric and multivariate calibration. *Food Chemistry*, 174, 1–7.
- Aquino, L.; Silva, A.; Freitas, M.; Felício, T.; Cruz, A. y Conte-Junior, C. (2014).** Identifying cheese whey an adulterant in milk: Limited contribution of a sensometric approach. *Food Research International*, 62, 233–237.
- Azadmard-Damirchi, S. y Torbati, M. (2015).** Adulterations in Some Edible Oils and Fats and Their Detection Methods. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 2, 38–44.
- Bilge, G.; Sezer, B.; Eseller, K.; Berberoglu, H.; Topcu, A. y Boyaci, I. (2016).** Determination of whey adulteration in milk powder by using laser induced breakdown spectroscopy. *Food Chemistry*, 212, 183–188.
- Chávez, N.; Salinas, E.; Jauregui, J.; Palomares, L.; Bon Rosas, F. (2010).** Detección de glicomacropéptido (GMP) en leche y productos lácteos mediante Western Blot. *XII Congreso Nacional De Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 621–626.
- Chávez, N.; Jauregui, J.; Palomares, L.; Macías, K.; Jiménez, M. y Salinas, E. (2012).** A highly sensitive sandwich ELISA for the determination of glycomacropeptide to detect liquid whey in raw milk. *Dairy Science and Technology*, 92, 121–132.
- Čížková, H.; Rajchl, A.; Šnebergrová, J.; Voldřich, M. (2013).** Filbertone as a Marker for the Assessment of Hazelnut Spread Quality. *Czech J. Food Sci*, 31(1), 81–87.
- Destailats, F.; Wispelaere, M.; Joffre, F.; Golay, P.; Hug, B.; Giuffrida, F.; Fauconnot, L. y Dionisi F. (2006).** Authenticity of milk fat by fast analysis of triacylglycerols. Application to the detection of partially hydrogenated vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 1131, 227–234.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1981).** Presencia de suero de leche en polvo en la leche desnatada en polvo destinada al almacenamiento público mediante la determinación del ácido siálico libre. Reglamento CEE N° 2188/81. Anexo IV.
- Diario Oficial de las comunidades Europeas (2001).** Detection of rennet whey in skimmed-milk powder for public storage by determination of glycomacropeptides high-performance liquid chromatography (HPLC). Reglamento ECC N° 213, Anexo XVIII.
- Ferreira, I. y Oliveira, M. (2003).** Determination of caseinomacropeptide by an RP-HPLC method and monitoring of the addition of rennet whey to powdered milk. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 26(1), 99–107.
- Fontecha, J.; Mayo, I.; Toledano, G. y Juárez, M. (2006).** Triacylglycerol Composition of Protected Designation of Origin Cheeses During Ripening. Authenticity of Milk Fat. *Journal of Dairy Science*, 89(3), 882–887.
- Fontecha, J.; Juárez, M. y de la Fuente, M. (2019).** Triacylglycerols in Dairy Foods. Chapter 7. En: Nollet, L. y Toldra, F. (Eds.), *Handbook of Dairy Foods Analysis*. CRC Press.
- Fukuda, S.; Roig, S. y Prata, L. (2004).** Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. *Lait*, 84, 501–512.
- Galindo-Amaya, L.; Valbuena-Colmenares, E. y Rojas-Villaruel, E. (2006).** Standardization of glycomacropeptide detection with SDS-PAGE as a milk adulteration Index. *Revista Científica de Veterinaria*, 16(3), 308–314.

- Goudjil, H., Fontecha, J., Fraga, M., y Juárez, M. (2003).** TAG composition of ewe's milk fat. Detection of foreign fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(3), 219–222.
- ISO/IDF 17678:2010/202 (2010).** Milk and Milk Products –Determination of Milk Fat Purity by Gas Chromatographic Analysis of Triglycerides (Reference Method).
- Jensen, R. (2002).** The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci*, 85, 295–350.
- Kumar, A.; Lal, D.; Seth, R. y Sharma, V. (2009).** Apparent solidification time test for detection of foreign oils and fats adulterated in clarified milk fat as affected by season and storage. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 33–38.
- . (2010). Detection of milk fat adulteration with admixture of foreign oils and fats using a fractionation technique and the apparent solidification time test. *Int. J. Dairy Technol*, 63, 457–462.
- Lopez, C. (2011).** Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16, 391–404.
- MacGibbon, A.K.H. y Taylor, M.W. (2006).** Composition and Structure of Bovine Lipids. En: Fox, P y McSeeney, P. *Advanced Dairy Chemistry*. Capítulo 1, volume 2, Lipids. 3^o Edition. Springer, Estados Unidos.
- Manso, M. y López-Fandiño, R. (2004).** κ -casein macropeptides from cheese whey: physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Reviews International*, 20(4), 329–355.
- Montenegro, I. (2016).** *Análisis económico productivo de una empresa agropecuaria*. (Tesina Especialización en Buiatría) UNL.
- Nascimento, C.; Santos, P.; Rodrigues Pereira-Filho, E. y Rocha, F. (2017).** Recent advances on determination of milk adulterants. *Food Chemistry*, 22, 1232–1244.
- Neelima, S.; Rao, P.; Sharma, R. y Rajput, S. (2012).** Direct estimation of sialic acid in milk and milk products by fluorimetry and its application in detection of sweet whey adulteration in milk. *Journal of Dairy Research*, 79(4), 495–501.
- Neelima, S.; Rajput, S. y Mann, B. (2013).** Chemical and functional properties of glucomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review. *Dairy Science and Technology*, 93(1), 21–43.
- Ntakatsane, M.; Liu, X. y Zhou, P. (2013).** Rapid detection of milk fat adulteration with vegetable oil by fluorescence spectroscopy. *J. Dairy Sci*, 96, 2130–2136.
- Oancea, S. (2009).** Identification of glucomacropeptide as indicator of milk and dairy drinks adulteration with whey by immunochromatographic assay. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1), 4146–4151.
- Páez, R.; Cuatrin, A.; Taverna, M.; Moretto, M. y Campos, S. (2006).** Estudio de la composición de ácidos grasos en leche cruda de diferentes tambos de la Argentina. Porto Alegre Brasil. 9^o Congreso Panamericano de Leite.
- Park, J.-M.; Kim, N.-K.; Yang, C.-Y.; Moon, K.-W. y Kim, J.-M. (2014).** Determination of the Authenticity of Dairy Products on the Basis of Fatty Acids and Triacylglycerols Content using GC Analysis. *Korean J. Food Sci. An.*, 34(3), 316–324.
- Poonia, A.; Jha, A.; Sharma, R.; Singh, H.; Rai, A. y Sharma, N. (2017).** Detection of adulteration in milk: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 70(1), 23–42.
- Precht, D. (1992a).** Detection of foreign fat in milk fat. I. Qualitative detection by triacylglycerol formulae. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, 194, 1–8.
- . (1992b). Detection of foreign fat in milk fat. II. Quantitative evaluation of foreign fat mixtures. *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, 194, 107–114.
- Ramírez Ayala, A.; Vega y León, S.; Prado Flores, G. y Gutiérrez Tolentino, R. (2009).** Aplicación de tres métodos analíticos para la detección de suero de quesería en leche UHT comercializada en la ciudad de México. *Interciencia*, 34(6), 406–412.
- Rebecchi, S.R. (2009).** *Determinación de la Genuinidad de la Grasa Láctea Bovina a través de la Interpretación Estadística de Análisis por Cromatografía Gaseosa*. (Tesis Magíster), UNL.
- Rebecchi, S.R.; Vélez M.A.; Vaira, S. y Perotti, M.C. (2016).** Adulteration of Argentinean milk fats with animal fats: detection by fatty acids analysis and multivariate regression techniques. *Food Chemistry*, 192, 1025–1032.

- Recio, I.; García-Risco, M.; López-Fandiño, R.; Olano, A. y Ramos, M. (2000).** Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. *International Dairy Journal*, 10, 333–338.
- Svennerholm, L. (1957).** Quantitative estimation of sialicacids. II A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochimica et Biophysica Acta*, 24(3), 604–611.
- Thomä-Worringer, C.; Sørensen, J. y López-Fandiño, R. (2006).** Health effects and technological features of caseinmacropeptide. *International Dairy Journal*, 16, 1324-1333.
- Timms, R.E. (1980)** Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats. *Journal of Dairy Research*, 47, 295–303.
- Ulberth, F. (1994).** Detection of milk fat adulteration by linear discriminant analysis of fatty acid data. *Journal of AOAC International*, 77, 1326–1334.
- . (1995). Quantitation of Foreign Fat/Milkfat Mixtures by Multivariate Regression Analysis of Fatty Acid Data. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 43, 1556–1560.
- . (2000). Testing the authenticity of milk and milk products. Chapter 10. En: Smit, G. (Ed.). *Dairy Processing. Improving Quality*. CRC Press.
- van Riel, J. y Olieman, C. (1995).** Determination of caseinomacropeptide with capillary zone electrophoresis and its application to the detection and estimation of rennet whey solids in milk and buttermilk powder. *Electrophoresis*, 16, 529–533.
- van Ruth, S.; Bremer, M. y Frankhuizen, R. (2010).** Detection of adulterations: addition of foreign lipids and proteins.. Chapter 34. En: Nollet, L. y Toldra, F. (Eds.). *Handbook of Dairy Foods Analysis*. CRC Press.
- Warren, L. (1959).** The thiobarbituric acid assay of sialicacids. *The Journal of Biological Chemistry*, 234, 1971–1975.
- Yoshinaga, K.; Nagai, T.; Mizobe, H.; Kojima y K., Gotoh, N. (2013).** Simple method for the quantification of milk fat content in foods by LC-APCI-MS/MS using 1,2-dipalmitoyl-3-butyroyl-glycerol as an indicator. *Journal of Oleo Science*, 62(3), 115–121.
- Zalazar, C.; Meinardi, C., Bazán, J. y Bernal, S. (1988).** Detección del agregado de suero de leche en polvo a productos alimenticios mediante la determinación del ácido siálico. *Parte II. La Alimentación Latinoamericana*, 21(17), 22–25.
- Zalazar, C.; Meinardi, C.; Palma, S.; Suárez, V. y Reinheimer, J. (1992).** Aumento del ácido siálico libre durante la conservación en frío de la leche. *Revista Argentina de Lactología*, 7, 35–46.
- Zalazar, C.; Hynes, E.; Meinardi, C.; Palma, S.; Bernal, S. y Notaro, H. (1996).** La concentración de ácido siálico libre como variable cinética para el análisis de la fase primaria de la coagulación enzimática de la leche. *Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 14, 155–160.

Sobre los autores

Elisa Carmen Ale · Doctora en Ciencias Biológicas (UNL). Investigadora Asistente (CONICET), Área de Microbiología del INLAIN (UNL–CONICET).

Gabriela Ma. del Luján Audero · Licenciada en Tecnología de los Alimentos (FCV, UNR). Profesional de Gestión Externa INTA. Docente colaboradora de la Maestría en Tecnología de los Alimentos (UTN Buenos Aires) y de la Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (UNSL).

Carina Viviana Bergamini · Doctora en Ciencias Biológicas (UNL). Investigadora Adjunta (CONICET), Área de Química y Bioquímica (INLAIN). Jefe de Trabajos Prácticos (FIQ, UNL).

Ana Binetti · Doctora en Química (UNL). Investigadora Independiente (CONICET), Área de Microbiología (INLAIN). Jefe de Trabajos Prácticos (FIQ, UNL).

Mariángeles Briggiler Marcó · Doctora en Ciencias Biológicas (UNL). Investigadora Asistente (CONICET), Área de Microbiología (INLAIN).

Patricia Burns · Doctora en Ciencias Biológicas (UNL). Investigadora Adjunta (CONICET), Área de Microbiología (INLAIN). Profesora Adjunta (FIQ, UNL).

Mario César Candiotti · Magíster en Ciencias de Alimentos (UNL). Profesor Adjunto (FIQ, UNL). Área de Tecnología (INLAIN).

María Luján Capra · Doctora en Ciencias Biológicas (UNL). Investigadora Adjunta (CONICET), Área de Microbiología (INLAIN). Jefe de Trabajos Prácticos (FIQ, UNL).

Carolina Andrea Chiericatti · Magíster en Ciencias y Tecnología de Alimentos (UNL). Jefe de Trabajos Prácticos (FIQ, UNL).

Luciana María Costabel · Doctora en Ciencias Biológicas (UNL). Profesional de Gestión Externa (INTA).

- Facundo Cuffia** · Doctor en Tecnología Química (UNL). Investigador Asistente (CONICET), Área de Tecnología (INLAIN). Profesor Adjunto (FIQ, UNL).
- Laura Noemí Frisón** · Magíster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (UNL). Profesora Adjunta (FIQ, UNL).
- Paula Giménez** · Licenciada en Química (UNL). Becaria doctoral (CONICET), Área de Química y Bioquímica (INLAIN).
- Guillermo Andrés George** · Ingeniero Químico (UNL). Profesional Adjunto (CONICET), Área de Tecnología (INLAIN).
- Daniela Guglielmotti** · Doctora en Ciencias Biológicas (UNL). Investigadora Adjunta (CONICET), Área de Microbiología (INLAIN). Jefe de Trabajos Prácticos (FIQ, UNL).
- Erica Hynes** · Doctora en Química (UNL). Investigadora independiente (CONICET), Área de Química y Bioquímica (INLAIN). Profesora titular (FIQ, UNL).
- Desireé Lloréns** · Técnica en Análisis Clínico (UADER). Técnica en Industrias Alimentarias (UTN). Personal de Apoyo a la Investigación (CONICET), Área de Microbiología (INLAIN).
- Carlos Meinardi** · Ingeniero Químico (UNL). Ex Profesor Titular (FIQ, UNL), Área de Tecnología (INLAIN).
- Diego Javier Mercanti** · Doctor en Ciencias Biológicas (UNL). Investigador Adjunto (CONICET), Área de Microbiología (INLAIN). Jefe de Trabajos Prácticos (FIQ, UNL).
- Roxana Beatriz Páez** · Doctora en Ciencias Exactas (UNLP). Investigadora INTA. Responsable Técnico de la Incubadora INTA Rafaela de Empresas de base tecnológica.
- Guillermo Hugo Peralta** · Doctor en Química (UNL). Investigador Asistente (CONICET), Área de Química y Bioquímica (INLAIN). Ayudante de Cátedra (UNL).

María Cristina Perotti · Doctora en Química (UNL). Investigadora Independiente (CONICET), Área de Química y Bioquímica (INLAIN). Profesora Adjunta (FIQ, UNL).

Silvina Alicia Pujato · Doctora en Ciencias Biológicas (UNL). Investigadora Asistente (CONICET), Área de Microbiología (INLAIN).

Andrea Quiberoni · Doctora en Química (UNL). Investigadora Principal (CONICET), Área de Microbiología (INLAIN). Profesora Adjunta (FIQ, UNL).

Silvina Rebecchi · Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos (UNL). Jefe de Trabajos Prácticos (FIQ, UNL). Área de Química y Bioquímica (INLAIN).

Viviana Suárez · Magister en Ciencia de Alimentos (UNL). Jefe de Trabajos Prácticos (FIQ, UNL). Área de Microbiología (INLAIN).

Sergio Vaudagna · Doctor en Ingeniería Química (UNL). Investigador Independiente (CONICET), Instituto Tecnología de Alimentos (INTA Castelar). Profesor Titular (FICE, UADE; FACAUM).

María Ayelén Vélez · Doctora en Ciencias Biológicas (UNL). Investigadora Asistente (CONICET), Área de Química y Bioquímica (INLAIN). Ayudante de cátedra (FIQ, UNL).

Claudia Vénica · Doctora en Tecnología Química (UNL). Investigadora Asistente (CONICET), Área de Química y Bioquímica (INLAIN). Ayudante de Cátedra (FIQ, UNL).

Gabriel Vinderola · Doctor en Química (UNL). Investigador Independiente (CONICET), Área de Microbiología (INLAIN). Profesor Asociado (FIQ, UNL).

Irma Verónica Wolf · Doctora en Química (UNL). Investigadora Adjunta (CONICET), Área de Química y Bioquímica (INLAIN). Jefe de Trabajos Prácticos (FIQ, UNL).

María Sol Ortiz (colaboradora) · Licenciada en Dirección de Negocios (Universidad de Ciencias Empresariales y Sociales). Secretaria Administrativa (CONICET), INLAIN.

**UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL LITORAL**