

## **Capítulo 4 - Cultivos adjuntos de quesería a partir de cepas de origen NSLAB**

Guillermo H. Peralta, Carina V. Bergamini, I. Verónica Wolf, Mario Candiotti, Gabriela Audero, Roxana Páez, Paula Giménez, M. Cristina Perotti y Erica R. Hynes.

### **1. 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 fermento 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  $\kappa$ -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).

### **2. 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 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 crecer 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.

## **2.1. 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 oxido-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* I91, *L. paracasei* I90, *L. rhamnosus* I73, *L. rhamnosus* I77 y *L. casei* I72), 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 (Galetto y col., 2007; Milesi y col., 2008a,b, 2009, 2010; Bergamini y col., 2013; Peralta y col., 2014; Peralta y col., 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* I90 en queso Cremoso ( $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$ , y  $5 \times 10^6$  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  $9 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^6$  y  $8 \times 10^7$  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* I91 y *L. paracasei* I90, adicionadas como fermentos adjuntos en quesos Cremoso y Pategrás, no causaron un exceso de acidificación. Por el contrario, *L. rhamnosus* I73 y I77 causaron una post-acidificación durante la maduración en ambos tipos de quesos, excepto la cepa I77 en el queso Pategrás (Milesi y col., 2009). En un estudio posterior, se evaluó la aplicación de la cepa I90 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 I90 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 cortes en la cadena de frío (Porcellato y col., 2015; O'Sullivan y col., 2016). En relación a 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, causado 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* I90 y de *L. plantarum* I91 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 I90, 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* I90, *L. plantarum* I91 y *L. casei* I72 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).

## **2.2. 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* (I73 y I77) 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* I90 y *L. plantarum* I91 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* I90 y *L. casei* I72, 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* I91, 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* I90 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.

### **2.3. 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  $\alpha$ -cetoácidos debido a la transferencia del grupo  $\alpha$ -amino a un aceptor adecuado, generalmente  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG). El  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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*. En 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* I90 y *L. casei* I72, 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* I90, en la que predominó la actividad AspAT, produjo diacetilo y acetoína, compuestos que pueden derivar del catabolismo del Asp. *L. casei* I72, 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* I90 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 ( $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$ , y  $5 \times 10^6$  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* I91 también aumentó los niveles de diacetilo y acetoína, 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* I90 como para *L. plantarum* I91 (Milesi y col., 2010).

#### **2.4. 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  $\beta$ -galactosidasa. Siete de estas cepas se seleccionaron como los mejores candidatos para el desarrollo de alimentos fermentados probióticos: *L. plantarum* I91, I87 y I89, *L. rhamnosus* I73 y I75, *L. curvatus* I34 y *L. paracasei* I90 (Bude-Ugarte y col., 2006; Briggiler-Marcó y col., 2007). El potencial probiótico de las cepas *L. plantarum* I91 y *L. paracasei* I90 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).

## **2.5. 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 decarboxilasas 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 diaminooxidasas. 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* I90, 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*, *Oenococcus oeni*, entre otras (García-Ruiz y col., 2011).

### **3. 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 lácticos 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* I90 y *L. plantarum* I91). 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* 90, 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 re-evaluar la performance de un fermento adjunto cuando el mismo es obtenido a partir de otro medio de cultivo.

## 6. Referencias

Bergamini, C. V.; Peralta, G. H.; Milesi, M. M. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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 del sitio web <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 pseudocuajada 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.; and 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. and 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.; and 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. and 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. and 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. and 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. and Alvarez M. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition and Food Science*, 6, 145-156.

Lorenzo, J. M.; Sichetti-Munekata P. E. and 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.; Alvarez, E.; Pesce de Ruiz Holgado, A.; Oliver, G. and Sesma, E. (2000). Citrate utilization by homo- and heterofermentative lactobacilli. *Microbiological Research*, 154, 313-320.

Milesi, M. M.; McSweeney, P. L. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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.; 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.

Peralta, G. H.; Bergamini, C. V. and Hynes, E. R. (2016a). Aminotransferase and glutamate dehydrogenase activities in lactobacilli and streptococci. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 741-748.

Peralta, G. H.; Bergamini, C. V.; Audero, G.; Páez, R.; Wolf, I. V.; Perotti, M. C. and 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. H.; Wolf, I. V.; Bergamini, C. V.; Perotti, M. C. and Hynes, E. R. (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. H.; Wolf, I. V.; Perotti, M. C.; Bergamini, C. V. and 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.; Bergamini, C.; Costabel, L.; Audero, G.; Perotti, M. C. y Hynes, E. (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.

Porcellato, D.; Johnson, M. E.; Houck, K.; Skeie, S. B. ; Mills, D. A. ; Kalanetra, K. M. and Steele, J. L. (2015). Potential of *Lactobacillus curvatus* LFC1 to produce slits in Cheddar. *Food Microbiology*, 49, 65-73.

Santivarangkna, C.; Kulozik, U. and Foerst, P. (2007). Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress*, 23, 302-315.

Settanni, L. and 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. and 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 (pp. 392-433). Amsterdam: Elsevier.

Vinderola, G.; Binetti, A., Burns, P. and Reinheimer, J. (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, Canada.

Williams, A. G.; Noble, J. and 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. and 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. and 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. and Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11, 185-201.