

17. Ciencia, tecnología e innovación

Innovación tecnológica para la incorporación de lactobacilos probióticos en quesos frescos de pasta hilada. Estudios de funcionalidad.

Godoy, Lucas¹; Burns, Patricia²

¹autor; ²directora

¹ lgodoy@fiq.unl.edu.ar; ² burns_patricia@hotmail.com

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN-UNL-CONICET)

Universidad Nacional del Litoral

Resumen

Un alimento funcional es aquel que ejerce un efecto benéfico en el consumidor, más allá de la nutrición básica. Esto se puede lograr mediante la adición de microorganismos probióticos. En el trabajo se elaboraron quesos de pasta hilada adicionados de los probióticos (*Lactobacillus acidophilus* LA5 *Lactobacillus rhamnosus* GG) de manera individual o conjunta. Los objetivos particulares fueron: evaluar la viabilidad de las cepas probióticas durante la elaboración y maduración de los quesos, determinar su influencia sobre parámetros químicos (composición global y pH) y sensoriales y, evaluar la funcionalidad mediante ensayos *in vivo*. Ambos probióticos se mantuvieron viables por encima de 10^8 UFC/g durante la vida útil. La composición global y el pH no se modificaron respecto al queso control y todas las muestras tuvieron buena aceptabilidad global en el análisis sensorial. En cuanto al ensayo *in vivo*, no se observó translocación bacteriana a hígado, garantizando la seguridad del producto y se observó un incremento significativo de las defensas (IgA secretoria) en fluido intestinal de los animales que recibieron el queso adicionado de *L. acidophilus* LA5.

Actualmente no existen en el mercado quesos de pasta hilada adicionados de probióticos. Esto, sumado a la elevada demanda de alimentos funcionales, convierte a este alimento en un producto innovador y con perspectiva de futura implementación a escala industrial.

Palabras clave: innovación, queso de pasta hilada, probióticos, funcionalidad.

Introducción

En la actualidad, la cultura hacia una alimentación sana y con mayores beneficios va en aumento. Las exigencias

de los consumidores se dirigen hacia la búsqueda de nuevos productos con propiedades funcionales que puedan proporcionar, además del valor nutritivo,

otros componentes que permitan un mejor estado tanto físico como mental, reduciendo así el riesgo de enfermedades y alargando la vida, manteniendo al mismo tiempo su calidad.

Según el Instituto de Tecnólogos Alimentarios (Institute of Food Technologists; IFT, 2014), un alimento funcional es aquel que ejerce un efecto benéfico en el consumidor, más allá de la nutrición básica. Éstos se pueden obtener mediante la adición de microorganismos probióticos que se definen como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped” FAO/OMS (2002). Los microorganismos empleados en el presente trabajo (*L. acidophilus* LA5 y *L. rhamnosus* GG) son probióticos comerciales para los cuales se les han demostrado propiedades benéficas (www.chr-hansen.com). No obstante, más allá de conocer efectos benéficos de la cepa pura, cuando se la incorpora en un alimento, es necesario demostrar la funcionalidad del mismo. Algunos de los efectos asociados al consumo de probióticos están relacionados a la capacidad de estimulación del sistema inmunológico, por ejemplo, a través del incremento de las defensas a nivel intestinal (IgA secretoria) o de su capacidad de producir citoquinas anti o proinflamatorias (IL-10/IL-12) (Burns y col., 2017; 2018).

Uno de los factores más importantes para el éxito de cualquier programa de incorporación de probióticos a los alimentos lo constituye la elección del alimento portador. Si bien las leches fermentadas son los productos más utilizados como vehículos para bacterias probióticas, varios trabajos han evaluado a los quesos para la incorporación de estos microorganismos (Bergamini y col., 2006; Buriti y col., 2005; Burns y col., 2015) debido al efecto protector de la matriz durante la elaboración, almacenamiento e ingesta.

Fior di Latte es una variedad de queso de pasta hilada muy comercializada en Europa, principalmente en Italia, y suele consumirse en ensaladas, tablas o platos fríos. El principal desafío de este tipo de quesos cuando se piensa en la adición de una cepa probiótica es la elevada temperatura del agua que se requiere para lograr el hilado de la masa.

En un trabajo reciente del INLAIN (Cuffia y col., 2017) se logró una innovación en la tecnología de elaboración de quesos tipo Fior di Latte, ajustando el tiempo y temperatura de hilado, que permitió la incorporación exitosa de microorganismos probióticos. La originalidad del presente estudio se debe a que existen muy pocos trabajos relativos a la incorporación de probióticos a quesos frescos de pasta hilada (Angiolillo y col., 2014; Minervini y col., 2012; Ortakci y col., 2012) y, a nuestro entender, ninguno en el cual se

evalúe la incorporación y la funcionalidad de más de una cepa probiótica.

Objetivos

- ✓ Seleccionar un medio de cultivo diferencial/selectivo que permita evaluar la viabilidad de los microorganismos probióticos (*L. rhamnosus* GG y *L. acidophilus* LA5) en la matriz láctea durante su maduración.
- ✓ Ajustar la tecnología de elaboración (tiempo – temperatura del proceso de hilado) para mantener la viabilidad de ambas cepas probióticas y características aceptables en el producto final.
- ✓ Determinar la influencia de las bacterias probióticas en los parámetros químicos (composición global y pH) y sensoriales de los quesos.
- ✓ Mediante ensayo *in vivo*, evaluar funcionalidad y estudiar fenómenos asociativos producidos por la adición de más de una cepa probiótica en el queso.

Materiales y métodos

I. Selección de un medio de cultivo selectivo/diferencial

Para el monitoreo de la viabilidad de las bacterias probióticas durante la elaboración y vida útil del queso, es necesario contar con un medio de cultivo (y condiciones de incubación) que permita realizar un recuento diferencial con el fermento primario. Para esto, se evaluó la capacidad de crecimiento de ambas cepas

probióticas (*L. rhamnosus* GG y *L. acidophilus* LA5) junto a *Streptococcus thermophilus* ST114 en diferentes medios de cultivo [MRS, MRS-bilis (bilis bovina, Sigma, 0,15% v/v) y MRS-LP (cloruro de litio 0,2% p/v – propionato de sodio 0,3 % p/v)]. Las placas se incubaron a 37°C en aerobiosis y en anaerobiosis.

II. Tecnología de elaboración

Durante las elaboraciones se empleó leche cruda bovina pasteurizada (120 L). A 39°C se agregó CaCl₂ (0,14 g/L de leche) y el fermento comercial *S. thermophilus* ST114, previamente resuspendido en 100 mL de leche estéril, junto con los microorganismos probióticos a ensayar, de manera individual (*L. rhamnosus* GG o *L. acidophilus* LA5) y conjunta (*L. rhamnosus* GG + *L. acidophilus* LA5). El inóculo de ambas cepas probióticas se adicionó para obtener una concentración en cuajada entre 2 y 6 x 10⁸ UFC/g. Como coagulante se empleó quimosina producida por fermentación. Formado el coagulo se procedió al lirado hasta obtener un tamaño de grano de aprox. 25 mm de arista. A continuación, la acidificación de la cuajada se realizó en dos etapas, bajo suero (40°C) y sobre mesada a temperatura ambiente (~25°C), hasta un pH de 5,8 y 5,2 respectivamente. A continuación, se hiló durante 5 min a 62°C en una hiladora automática de brazos de inmersión (el tiempo y temperatura de hilado utilizados fueron los establecidos

previamente según Cuffia y col., 2017). La masa hilada se colocó en una extrusora mecánica de tornillo helicoidal acoplada a una formadora de cabezal rotativo para formar las pequeñas esferas de 10-20 g. Finalmente, las hormas se enfriaron y salaron por inmersión en salmuera 4% (p/v) durante 20 min. Los quesos fueron madurados en cámara a 4°C durante 15 días bajo vacío. Ambas cepas probióticas fueron provistas por Christian Hansen S/A.

III. Análisis microbiológico

Se estudió la viabilidad de las cepas probióticas (*L. rhamnosus* GG y *L. acidophilus* LA5) y del cultivo iniciador (*S. thermophilus* ST114) durante el proceso de elaboración y la maduración de los quesos. Cada muestra (leche, cuajada o queso) (10 ml o g) se suspendió en 90 mL de citrato de sodio (2% p/v), se homogeneizó (2 min) en Stomacher (Lab-Blender 400) y se realizaron diluciones decimales en agua de peptona (0,1 % p/v). Para el recuento de los microorganismos probióticos, las muestras se sembraron en MRS-bilis (medio de cultivo selectivo previamente seleccionado), y se incubaron 48hs a 37°C, aerobiosis. El recuento del cultivo iniciador se realizó en agar para recuento en placas adicionado de leche (10% p/v) (APV-L), (42°C, 48 hs, aerobiosis).

IV. Análisis fisicoquímicos

A los 15 días de maduración de los quesos almacenados a 4°C se analizó el

contenido de humedad, grasas y proteínas según Cuffia y col., 2017. La determinación del pH se realizó según el método de la American Public Health Association (APHA) utilizando un pHmetro (Orion 3 STAR, Thermo Scientific, Singapore).

V. Análisis estructural

Se analizó la estructura de la matriz casearia por microscopía electrónica de barrido con el objetivo de determinar la distribución de los microorganismos (iniciador y probióticos) y la eficiencia del proceso de hilado (tamaño de las fibras formadas). El mismo se realizó como servicio técnico especializado en el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA – CONICET, Tucumán).

VI. Estudios de funcionalidad

Se emplearon ratones BALB/c machos de 6 semanas de edad (20-23 g) provenientes de la colonia cerrada del Bioterio (certificado por SENASA y ANMAT) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL (Esperanza, Santa Fe). Se trabajó con 5 grupos de 9 ratones cada uno: grupo control bioterio (CB) que recibió sólo agua y comida *ad libitum*, grupo control (GC) que recibió el queso sin adición de probióticos y tres grupos tratados (GT1, GT2 y GT3) que recibieron los quesos adicionados de probióticos (*L. acidophilus* LA5, *L. rhamnosus* GG y *L. acidophilus* LA5 + *L. rhamnosus* GG) (ver Tabla 1). El queso se resuspendió en agua destilada estéril (relación 1,6:1), se

homogenizó en ultratúrrax y se administró por intubación intragástrica (500 µl), durante 10 días consecutivos. Asimismo, todos los animales recibieron agua de red y alimento convencional (Cooperación, Buenos Aires) *ad libitum*. Al final del período de alimentación, los animales fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical.

Tabla 1.

		Grupos ratones					
		CB	QC	QT1	QT2	QT3	
Alimentación	Agua	■	■	■	■	■	
	Alimento convencional	■	■	■	■	■	
	Quesos	control		■			
		QLA5			■		
		QLGG				■	
		QLA5-LGG					■

Como medida de seguridad, se determinó si el suministro de los quesos indujo o no la translocación de la microbiota intestinal normal a hígado (efectos colaterales indeseables); para esto se extrajo el hígado, se homogeneizó en PBS estéril y se determinó la presencia de microbiota intestinal en agar ABRV (agar bilis rojo violeta) (37°C, 24 hs, aerobiosis).

Se extrajo, además, fluido intestinal (mediante dos lavados sucesivos del intestino delgado con buffer PBS estéril) para la determinación de IgA-S e intestino delgado para la determinación de las citoquinas IL-10 e IL-12 en homogenado mediante ELISA sándwich.

VII. Análisis sensorial

Se llevó a cabo un análisis descriptivo cuantitativo por un panel entrenado (3 varones y 9 mujeres de 28 a 60 años). Las

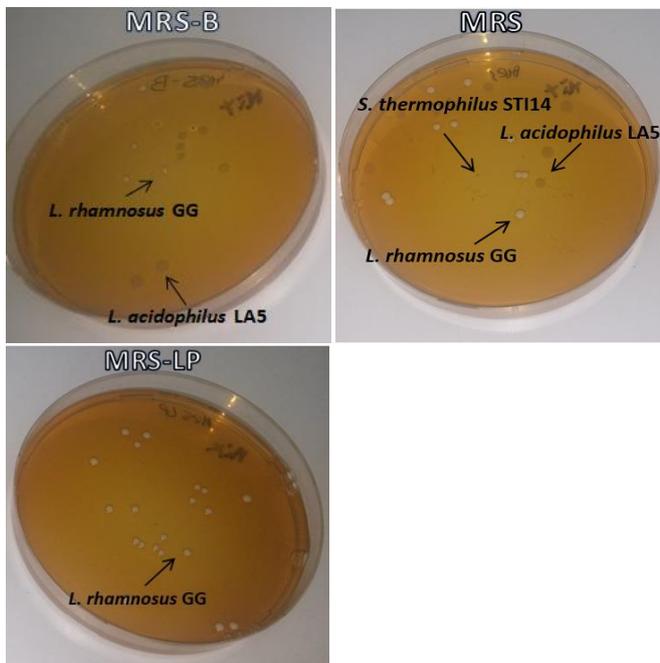
muestras frescas se presentaron aleatoriamente codificadas y a 18 ± 2 °C. Se pidió a los jueces que bebieran agua entre cada muestra para limpiar sus paladares. Las intensidades de los descriptores fueron anotadas en una escala no estructurada de 7 cm de longitud y ancladas en cada extremo. Luego, se midieron las intensidades de cada atributo (gusto dulce, amargo, ácido, salado; color, olor, brillo, uniformidad de la capa superficial, cohesividad, granulosis, resistencia al corte, grado de exudación de suero y sabor residual y global) en su respectiva escala, con el objetivo de asignar un valor para el análisis estadístico. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y en una sala estandarizada (ISO-8589: 1988) del área de Análisis Sensorial del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA- FIQ- UNL). Este ensayo se realizó con quesos elaborados previamente, utilizando metodología descrita en II.

Resultados y discusión

▪ Selección de un medio de cultivo selectivo/diferencial

Al evaluar el crecimiento combinado de las 3 cepas (*S. thermophilus* ST114, *L. rhamnosus* GG y *L. acidophilus* LA5) en los medios de cultivos se observó que: en MRS desarrollaron las 3 cepas; en MRS-LP sólo desarrolló *L. rhamnosus* GG y en MRS-bilis desarrollaron sólo ambos probióticos, con morfología de colonias bien diferenciadas (Figura 1). Por lo

expuesto, MRS-bilis (0,15% v/v) fue el medio seleccionado para los recuentos posteriores.



▪ Tecnología de elaboración

En la Figura 2 se observan los recuentos microbiológicos del cultivo iniciador (*S. thermophilus* ST114) y de las cepas probióticas (*L. acidophilus* LA5 y *L. rhamnosus* GG) en leche, cuajada y en los quesos madurados a 4°C a los 1, 8 y 15 días de almacenamiento.

En relación con el cultivo iniciador se observa que desarrolló más de 2 órdenes log durante la elaboración, alcanzando niveles de 9,55 log UFC/g en la cuajada. Por otro lado, no se observó pérdida de viabilidad luego del hilado y su recuento se mantuvo constante hasta los 15 días de almacenamiento de los quesos a 4°C (9,5 log UFC/g).

El nivel de inóculo en tina de ambas bacterias probióticas, en los tres quesos experimentales, fue de aproximadamente

7,5 log UFC/ml. En la cuajada, antes del hilado, el recuento de ambas cepas fue superior a 8,4 log UFC/g. En los quesos adicionados de *L. rhamnosus* GG (QGG) o de ambas cepas (QGG-LA5), no se observó pérdida significativa de viabilidad luego del hilado y los recuentos luego de 1 día de almacenamiento a 4°C fueron de 8,75 log UFC/g en QGG y de 8,48 y 8,45 log UFC/g para *L. rhamnosus* GG y *L. acidophilus* LA5 en el queso QGG-LA5, respectivamente. En los quesos QLA, luego del hilado, se observó una pérdida de 0,5 órdenes log para *L. acidophilus* LA5, siendo su recuento de 8,06 log UFC/g luego de 1 día de almacenamiento. Por otro lado, la viabilidad de las dos cepas probióticas se mantuvo constante hacia el final de la maduración (15 días), con recuentos superiores a 8 log UFC/g en los tres tipos de quesos.

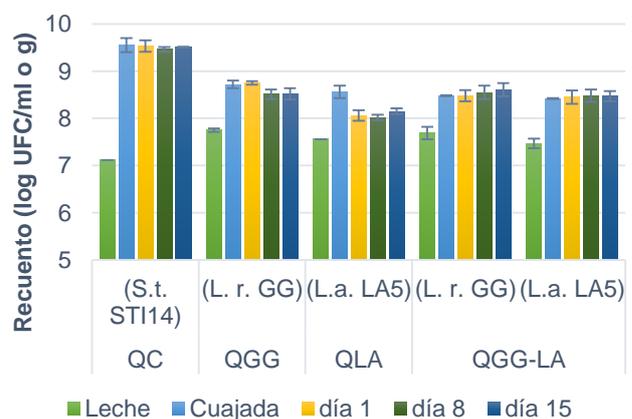


Figura 2. Recuento celular (log UFC/ml o g) del cultivo iniciador (*S. thermophilus* ST114) y de las cepas probióticas (*L. acidophilus* LA5 y *L. rhamnosus* GG) en leche, cuajada y en los quesos madurados a 4°C (tiempo = 1, 8 y 15 días).

Los resultados obtenidos son muy alentadores ya que en los tres tipos de quesos se logró mantener el nivel de viabilidad de las cepas probióticas por encima del valor requerido para un alimento adicionado de probióticos (10^6 - 10^7 UFC/g) (Cuffia y col., 2017).

▪ **Análisis fisicoquímicos**

No se observaron diferencias en la composición global para los 4 tipos de quesos evaluados y los valores coinciden con otros reportados por diferentes autores (Minervini y col., 2012; Ortakci y col., 2012). En la Tabla 2 se observan los resultados obtenidos.

Con relación al pH, los quesos almacenados a 4°C al día 15 de maduración presentaron un valor de $5,19 \pm 0,02$. Esto corrobora la estabilidad del crecimiento de las bacterias lácticas durante la maduración, debido a que no hubo producción de ácido láctico (sobre-acidificación).

Tabla 2. Composición global (g/100 gr queso) de los quesos almacenados bajo vacío durante 15 días a 4°C.

Quesos	Humedad	Grasa	Proteínas
QC	$55,79 \pm 0,30$	$25,66 \pm 0,56$	$20,67 \pm 0,41$
LA5	$53,13 \pm 0,28$	$25,66 \pm 0,36$	$19,43 \pm 0,08$
LGG	$55,37 \pm 0,16$	$24,29 \pm 0,32$	$21,48 \pm 0,21$
LA5-LGG	$54,72 \pm 0,27$	$22,90 \pm 0,12$	$22,00 \pm 0,06$

▪ **Análisis estructural**

Existe una estrecha relación entre la microestructura del queso y su reología,

ambas propiedades a su vez están determinadas por la composición química del queso. El análisis de microestructura es útil cuando se desea evaluar el efecto de diferentes ingredientes en la formulación o el uso de alguna tecnología de procesado y conservación (Buffa y col., 2004). El estudio se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 3) con el fin de determinar la distribución de los microorganismos y la eficiencia del proceso de hilado en los quesos.

En la Figura 3a se observa la estructura del queso al cual sólo se adicionó el cultivo iniciador (*S. thermophilus* STI14). En la misma se observan células con forma de coco (una en división). En la Figura 3b se presenta el queso QGG, al cual se le adicionó *L. rhamnosus* GG. En la micrografía se observan y diferencian las células correspondientes al cultivo iniciador (cocos) y al lactobacilo probiótico (bacilo en división binaria). Por otro lado, se evidencia mayor cantidad de cocos que de bacilos, lo cual se corresponde a la carga microbiana de ambos en el queso. En la Figura 3c se aprecian las hebras producto del proceso de hilado, y adheridas a ellas se encuentran los microorganismos del *starter* (cocos) y *L. acidophilus* LA5 (bacilos). De igual manera en la Figura 3d se visualizan los 3 tipos de microorganismos. Las micrografías permiten apreciar la estructura (red tridimensional) característica de este tipo de quesos.

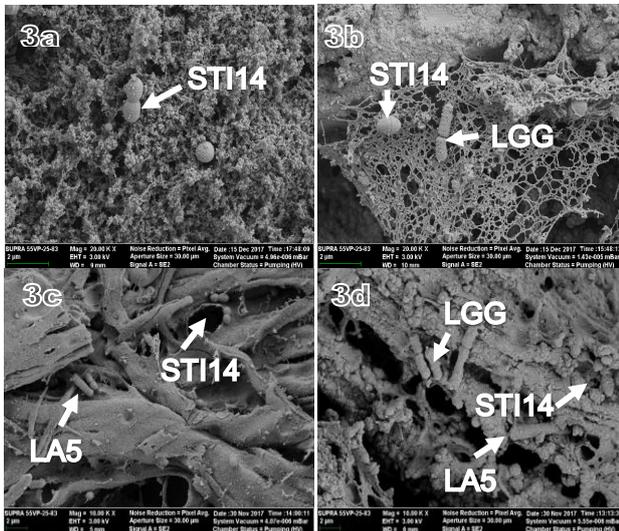


Figura 3. Microestructuras de quesos frescos de pasta hilada: **(a)** QC (sin adición de probióticos), **(b)** QGG (con adición de *L. rhamnosus* GG) **(c)** QLA5 (con adición de *L. acidophilus* LA5) **(d)** QLA5-LGG (con adición de *L. rhamnosus* GG y *L. acidophilus* LA5).

▪ Estudio de funcionalidad

Como se mencionó anteriormente, se realizó un ensayo *in vivo* utilizando ratones BALB/c y se determinó, por un lado, la seguridad de los quesos mediante el ensayo de translocación y, por otro, la capacidad de estimular el sistema inmunológico mediante la determinación de IgA-S, IL-10 e IL-12.

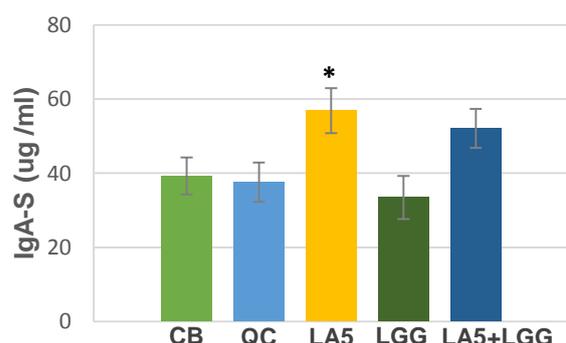
No se observó desarrollo microbiano en las placas de AVRb, indicando que ninguno de los quesos analizados indujo translocación de microbiota entérica a

hígado y que, por lo tanto, resultaron seguros.

En la Figura 4, se puede observar la variación de la concentración de IgA-secretoria en fluido intestinal de los distintos grupos analizados.

En relación con el queso control (QC), se puede concluir que el mismo no estimuló la producción de IgA-S en ratones, obteniendo valores similares (39,2 $\mu\text{g/ml}$) al grupo control bioterio (CB). Del mismo modo, el queso con adición de *L. rhamnosus* GG (QGG) no provocó un incremento significativo de este parámetro (33,4 $\mu\text{g/ml}$).

Por otro lado, se evidenció que la adición de *L. acidophilus* LA5 en el queso (QLA5) estimuló el sistema inmune en ratones, lo cual se vio reflejado en el incremento significativo en la producción de IgA-S (56,9 $\mu\text{g/ml}$) y un incremento (aunque no significativo) en el queso QLA5-LGG (52,1 $\mu\text{g/ml}$). Estos resultados permiten inferir que sólo una de las cepas probióticas estimuló el sistema inmunológico a través del parámetro determinado. No obstante, es importante mencionar que la funcionalidad de los microorganismos probióticos es particular de cada cepa y no todos comparten el mismo efecto, sumando a esto, la complejidad en la



regulación del sistema inmune.

Figura 4. Concentración de IgA-S ($\mu\text{g/ml}$) en fluido intestinal de ratones BALB/c: control bioterio (CB), grupo control (GC) y 3 grupos tratados que recibieron los quesos probióticos (QLA5, QGG, QLA5-LGG). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto al grupo QC.

La determinación de las citoquinas IL-10 e IL-12 en homogenado de intestino delgado no demostró que las cepas probióticas ejercieran un efecto antiinflamatorio en los animales en las condiciones estudiadas (no se muestran los datos).

▪ Análisis sensorial

En la Figura 5 se observan las puntuaciones obtenidas de los descriptores organolépticos analizados.

Los panelistas no percibieron diferencias significativas en la apariencia de los quesos y los describieron como blancos y suaves con un brillo superficial muy vivo [características que coinciden con los requisitos básicos de los quesos de pasta hilada (Jana y Mandal, 2011)]. Por otro lado, no se detectó una cantidad significativa de exudado dentro de la masa al dividir la muestra por la mitad y el sabor salado no se vio afectado por el cultivo adjunto utilizado. El contenido de grasa y humedad afectan principalmente el color y la cantidad de exudado (Wadhvani y McMahan, 2012). Como se describió previamente, no se observaron diferencias en la composición global de los quesos,

por lo cual se esperaba que la intensidad de color, brillo y exudado fuera similar en los tres tipos de quesos evaluados.

Los atributos mecánicos de la textura tales como firmeza, elasticidad, masticabilidad y adhesividad no mostraron diferencias significativas entre las muestras (no se muestran los datos). No fue necesario aplicar demasiada fuerza para comprimir y masticar el producto alimenticio, y la estructura se reconstruyó rápidamente después de la compresión del dedo.

En general se observa que el queso adicionado de ambos probióticos (QLA5-LGG) resultó ligeramente más amargo y ácido y con mayor sabor residual.

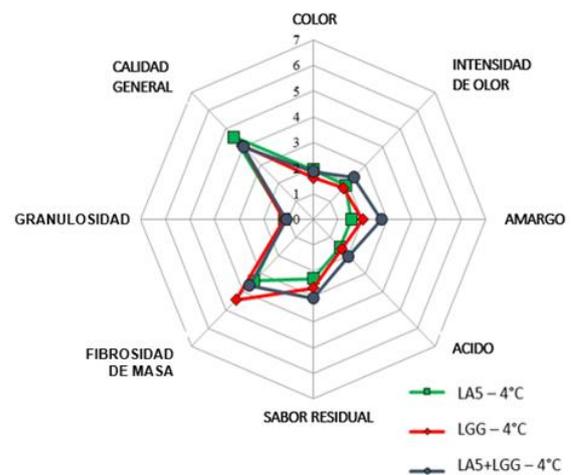


Figura 5. Puntuaciones de descriptores organolépticos en quesos frescos de pasta hilada luego de 15 días de maduración almacenados a 4°C.

Finalmente, las puntuaciones de calidad general fueron muy buenas. En este sentido es importante considerar que, si las características sensoriales del queso no satisfacen las expectativas del

consumidor, el producto fracasará en el mercado.

Conclusiones

En el trabajo presentado se llevaron a cabo elaboraciones de queso fresco de pasta hilada de manera exitosa, logrando una aceptación general muy buena del alimento por parte del panel entrenado.

Mediante los estudios realizados se ha demostrado que las cepas probióticas permanecieron viables con valores por encima de 10^8 UFC/g luego del hilado y durante el proceso de maduración, indicando que la matriz alimentaria seleccionada resultó ser un vehículo apropiado para los microorganismos probióticos utilizados. Por otro lado, la incorporación de estos microorganismos no modificó la composición global de los quesos y no se observó un fenómeno de sobre-acidificación.

Mediante microscopía electrónica de barrido se logró visualizar el efecto de la tecnología de hilado en la matriz casearia y la distribución de los microorganismos utilizados. El estudio de funcionalidad utilizando ratones BALB/c demostró que los tres tipos de quesos resultaron ser un alimento seguro ya que no se detectó crecimiento de microbiota entérica en hígado. Por otro lado, el queso adicionado de *L. acidophilus* LA5 (QLA5) indujo un incremento significativo en la concentración de IgA-S (principal defensa de las mucosas) en intestino delgado.

Finalmente, se destaca que se logró elaborar con éxito un producto innovador como es un queso fresco de pasta hilada adicionado de uno o más microorganismos probióticos, que podría ampliar la oferta de alimentos funcionales en el mercado (actualmente inexistente) y para el cual se demostró su seguridad y capacidad de incrementar las defensas del organismo mediante estudios *in vivo*.

Bibliografía

- Angiolillo, L., Conte, A., Faccia, M., Zambrini, A., Del Nobile, M. (2014). A new method to produce symbiotic Fior di latte cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 180-187.
- Bergamini C., Hynes E., Zalazar C. (2006). Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 16: 856-866.
- Buriti F.C.A., da Rocha J.S., Saad S.M.I. (2005). Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, 15 (12): 1279-1288.
- Burns, P., Cuffia, F., Milesi, M., Vinderola, G., Meinardi, C., Sabbag, N., Hynes, E. (2012). Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. *Food Microbiology*, 30, 45-50.

- Burns, P., Patrignani, F., Tabanelli, G., Vinderola, G., Siroli, L., Reinheimer, J., Gardini, F., Lanciotti, R. (2015). Potential of high-pressure homogenisation on probiotic Caciotta cheese quality and functionality. *Journal of Functional Foods*, 13, 126–136.
- Burns, P., Alard, J., Hrdý J., Boutillier, D., Páez, R. Reinheimer, J., Pot, B., Vinderola, G., 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 | DOI: 10.1038/srep43211.
- Burns, P., Oddi, S., Forzani, L., Tabacman, E., Reinheimer, J., Vinderola, G. (2018). Variability in gut mucosal secretory IgA in mice along a working day. *BMC Research Notes*. 11: 98.
- Castro, J., Tornadijo, M., Fresno, J., Sandoval, H. (2014). Review Article. Biocheese: A food probiotic carrier. *BioMed Research International*, 1–11. Article ID 723056.
- Cuffia, F., George, G., Renzulli, P., Reinheimer, J., Meinardi, C., Burns, P. (2017). Technological challenges in the production of a probiotic pasta filata soft cheese. *LWT Food Science and Technology*, 81, 111–117.
- FAO/WHO, 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm 2002.
- Institute of Food Technologists. Expert Report: Functional Foods: Opportunities and Challenges. Total pages: 66. Last updated, 2014.
- Minervini, F., Siragusa, S., Faccia, M., Dal Bello, F., Gobbetti, M., De Angelis, M. (2012). Manufacture of Fior di Latte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli. *Journal of Dairy Science*, 95, 508-520.
- Ortakci, F., Broadbent, J., McManus, W., McMahon, D. (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.
- Wadhvani, R., McMahon, DJ. (2012). Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. *Journal of Dairy Science*, 95, 2336–2346.
- A.H. Jana, P.K. Mandal. (2011). Manufacturing and Quality of Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science*, 6, 199-226.
- Buffa, M.N., Guamis, B., Saldo J., y Trujillo, A.J. 2004. Changes in organic acids during ripening of cheese made from raw, pasteurized

or high-pressure treated goat's milk. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. Food Science and Technology*. 37(2):247-253.

Bradley, R., Arnold, E., Barbano, D., Semerad, R., Smith, D., & Vines, B. (1993). Chemical and physical methods. In R. Marshall (Ed.), *Standard methods for the examination of dairy products* (pp. 433e532). Washington, DC: American Public Health Association (APHA).

Agradecimientos

A la empresa Chr. Hansen A/S, Dinamarca por proveernos los microorganismos probióticos.

A los miembros del panel sensorial del Instituto de Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional del Litoral.

Financiamiento

El estudio se financió con el proyecto "Desarrollo de una tecnología para la elaboración de un queso de pasta hilada con adición de bacterias probióticas como actividad rentable y generadora de alto valor agregado". 44-143208. Secretaría de Políticas Universitarias (SPU) del Ministerio de Educación de la Nación Argentina.