

Revisión

La microbiota del queso y su importancia funcional

Gorka Santamarina-García¹, José M. Fresno², Mailo Virto¹, Gustavo Amores¹, Javier Aranceta³

¹Grupo de Investigación Lactiker. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco UPV/EHU. Paseo de la Universidad 7. 01004 Vitoria-Gasteiz. España. ²Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. Campus de Vegazana s/n. 24071 León. España. ³Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Navarra. C/Irunlarrea 1. 31009 Pamplona. España.

Resumen

Actualmente, los alimentos funcionales con probióticos son muy populares y existe cada vez un interés mayor en la sociedad por incluirlos en la dieta. Hasta el momento, la investigación científica se centraba en probar los efectos beneficiosos de determinadas cepas bacterianas, independientemente del origen, en humanos. No obstante, los estudios que describen la importancia funcional de especies presentes naturalmente en alimentos no son tan abundantes. Por ello, este trabajo tiene como objetivo analizar la microbiota de uno de los ecosistemas microbianos alimenticios más destacados, como es el queso; y relacionarla con sus propiedades funcionales. Tras analizar la composición microbiana de diferentes quesos, como Cheddar, Emmental, Gruyere, Camembert etc., se ha observado que muchas especies predominantes (por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis* o *Streptococcus thermophilus*) están relacionadas con el tratamiento de problemas de salud. Entre otros, son efectivas para aliviar la intolerancia a la lactosa, prevenir de alergias, reducir el colesterol, inhibir patógenos intestinales, tratar afecciones inflamatorias o reducir el riesgo asociado a mutagenicidad y carcinogenicidad. Además, se ha comprobado que la mayoría de las cepas mantienen la viabilidad durante la elaboración del queso y tras el proceso digestivo. En definitiva, estaríamos ante un alimento funcional muy beneficioso para la salud.

Palabras clave: Queso. Microbiota. Alimentos Funcionales. Probióticos.

Introducción

La finalidad de la dieta es aportar nutrientes para satisfacer las necesidades metabólicas del organismo. Aun así, desde el punto de vista científico, la atención se centra en la capacidad de los alimentos de modular funciones fisiológicas del organismo y ejercer efectos beneficiosos en relación a determinadas enfermedades¹. En este sentido, encontramos los alimentos funcionales.

Correspondencia: Gorka Santamarina-García.
Grupo de Investigación Lactiker.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco UPV/EHU.
Paseo de la Universidad 7. 01004 Vitoria-Gasteiz. España.
E-mail: gorka.santamarina@ehu.eus

CHEESE MICROBIOTA AND ITS FUNCTIONAL IMPORTANCE

Abstract

Currently, functional foods with probiotics are very popular and there is an increasing interest in society to include them in diet. Until now, scientific research was focused on testing the beneficial effects of certain bacterial strains, regardless of origin, in humans. However, studies that describe the functional importance of species that are naturally present in food are not as abundant. Therefore, this work aims to analyse the microbiota of one of the most prominent microbial food ecosystems, that is cheese; and relate it to its functional properties. After analysing the microbial composition of different cheeses, such as Cheddar, Emmental, Gruyere, Camembert etc., it has been observed that many predominant species (for example, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis* or *Streptococcus thermophilus*) are related to the treatment of health problems. Among others, they are effective in relieving lactose intolerance, preventing allergies, lowering cholesterol, inhibiting intestinal pathogens, treating inflammatory diseases or reducing the risk associated to mutagenicity and carcinogenicity. In addition, it has been proven that most strains maintain viability during cheese making and after the digestive process. In short, we would be faced with a functional food that is very beneficial for health.

Key words: Cheese. Microbiota. Functional Foods. Probiotics.

Hoy en día existe una amplia variedad de definiciones para los alimentos funcionales. El International Life Sciences Institute (ILSI) los define como "Aquellos alimentos o componentes alimenticios que tienen la capacidad de influir beneficiosamente en las funciones del cuerpo y ayudar a mejorar el estado de bienestar y salud y reducir el riesgo de enfermedades"². Por otro lado, el Functional Food Center define los alimentos funcionales como "alimentos naturales o procesados que contienen compuestos biológicamente activos conocidos o desconocidos, los cuales, en cantidades definidas, eficaces y no tóxicas, proporcionan un beneficio clínicamente pro-

Fecha envío: 02/06/2020.
Fecha aceptación: 01/10/2020.

bado y documentado para la salud en la prevención, manejo o tratamiento de enfermedades crónicas³.

Dentro de los alimentos funcionales encontramos los alimentos con probióticos, los cuales son definidos según la Organización Mundial de la Salud (WHO, abreviatura inglesa) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud"⁴. Los productos lácteos son uno de los alimentos con probióticos más populares y con mayor notoriedad en el mercado. Entre ellos, encontramos los yogures, las bebidas fermentadas o los quesos⁵. Este artículo se centra en este último producto.

El Codex Alimentarius define el queso como "el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior al de la leche, obtenido mediante: coagulación total o parcial de la proteína de la leche (...), por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación (...)"⁶. Se cree que su origen se remonta a hace 8.000 años, cuando se domesticaron los animales y fueron empleados para obtener carne, pieles o leche. Se estima que la producción anual de queso es superior a 20 millones de toneladas⁷, una cifra que ha ido aumentando durante los últimos 30 años en una media anual del 4%⁸.

Composición microbiana del queso

Los microorganismos que conforman la microbiota final del queso pueden proceder de diferentes fuentes. Entre otras, destacan la adición intencionada como parte del cultivo iniciador; su presencia de manera natural en los ingredientes empleados en la elaboración del queso⁹, o también, el entorno de ordeño o fabricación del queso y los materiales empleados^{8,10,11}.

La leche procedente de la ubre de animales sanos contiene, aproximadamente, menos de 5×10^3 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. El descenso de la temperatura de la leche tras su obtención, hasta los 15-21° C, da lugar al predominio de los géneros bacterianos mesófilos, como *Lactococcus* y *Enterobacter*. Después, la habitual etapa de refrigeración hasta los 4° C dificulta el crecimiento de la mayoría de microorganismos, salvo el de los psicrótrofos, como son algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* o *Acinetobacter*. Exceptuando los quesos elaborados con leche cruda, como por ejemplo el queso Idiazabal, generalmente la leche es sometida a un proceso de pasteurización, dando como resultado la muerte de aproximadamente el 99,9 % de las bacterias. El objetivo principal de este tratamiento es eliminar los microorganismos patógenos e indeseables. No obstante, las esporas de *Bacillus* y *Clostridium* o algunos organismos termorresistentes como *Micrococcus* o *Microbacterium* pueden sobrevivir⁹.

Generalmente, durante la elaboración y maduración del queso, la microbiota de este puede ser dividida en dos grandes grupos según su función: bacterias ácido lácticas (BAL) del cultivo iniciador (*Starter Lactic Acid Bacteria* (SLAB), por su denominación inglesa), las cuales predominan en la microbiota del producto; y las BAL no pertenecientes al cultivo iniciador (NSLAB, *Non Starter LAB*)^{9,12}.

Bacterias Ácido Lácticas del Cultivo Iniciador (SLAB)

No fue hasta finales del siglo XIX cuando se empezó con la práctica de la adición de cultivos iniciadores. En 1890 se introdujo por primera vez en la producción de mantequilla en Dinamarca, pero la fecha en la que se empezó a emplear en la fabricación de queso no está clara. Hoy en día, todavía se encuentran quesos elaborados sin la adición de cultivos iniciadores, principalmente en España y Grecia. En esos quesos, el maestro quesero confía en las BAL presentes naturalmente en la leche cruda y en su capacidad de crecimiento y producción de ácido láctico durante la elaboración y primeros días de maduración del queso⁸.

Las SLAB son añadidas en forma de cultivo iniciador para asegurar uno de los pasos más importantes en la elaboración de queso, la producción de ácido láctico^{8,9}. Estas bacterias metabolizan la lactosa de la leche generando ácido láctico como producto final de fermentación^{13,14}. Así, el ácido láctico da lugar a un descenso del pH de la leche, y cumple tres funciones principales: promover la actividad del cuajo, favorecer la expulsión del suero de la cuajada y prevenir el crecimiento de bacterias indeseables, como las patógenas^{8,9,14,15}. Dentro de las SLAB se encuentra el género mesófilo *Lactococcus*¹⁴.

Todas las BAL que forman cultivos iniciadores son bacterias Gram-positivas, catalasa negativas, no móviles y no formadoras de esporas⁸. No obstante, los cultivos iniciadores se dividen comúnmente entre mesófilos, con una temperatura óptima de crecimiento de aproximadamente 30° C; y termófilos, con una temperatura óptima más elevada, en torno a 42° C. Los cultivos mesófilos están formados por especies acidificantes, las cuales emplean lactosa como fuente de carbono; o bien por una mezcla de estas con otras bacterias fermentadoras de citrato¹⁶. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis, *Leuconostoc* spp. y *Weissella paramesenteroides* son algunos ejemplos de bacterias que metabolizan el citrato y como resultado, generan compuestos sápidos como el diacetilo¹⁷. Las bacterias ácido lácticas más empleadas en los cultivos mesófilos son *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y comúnmente, *Leuconostoc* spp. para la fermentación del citrato. Por otro lado, los cultivos termófilos incluyen cepas de la especie *Streptococcus thermophilus*, que, aunque se emplea habitualmente en quesos italianos y suizos semiduros y duros, actualmente es utilizada en muchas otras variedades como texturizante. Así mismo, también se pueden emplear como cultivos adjuntos

especies del género *Lactobacillus*, como *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii*; empleadas para el desarrollo del sabor¹⁶. Generalmente, los valores iniciales de SLAB en la leche varían en torno a 10^5 - 10^7 UFC/ml y el crecimiento del cultivo iniciador durante la elaboración del queso da lugar a densidades en torno a 10^9 UFC/g de queso en un día⁸.

En general, durante la maduración las SLAB son las bacterias predominantes, pero muchas mueren y se lisan con relativa facilidad. La lisis ocurre por una muraminidasa intracelular que hidroliza el peptidoglucano de la pared celular bacteriana. Esta lisis se ve afectada por varios factores como la concentración de sal, la actividad de agua, la acidez del medio y la presencia de fagos. En el queso Comté, por ejemplo, la tasa de lisis de *S. thermophilus* es más rápida que la de *L. helveticus*. Igualmente, incluso en quesos artesanales sin la adición de cultivos iniciadores, como algunas variedades españolas, los géneros de SLAB son los predominantes. En esos casos, la mayor parte de la microbiota está compuesta por cepas del género *Lactococcus*. Estos también presentan una tasa de lisis elevada, salvo en el caso del queso La Serena. La tasa de lisis más lenta en este último se relaciona con su baja concentración de sal durante las primeras semanas de la maduración⁸.

Bacterias Ácido Lácticas No Pertenecientes al Cultivo Iniciador (NSLAB)

En la producción de quesos sin inoculación de cultivos iniciadores, los agentes microbianos proceden del material de partida¹⁰. De hecho, los sabores exclusivos de quesos de leche cruda son resultado de esa microbiota natural¹⁸. No obstante, aunque la leche cruda sea la fuente principal de NSLAB¹⁹, el entorno de la fábrica se ha clasificado como un potencial foco de origen. Esto es debido a la capacidad de NSLAB de formar biopelículas y sobrevivir así en el entorno y equipos aun tras la limpieza¹¹. En este contexto, Bokulich y Mills señalaron la existencia de una microbiota propia del entorno y propusieron una posible relación con las características finales del producto¹⁰. Dentro de las NSLAB encontramos especies mesófilas heterofermentativas facultativas del género *Lactobacillus*, como *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* y *L. curvatus*, en el caso del queso Cheddar²⁰. Fitzsimons y cols. resaltaron el predominio de *L. paracasei* en el queso Cheddar de 9 a 24 meses de maduración²¹. La presencia de las NSLAB se ha relacionado con un mayor grado de proteólisis y por tanto, de intensidad de sabor¹⁹. Sin embargo, es importante mencionar que no todas las cepas aportan beneficios sensoriales, ya que algunas puede dar lugar a la aparición de sabores ácidos y amargos indeseables^{12,22}.

Los recuentos de NSLAB suelen ser bajos después de la elaboración de la cuajada (10^2 - 10^3 UFC/g). Sin embargo, durante los primeros meses de maduración pueden aumentar entre 4 y 6 unidades logarítmicas²³. De hecho, en función de la tasa de mortalidad de SLAB, pueden lle-

gar a predominar durante toda la maduración²⁴. Esto es habitual en quesos como Cheddar, Emmental o Gruyere²⁵. El desarrollo de estas bacterias se debe a su capacidad de obtener energía de fuentes alternativas a través de la metabolización de los ácidos láctico y cítrico, así como de la ribosa, ácidos grasos o aminoácidos²⁰. Así pues, gracias al metabolismo microbiano, las NSLAB son capaces de generar compuestos sápidos.

Bacterias probióticas del queso

Algunas de las bacterias reconocidas como probióticas, corresponden a especies bacterianas presentes naturalmente en el queso^{26,27}. Generalmente las más notorias son especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, aunque en la industria láctea se emplean más de 40 cepas diferentes. Sin embargo, salvo *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, en pocas se ha probado clínicamente que sean beneficiosas para la salud⁸. Dentro de los efectos beneficiosos demostrados, se encuentran el alivio a la intolerancia a la lactosa, la prevención de alergias, la reducción del colesterol en plasma, la inhibición de *Helicobacter pylori* y otros patógenos intestinales, el tratamiento de enfermedades como la diarrea asociada a antibióticos y la diarrea del viajero o afecciones inflamatorias, y la reducción del riesgo asociado a mutagenicidad y carcinogenicidad^{4,8,26,27} (tabla I). Respecto al mecanismo de acción, se cree que dichos efectos beneficiosos son debidos principalmente a la modulación del sistema inmunitario intestinal, así como a la producción de compuestos antimicrobianos y al desplazamiento de patógenos por exclusión competitiva^{27,28}.

Para que un alimento pueda ser etiquetado y comercializado como alimento con probióticos, debe cumplir una serie de requisitos. El primero es que dicha cepa o cepas deben estar viables en el momento de la comercialización y presentar unos recuentos iguales o superiores a 10^6 UFC/g⁸. Asimismo, la cepa debe estar correctamente identificada de acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura utilizando técnicas moleculares ampliamente aceptadas por la comunidad investigadora; deben ser seguras para el consumo humano, esto es, no poseer factores de virulencia o la capacidad de producir metabolitos indeseables; deben ser resistentes a las condiciones del entorno donde ejercen su actividad beneficiosa y además, su funcionalidad debe estar probada científicamente en ensayos con humanos⁴.

Los alimentos con probióticos pueden estar compuestos por una única cepa bacteriana o una mezcla de dos o más cepas. Por ejemplo, VSL#3 (Yovis; Sigma-Tau, Pomezia, Italy) es una mezcla de 8 cepas diferentes. Asimismo, hay que destacar que los efectos beneficiosos dependen de la cepa y pueden diferir cuando se emplean individualmente o en combinación. Hasta el momento, se ha demostrado que las combinaciones presentan mayores beneficios, si bien los efectos pueden diferir según el huésped²⁹.

Tabla I
Efectos beneficiosos para la salud de bacterias presentes en diferentes tipos de quesos

Microorganismo	Efecto beneficioso	Referencias
<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>	Alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa	64
<i>B. infantis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>L. acidophilus</i> junto a <i>B. longum</i>	Reducción del colesterol e hipertensión	53, 57, 81
<i>L. rhamnosus</i> , <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>S. thermophilus</i> junto a <i>L. bulgaricus</i>	Tratamiento de la diarrea causada por <i>C. difficile</i>	37, 59, 68, 69, 94
<i>L. casei</i>	Actividad antimicrobiana (<i>Helicobacter pylori</i>)	43
<i>L. acidophilus</i>	Actividad antimicrobiana (<i>E. coli</i> enteropatógena)	36
<i>L. acidophilus</i> / <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Actividad antimicrobiana (<i>Salmonella typhi</i> / <i>typhimurium</i>)	36, 74
<i>E. mundtii</i> , <i>B. licheniformis</i>	Actividad antimicrobiana (<i>L. monocytogenes</i>)	83,84,98
<i>L. acidophilus</i> , <i>B. licheniformis</i>	Actividad antimicrobiana (<i>S. aureus</i>)	36, 98
<i>L. acidophilus</i>	Actividad antimicrobiana (<i>C. perfringens</i>)	36
<i>B. infantis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>E. durans</i> , <i>B. coagulans</i>	Prevención de enfermedades inflamatorias (colitis, alergias respiratorias...)	52, 67, 75, 82, 94
<i>B. infantis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Actividad anticancerígena	54, 73

Nota: En esta tabla no se recogen todos los efectos beneficiosos que se tratan en este artículo.

El yogur y la leche fermentada son las fuentes de probióticos más populares. No obstante, el queso también es un producto muy ventajoso, ya que tiene un pH más alto, consistencia sólida y un porcentaje relativo de grasa más elevado, lo que ayuda a proteger a los microorganismos probióticos y, por tanto, su viabilidad. En este tipo de producto, habría que considerar también el efecto que pueden tener estas cepas probióticas en los parámetros de maduración y en el desarrollo del sabor y el aroma⁸.

Género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* es uno de los taxones más importantes en lo que respecta a la nutrición humana y a la microbiología alimentaria³⁰. Las especies de este género no forman esporas, son catalasa negativas y están caracterizadas por un bajo contenido de GC (Guanina y Citosina)^{31,32}. Tienen un metabolismo heterofermentativo³³ y producen ácido láctico y otros compuestos como acetato, etanol, CO₂, formiato y succinato^{33,34}. Generalmente son bacterias aerotolerantes o anaerobias y su temperatura de crecimiento óptima ronda los 30-40 °C y su pH óptimo es de 5,5-6,2³⁵ (tabla II).

Dentro de este género, diferentes especies han demostrado potencial probiótico. Por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus* presenta actividad antimicrobiana contra patógenos como *Escherichia coli* enteropatógena, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* gracias a la producción de diversas bacteriocinas y sustancias antibacterianas como lactocidina, acidolina, acidofilina, lactato-B y proteínas inhibidoras³⁶. Se ha demostrado que *L. rhamnosus* es efectiva para tratar la diarrea causada por *Clostridium difficile* durante el tratamiento con antibióticos³⁷, para el trata-

miento de la diarrea infecciosa aguda en niños³⁸, para prevenir la diarrea nosocomial^{38,39} o también, para aliviar los síntomas de trastornos intestinales funcionales⁴⁰. *L. casei* se ha relacionado con la prevención de las infecciones gastrointestinales adquiridas por niños en la comunidad^{41,42} o con la terapia adyuvante para la erradicación de *Helicobacter pylori*⁴³. *L. reuteri* se ha relacionado con el alivio de síntomas de los trastornos intestinales funcionales^{44,45} o con el tratamiento de cólicos infantiles⁴⁶.

Estas especies se encuentran en diferentes tipos de quesos en los que han demostrado propiedades probióticas. Ibrahim y cols. desarrollaron un queso Gouda con cepas de *L. rhamnosus* y *L. acidophilus*. Observaron que su consumo durante 4 semanas en personas de avanzada edad (72-103 años) daba lugar a un estímulo de la respuesta inmune innata⁴⁷. Sperry y cols. desarrollaron un queso Minas Frescal con *L. casei* y concluyeron que tras 28 días de consumo en mujeres con sobrepeso e hipertensión (32-72 años), mejoraba los perfiles lipídicos (reducción del colesterol total, LDL (lipoproteínas de baja densidad, en inglés Low Density Lipoprotein) y triacilglicéridos, y un aumento del colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad, en inglés High Density Lipoprotein)) y hematológicos (atenuación de la presión sanguínea sistólica y diastólica)⁴⁸. Asimismo, Zhang y cols. comprobaron en modelos animales que se producía una reducción de los contenidos en colesterol total y LDL cuando eran alimentados con queso Cheddar inoculado con *L. plantarum*⁴⁹.

Género *Bifidobacterium*

Las especies bacterianas del género *Bifidobacterium* son anaerobias Gram-positivas, no formadoras de esporas, no móviles, catalasa negativas^{50,51} y tienen un alto

Tabla II
Características microbiológicas generales de los principales géneros bacterianos probióticos en quesos

Género	Tinción de Gram	Morfología y/o Ordenamiento	Temperatura de Crecimiento (°C)	Requerimiento de Oxígeno	Nutrición	Formación de esporas	Prueba de catalasa	Movilidad	Referencias
<i>Lactobacillus</i>		Bacilos o coccobacilos, frecuentemente en cadenas	30-40	Aerotolerantes o anaerobias	Homofermentativos o heterofermentativos	No	Negativa	No móviles (con excepciones)	31, 32, 33, 34, 35
<i>Bifidobacterium</i>	Gram +	Bacilos cortos y curvos, en forma de maza o bifurcados en forma de Y	25-46	Anaerobias	Heterofermentativos	No	Negativa	No móviles	32, 50, 51
<i>Streptococcus</i>		Esféricas u ovoides, en parejas o cadenas	20-42	Anaerobias facultativas	Homofermentativos	No	Negativa	No móviles	60, 61
<i>Lactococcus</i>		Cocos solos, parejas o cadenas cortas	10-40	Anaerobias facultativas	Homofermentativos	No	Negativa	No móviles	70, 72
<i>Enterococcus</i>		Cocos solos, parejas o cadenas cortas	10-45	Anaerobias facultativas	Homofermentativos	No	Negativa	No móviles	61, 62, 77, 78
<i>Bacillus</i>	Gram +/- (variable)	Bacilos solos, parejas o cadenas	10-50	Aerobias o anaerobias facultativas	Heterofermentativos	Sí	Positiva	Móviles y No móviles	85, 86, 87, 88

contenido de GC (54-67%). Además, presentan varias formas como bacilos cortos y curvos, en forma de maza o bifurcados en forma de Y⁵¹.

Se ha demostrado que *B. infantis* promueve selectivamente las respuestas inmunorreguladoras, con el consiguiente efecto de prevención de enfermedades inflamatorias (como colitis, artritis o alergias respiratorias)⁵²; reduce el colesterol⁵³ o incluso, presenta actividad anticancerígena frente al cáncer de pulmón en modelo animal⁵⁴. En este contexto, Daigle y cols. elaboraron un queso Cheddar que contenía *Bifidobacterium infantis* y observaron que se mantenía viable tras el proceso de elaboración a niveles de 10⁶ UFC/g de producto. Por lo tanto, se obtuvo un queso con probióticos de gran valor⁵⁵.

Asimismo, Lollo y cols. elaboraron quesos Minas Frescal inoculando *L. acidophilus* y *Bifidobacterium longum*^{56,57}. El queso que contenía *L. acidophilus*, tras 2 semanas de consumo en ratas adultas, observaron cómo modulaba el sistema inmune, gracias al aumento de monocitos y linfocitos en sangre⁵⁶. Con *Bifidobacterium longum*, se observó una reducción del desarrollo de hipertensión y un descenso del nivel de triglicéridos y del colesterol LDL, con aumento del colesterol HDL⁵⁷. Verruck y cols. elaboraron un queso Minas Frescal inoculando *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12⁵⁸. En estudios previos se ha demostrado que dicha cepa presenta efectos beneficiosos para la salud gastrointestinal, debido a un efecto protector contra la diarrea; para la función inmune, ya que aumenta la resistencia del organismo a infecciones respiratorias comunes y reduce la incidencia de infecciones agudas del tracto respiratorio; y reduce los efectos secundarios de la diarrea asociada a antibióticos⁵⁹. Así, Verruck y cols. demostraron que ese queso poseía gran potencial como alimento funcional, ya que dicha cepa se mantenía viable tras la elaboración y tras el proceso digestivo⁵⁸.

Género Streptococcus

Las especies del género *Streptococcus* son bacterias Gram-positivas, esféricas, se presentan en parejas o cadenas, no forman esporas, son anaerobias facultativas, catalasa negativas y homofermentativas^{60,61}. Este género también se clasifica dentro de las BAL, pero existen algunas especies que causan infecciones graves, como *Streptococcus pyogenes* o *Streptococcus pneumoniae*⁶². *S. thermophilus* es una de las más conocidas por su importancia en la industria láctea, ya que, se emplea en la producción del yogur junto *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; y en la producción de los quesos Emmental, Camembert, Brie, Mozzarella y Parmesano⁶³.

Varios estudios realizados en humanos y en modelos animales demuestran que *S. thermophilus* puede ejercer efectos beneficiosos en la salud del huésped. Entre otros, permite aliviar los síntomas relacionados con la intolerancia a la lactosa cuando se presenta junto a *L. bulgaricus*⁶⁴; produce un exopolisacárido que se ha relacionado con la prevención de la gastritis⁶⁵; o también, en combinación con

otras especies puede ser útil para prevenir la diarrea. Junto con *B. bifidum* es útil para tratar la diarrea causada por infecciones virales en niños, como por ejemplo, por rotavirus⁶⁶. Igualmente, en bebés reduce la susceptibilidad a desarrollar colitis⁶⁷. En adultos se ha sugerido que junto con *L. bulgaricus* puede ser eficaz para la prevención y tratamiento de la diarrea asociada a antibióticos. No obstante, en este caso, existen diferentes estudios que presentan resultados contradictorios^{68,69}. Por lo tanto, serían necesarios más ensayos para conocer los efectos de *S. thermophilus* en la matriz alimentaria de queso.

Género Lactococcus

Schleifer y cols. propusieron en 1985 reclasificar algunas especies de los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus* en el género *Lactococcus*, en base a estudios de hibridación del ADN y relaciones inmunológicas de la superóxido dismutasa⁷⁰. Así pues, este género incluye 5 especies: *L. garvieae* (anteriormente denominada *Enterococcus serolicida*), *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* (*S. raffinolactis*) y *L. lactis*, que se divide en las subespecies *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *hordniae* (*Lactobacillus hordniae*) y *L. lactis* subsp. *lactis* (*Lactobacillus xylosus*, *Streptococcus lactis*)⁷¹.

Las especies del género *Lactococcus* son cocos Gram-positivos, mesófilos, anaerobios facultativos, homofermentativos, no móviles, catalasa negativos, se presentan en parejas o cadenas cortas y no forman esporas^{70,72}. Las especies del género *Lactococcus* están presentes en muchos productos fermentados, incluidos quesos⁷¹. En cuanto a las propiedades saludables, fundamentalmente se han realizado estudios en modelos animales. Entre otros, se ha observado que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* puede ser beneficioso para la estabilización del cáncer colorrectal⁷³, puede inhibir ciertos patógenos como *Salmonella enterica* serovar *Typhi*⁷⁴ o incluso puede aliviar la inflamación intestinal debida a la colitis, incluida la colitis ulcerosa⁷⁵. No obstante, existen muy pocos estudios en cuanto a los efectos beneficiosos que presentan las cepas de estas especies o subespecies en los humanos a través del consumo de quesos.

Género Enterococcus

Los *Enterococcus* son cocos Gram-positivos, que pueden presentarse solos, en parejas, en cadenas cortas o también en grupos^{70,76}; son mesófilos, anaerobios facultativos, homofermentativos, no móviles (salvo *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*), catalasa negativos y no forman esporas^{61,72,77,78}. Este género es importante en la elaboración de los productos lácteos. Entre otros, aceleran el proceso de maduración por proteólisis, lipólisis y descomposición del citrato. Asimismo, también generan compuestos importantes para el sabor y aroma del queso⁷⁹.

Respecto a su funcionalidad probiótica, *Enterococcus* todavía no ha sido clasificado como GRAS (Generally

Recognized As Safe, término empleado por la FDA en EEUU) o QPS (Qualify Presumption of Safety, en Europa)⁸⁰. Sin embargo, se ha demostrado que pueden ejercer efectos beneficiosos para la salud. Entre otros, *E. faecium* M74 se ha asociado a la reducción de la concentración de colesterol en suero⁸¹. Se ha demostrado que el empleo de *E. durans* M4-5 puede ser un tratamiento eficaz de prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal, por la producción de butirato y colabora en la protección de la integridad epitelial intestinal⁸². Asimismo, *E. mundtii* ST4SA presenta actividad antimicrobiana, gracias a la generación de péptidos antimicrobianos que actúan frente a patógenos, como *Listeria monocytogenes*^{83,84}.

Aun así, su uso en alimentación humana todavía no está permitido. La razón principal es que en la actualidad *Enterococcus* se está clasificando como una fuente importante de genes de resistencia a antibióticos, y como la diana de los probióticos es el sistema gastrointestinal, esto supondría un punto caliente para el intercambio de esos genes. Por lo tanto, su uso debe analizarse con mucha cautela⁸⁰.

Género Bacillus

Las especies del género *Bacillus* son bacilos Gram-positivos, que pueden presentarse solos, en parejas o cadenas; aerobios estrictos o anaerobios facultativos, heterofermentativos, catalasa positivos y formadores de esporas⁸⁵⁻⁸⁸. Dentro de las bacterias formadoras de esporas, el género *Bacillus* ha sido el más empleado como probiótico⁸⁹, y su interés reside en la capacidad de las esporas de resistir al calor y al pH gástrico y, por tanto, de mantener su viabilidad^{90,91}.

Dentro de las especies que ejercen efectos beneficiosos demostrados encontramos: *B. licheniformis*, *B. coagulans* o *B. subtilis*, entre otros. *B. coagulans* es capaz de modular la microbiota y mejorar la disbiosis en ancianos (65-80 años), favoreciendo la presencia de bacterias beneficiosas, como *Faecalibacterium prausnitzii*; y aumentando la producción de citoquinas antiinflamatorias⁹². Igualmente, se ha demostrado que es capaz de aliviar la hinchazón y el dolor abdominal en pacientes con el Síndrome del Intestino Irritable⁹³; en modelo animal se ha observado que puede mejorar algunos parámetros de la colitis causada por *C. difficile*⁹⁴, o también, mejora la absorción y utilización de proteínas⁹⁵. *B. subtilis* puede estimular la respuesta inmune de personas de edad avanzada (60-74 años), reduciendo, por ejemplo, la frecuencia de infecciones respiratorias⁹⁶. *B. licheniformis* se ha relacionado con la prevención de parámetros de la obesidad⁹⁷ y también, presenta actividad antimicrobiana contra *S. aureus* o *L. monocytogenes*⁹⁸.

Uno de los aspectos que más atención reclama es la seguridad del empleo de estas cepas. No obstante, ya se han llevado a cabo diferentes estudios que demuestran su seguridad⁹⁹⁻¹⁰¹ y algunas cepas han sido clasificadas como GRAS, por ejemplo, *B. coagulans* GBI-30, 6086¹⁰² y

B. coagulans MTCC 5856¹⁰³. Así pues, Soares y cols. elaboraron un queso "requeijão cremoso" con dos cepas de *B. coagulans* (MTCC 5856 y GBI-30, 6086), dos de *B. subtilis* (PNX 21 y PB6) y una de *B. flexus* (HK1), concluyendo que el empleo de estas cepas es una buena opción debido a la alta viabilidad durante la fabricación y vida útil del producto¹⁰⁴.

Conclusiones

Las investigaciones realizadas indican que algunas cepas de SLAB y NSLAB que se encuentran habitualmente en diferentes quesos tienen efectos beneficiosos para la salud. Entre otros, destacarían: el alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa, en el caso de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*; la reducción del colesterol y de la hipertensión por *B. infantis*, *E. faecium* y *L. acidophilus* junto a *Bifidobacterium longum*; o la actividad antimicrobiana (frente a *E. coli* enteropatógena, *S. typhimurium*, *S. aureus* y *C. perfringens* en el caso de *L. acidophilus*; *S. typhi* en el caso de *L. lactis* subsp. *Lactis*, *L. monocytogenes* en el caso de *E. mundtii*, o *S. aureus* y *L. monocytogenes* en el caso de *B. coagulans*). Igualmente, destaca el tratamiento de la diarrea causada por *C. difficile*, en el caso de *L. rhamnosus*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. coagulans* o *S. thermophilus* junto a *L. bulgaricus*; la prevención de enfermedades inflamatorias como colitis o alergias respiratorias por *B. infantis*, *S. thermophilus*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *E. durans* y *B. coagulans*; o también, la actividad anticancerígena, en el caso de *B. infantis* y *L. lactis* subsp. *lactis*.

En definitiva, con el queso estaríamos ante un alimento funcional muy destacado. Aun así, en muchos estudios las cepas probióticas se adicionan intencionalmente en la elaboración del queso para fomentar su presencia y estudiar la viabilidad. Por lo tanto, para obtener resultados más objetivos se debería analizar la importancia funcional de microorganismos aislados de quesos. Asimismo, destacar que algunos estudios únicamente han sido realizados en modelos animales, por lo que deberían corroborarse en humanos. Además, algunos géneros incluyen patógenos destacados, como *Bacillus cereus*. Por ello, estos estudios deben ser complementados con ensayos de seguridad alimentaria para asegurar la inocuidad de los alimentos.

Agradecimientos

Gorka Santamarina-García agradece el contrato de Personal Investigador en Formación de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) y la participación en el programa Mentoring de EHUalumni.

Referencias

1. Koletzko B, Aggett PJ, Bindels JG, Bung P, Ferré P, Gil A, et al. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *Br J Nutr*. 1998; 80 (S1): S5-45.

2. Region G, America N, Andean N. ABOUT ILSI / ILSI EUROPE ILSI Europe Board of Directors members ILSI Europe Functional Food Task Force member companies [Internet]. 2002 [Consultado el 6 de mayo de 2020]. Disponible en: URL: <https://ilsi.eu/about-us/>
3. Martirosyan DM, Singh J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? *Funct Foods Heal Dis*. 2015; 5 (6): 209-223.
4. FAO/OMS. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation [Internet]. FAO Food and Nutrition Paper 85. Roma; 2006 [Consultado el 7 de mayo de 2020], pp. 1-46. Disponible en: URL: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>.
5. Turkmen N, Akal C, Özer B. Probiotic dairy-based beverages: A review. *J Funct Foods*. 2019; 53: 62-75.
6. FAO/OMS. NORMA GENERAL PARA EL QUESO. Codex Alimentarius, CXS 283-1978 Roma; 2018.
7. Barrientos M, Soria C. Dairy, Cheese Production by Country in 1000 MT [Internet]. IndexMundi. 2020 [Consultado el 23 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=cheese&graph=total-use>
8. Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. Fundamentals of cheese science, second edition. 2 ed. New York: Springer US; 2016.
9. Beresford T, Williams A. The Microbiology of Cheese Ripening. En: Fox PF, McSweeney PL, Cogan TM, Guinee TP, editores. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 3 ed. London: Elsevier; 2004.
10. Bokulich NA, Mills DA. Facility-specific "house" microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79 (17): 5214-23.
11. Somers EB, Johnson ME, Wong ACL. Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *J Dairy Sci*. 2001; 84 (9): 1926-36.
12. Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. Recent advances in cheese microbiology. En: International Dairy Journal. Elsevier; 2001, pp. 259-74.
13. Thierry A, Poga i T, Weber M, Lortal S. LAB of Fermented Foods and their Role in Flavour Formation. En: Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM, editores. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications: Second Edition. 2 ed. John Wiley & Sons, Ltd; 2015, pp. 316-30.
14. Blaya J, Barzideh Z, LaPointe G. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment1. *J Dairy Sci*. 2018; 101 (4): 3611-29.
15. Crow V, Curry B, Christison M, Hellier K, Holland R, Liu SQ. Raw milk flora and NSLAB as adjuncts. *Aust J Dairy Technol*. 2002; 57 (2): 99-105.
16. Gatti M, Bottari B, Lazzi C, Neviani E, Mucchetti G. Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal of Dairy Science*. 2014; 97 (2): 573-591.
17. Drici H, Gilbert C, Kihal M, Atlan D. Atypical citrate-fermenting *Lactococcus lactis* strains isolated from dromedary's milk. *J Appl Microbiol*. 2010; 108 (2): 647-57.
18. Marilley L, Casey MG. Flavours of cheese products: Metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int J Food Microbiol*. 2004; 90 (2): 139-59.
19. Gobetti M, De Angelis M, Di Cagno R, Mancini L, Fox PF. Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends Food Sci Technol*. 2015; 45 (2): 167-78.
20. Broadbent JR, Houck K, Johnson ME, Oberg CJ. Influence of adjunct use and cheese microenvironment on nonstarter bacteria in reduced-fat Cheddar-type cheese. *J Dairy Sci*. 2003; 86 (9): 2773-82.
21. Fitzsimons NA, Cogan TM, Condon S, Beresford T. Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *J Appl Microbiol*. 2001; 90 (4): 600-8.
22. Martley FG, Crow VL. Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *Int Dairy J*. 1993; 3 (4-6): 461-83.
23. Settanni L, Moschetti G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol*. 2010; 27 (6): 691-7.
24. Sousa MJ, Ardö Y, McSweeney PLH. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int Dairy J*. 2001; 11 (4-7): 327-45.

25. Irlinger F, Helinck S, Jany JL. Secondary and Adjunct Cultures. En: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editores. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition*. 4. ed. San Diego, California: Academic Press; 2017, pp. 273-300
26. McFarland L V. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Med Infect Dis*. 2007; 5 (2): 97-105.
27. Rowland I, Capurso L, Collins K, Cummings J, Delzenne N, Goulet O, et al. Current level of consensus on probiotic science report of an expert meeting. *Gut Microbes*. 2010; 1 (6): 436.
28. Mousavi Khaneghah A, Abhari K, Soares MB, Oliveira RBA, Hosseini H, et al. Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review. Vol. 95, *Trends Food Sci. Technol*. Elsevier Ltd; 2020, pp. 205-18.
29. Chapman CMC, Gibson GR, Rowland I. Health benefits of probiotics: Are mixtures more effective than single strains? *Eur J Nutr*. 2011; 50 (1): 1-17.
30. Goh YJ, Klaenhammer TR. Genomic features of Lactobacillus species. *Front Biosci*. 2009; 14: 1362-86.
31. Cai Y, Pang H, Kitahara M, Ohkuma M, Yimin Cai cai C. Lactobacillus nasuensis sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus Lactobacillus. *Rev Int*. 2012; 62 (5): 1140-4.
32. Collado Amores MC. Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Valencia: Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia; 2004.
33. Hammes WP, Vogel RF. The genus Lactobacillus. En: Wood BJB, Holzappel WH, editores. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. London: Springer; 1995, pp. 19-54.
34. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media; 2011.
35. Hammes WP, Hertel C. Genus I. Lactobacillus Beijerinck, 1901. En: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H WW, editor. *Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 3, 2nd edn*. Berlin: Springer; 2009, pp. 465-510.
36. Shah NP. Probiotic bacteria: Antimicrobial and antimutagenic properties. *Probiotica*. 1999; 6: 1-3.
37. Shah NP. Probiotics and prebiotics. *Agro Food Ind Hi Tech*. 2004; 15 (1): 13-6.
38. Szajewska H, Skórka A, Ruszczy ski M, Gieruszczak-Białek D. Meta-Analysis: Lactobacillus GG for treating acute gastroenteritis in children-Updated analysis of randomised controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013; 38 (5): 467-76.
39. Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz JZ, Armńska M, Mikołajczyk W. Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr*. 2001; 138 (3): 361-5.
40. Horvath A, Dziechciarz P, Szajewska H. Meta-analysis: Lactobacillus rhamnosus GG for abdominal pain-related functional gastrointestinal disorders in childhood. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011; 33 (12): 1302-10.
41. Pedone CA, Arnaud CC, Postaire ER, Bouley CF, Reinert P. Multicentric study of the effect of milk fermented by Lactobacillus casei on the incidence of diarrhoea. *Int J Clin Pract*. 2000; 54 (9): 568-71.
42. Pedone CA, Bernabeu AO, Postaire ER, Bouley CF, Reinert P. The effect of supplementation with milk fermented by Lactobacillus casei (strain DN-114 001) on acute diarrhoea in children attending day care centres. *Int J Clin Pract*. 1999; 53 (3): 179-84.
43. Sýkora J, Valeková K, Amlerová J, Siala K, Ddek P, Watkins S, et al. Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic Lactobacillus casei DN-114 001 and the eradication of *H. pylori* in children: A prospective randomized double-blind study. *J Clin Gastroenterol*. 2005; 39 (8): 692-8.
44. Coccorullo P, Strisciuglio C, Martinelli M, Miele E, Greco L, Staiano A. Lactobacillus reuteri (DSM 17938) in infants with functional chronic constipation: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Pediatr*. 2010; 157 (4): 598-602.
45. Romano C, Ferrau' V, Cavataio F, Iacono G, Spina M, Lionetti E, et al. Lactobacillus reuteri in children with functional abdominal pain (FAP). *J Paediatr Child Health*. 2014; 50 (10): E68-71.
46. Savino F, Cordisco L, Tarasco V, Palumeri E, Calabrese R, Oggero R, et al. Lactobacillus reuteri DSM 17938 in infantile colic: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics*. 2010; 126 (3): e526-33.
47. Ibrahim F, Ruvio S, Granlund L, Salminen S, Viitanen M, Ouwehand AC. Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 59 (1): 53-9.
48. Sperry MF, Silva HLA, Balthazar CF, Esmerino EA, Verruck S, Prudencio ES, et al. Probiotic Minas Frescal cheese added with L. casei 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women-A randomized double-blind pilot trial. *J Funct Foods*. 2018; 45: 435-43.
49. Zhang L, Zhang X, Liu C, Li C, Li S, Li T, et al. Manufacture of Cheddar cheese using probiotic Lactobacillus plantarum K25 and its cholesterol-lowering effects in a mice model. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013; 29 (1): 127-35.
50. Scardovi V. Genus Bifidobacterium. En: Sneath PHA, Mair NS, Sharp ME, Holt JG, editores. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1 ed. Vol 2. Baltimore, Maryland: The Williams and Wilkins Co; 1986, pp. 1418-34.
51. Sgorbati B, Biavati B, Palenzona D. The genus Bifidobacterium. En: Holzappel WHN, Wood BJ, editores. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Boston: Springer US; 1995, pp. 279-306.
52. Konieczna P, Groeger D, Ziegler M, Frei R, Ferstl R, Shanahan F, et al. Bifidobacterium infantis 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: Potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut*. 2012; 61 (3): 354-66.
53. Pereira DIA, Gibson GR. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68 (9): 4689-93.
54. Zhu H, Li Z, Mao S, Ma B, Zhou S, Deng L, et al. Antitumor effect of sFlt-1 gene therapy system mediated by Bifidobacterium Infantis on Lewis lung cancer in mice. *Cancer Gene Ther*. 2011; 18 (12): 884-96.
55. Daigle A, Roy D, Bélanger G, Vuilleumard JC. Production of probiotic cheese (Cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by Bifidobacterium infantis. *J Dairy Sci*. 1999; 82 (6): 1081-91.
56. Lollo PCB, Cruz AG, Morato PN, Moura CS, Carvalho-Silva LB, Oliveira CAF, et al. Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. *J Dairy Sci*. 2012; 95 (7): 3549-58.
57. Lollo PCB, Morato PN, Moura CS, Almada CN, Felicio TL, Esmerino EA, et al. Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. *Food Res Int*. 2015; 76: 611-7.
58. Verruck S, Prudêncio ES, Vieira CRW, Amante ER, de Mello Castanho Amboni RD. The buffalo Minas Frescal cheese as a protective matrix of Bifidobacterium BB-12 under invitro simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Sci Technol*. 2015; 63 (2): 1179-83.
59. Jungersen M, Wind A, Johansen E, Christensen J, Stuer-Lauridsen B, Eskesen D. The Science behind the Probiotic Strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12®. *Microorganisms*. 2014; 2 (2): 92-110.
60. Schleifer KH, Ludwig W. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. En: Wood, BJB, Holzappel WH, editores. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. London: Chapman & Hall; 1995, pp. 7-18.
61. Rodríguez G. 17. Géneros Streptococcus y Enterococcus. En: *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 2 ed. Oficina del Libro FEFMUR; 2006, pp. 273-90.
62. Hossain Z. Bacteria: Streptococcus. En: Motarjemi Y, Moy G, Todd E, editores. *Encyclopedia of Food Safety*. San Diego, California: Academic Press; 2014, pp. 535-45.
63. Fox P, McSweeney P, Cogan T, Guinee T, editores. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3 ed. Vol. 2. London: Academic Press; 2004, pp. 1-456.
64. EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J*. 2010; 8 (10): 1763.
65. Rodríguez C, Medici M, Rodríguez A V., Mozzi F, de Valdez GF. Prevention of chronic gastritis by fermented milks made with exopolysaccharide-producing Streptococcus thermophilus strains. *J Dairy Sci*. 2009; 92 (6): 2423-34.

66. Saavedra JM, Bauman NA, Perman JA, Yolken RH, Saavedra JM, Bauman NA, et al. Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*. 1994; 344 (8929): 1046-9.
67. Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: Tolerance and safety. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79 (2): 261-7.
68. Beniwal RS, Arena VC, Thomas L, Narla S, Imperiale TF, Chaudhry RA, et al. A Randomized Trial of Yogurt for Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea. *Dig Dis Sci*. 2003; 48 (10): 2077-82.
69. Conway S, Hart A, Clark A, Harvey I. Does eating yogurt prevent antibiotic-associated diarrhoea? *Br J Gen Pract*. 2007; 57 (545): 953-9.
70. Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpper-Bälz R, Collins MD, Fischer W. Transfer of Streptococcus lactis and Related Streptococci to the Genus Lactococcus gen. nov. *Syst Appl Microbiol*. 1985; 6 (2): 183-95.
71. Casalta E, Montel MC. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactococcus genus. *Int J Food Microbiol*. 2008; 126 (3): 271-3.
72. Teuber M. The genus Lactococcus. En: Wood BJB, Holzapfel WH, editores. The Genera of Lactic Acid Bacteria. London: Blackie Academic & Professional; 1995, pp. 173-234.
73. Jaskulski IB, Uecker J, Bordini F, Moura F, Gonçalves T, Chaves NG, et al. In vivo action of Lactococcus lactis subsp. lactis isolate (R7) with probiotic potential in the stabilization of cancer cells in the colorectal epithelium. *Process Biochem*. 2020; 91: 165-71.
74. Kumar A, Kundu S, Debnath M. Effects of the probiotics Lactococcus lactis (MTCC-440) on Salmonella enteric serovar Typhi in co-culture study. *Microb Pathog*. 2018; 120: 42-6.
75. Komaki S, Haque A, Miyazaki H, Matsumoto T, Nakamura S. Unexpected effect of probiotics by Lactococcus lactis subsp. lactis against colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *J Infect Chemother*. 2020; 26 (6): 549-53.
76. Holzapfel W, Wood B. Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. John Wiley & Sons; 2014.
77. Díaz P, Rodríguez M, Y RZ-RC de H, 2010 U. Fundamental features on he Enterococcus genus as a very important pathogen at present time. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 2010; 48 (2): 147-61.
78. Facklan R, Sahm F. Enterococcus. En: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenoer F, Tenover J, Tenover J, editors. Manual of Clinical Microbiology. 6 ed. Washington D.C.: American Society of Microbiology; 1995.
79. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol*. 2006; 106 (1): 1-24.
80. Franz CMAP, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol*. 2011; 151 (2): 125-40.
81. Hlivak P, Odraska J, Ferencik M, Ebringer L, Jahnova E, Mikes Z. One-year application of probiotic strain Enterococcus faecium M-74 decreases serum cholesterol levels. *Bratisl Lek Listy*. 2005; 106 (2): 67-72.
82. Avram-Hananel L, Stock J, Parlesak A, Bode C, Schwartz B. Edurans strain M4-5 isolated from human colonic flora attenuates intestinal inflammation. *Dis Colon Rectum*. 2010; 53 (12): 1676-86.
83. Ramiah K, ten Doeschate K, Smith R, Dicks LMT. Safety Assessment of Lactobacillus plantarum 423 and Enterococcus mundtii ST4SA Determined in Trials with Wistar Rats. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2009; 1 (1): 15-23.
84. Van Zyl WF, Deane SM, Dicks LMT. Enterococcus mundtii ST4SA and Lactobacillus plantarum 423 excludes Listeria monocytogenes from the GIT, as shown by bioluminescent studies in mice. *Benef Microbes*. 2016; 7 (2): 227-35.
85. Alais C, editor. Desarrollo y acción de microorganismos en la leche. En: Ciencia de la leche: principios de técnica lechera. Barcelona: Editorial Reverté S.A.; 1985, pp. 337-59.
86. Kramer J, Gilbert R. Bacillus cereus and Other Bacillus Species. En: Doyle M, editor. Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker; 1989, pp. 21-64.
87. Thwaitte JE, Atkins HS. Bacillus: Anthrax; food poisoning. En: Greenwood D, Barer M, Slack R, Irving W, editores. Medical Microbiology. 18 ed. Elsevier Inc.; 2012, pp. 237-44.
88. Bratcher DF. Bacillus Species (Anthrax). En: Long SS, Prober CG, Fischer M editores. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 5ª ed. Elsevier Inc.; 2018, pp. 770-773.
89. Cutting SM. Bacillus probiotics. *Food Microbiol*. 2011; 28 (2): 214-20.
90. Spinosa MR, Braccini T, Ricca E, De Felice M, Morelli L, Pozzi G, et al. On the fate of ingested Bacillus spores. *Res Microbiol*. 2000; 151 (5): 361-8.
91. Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, Woodward MJ, Henriques AO. Screening for Bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71 (2): 968-78.
92. Nyangale EP, Farmer S, Cash HA, Keller D, Chernoff D, Gibson GR. Bacillus coagulans GBI-30, 6086 Modulates Faecalibacterium prausnitzii in Older Men and Women. *J Nutr*. 2015; 145 (7): 1446-52.
93. Hun L. Original research: Bacillus coagulans significantly improved abdominal pain and bloating in patients with IBS. *Postgrad Med*. 2009; 121 (2): 119-24.
94. Fitzpatrick LR, Small JS, Greene WH, Karpa KD, Keller D. Bacillus Coagulans GBI-30 (BC30) improves indices of Clostridium difficile-Induced colitis in mice. *Gut Pathog*. 2011; 3 (1): 1-9.
95. Jäger R, Purpura M, Farmer S, Cash HA, Keller D. Probiotic Bacillus coagulans GBI-30, 6086 improves protein absorption and utilization. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2018; 10 (4): 611-5.
96. Lefevre M, Racedo SM, Ripert G, Housez B, Cazaubiel M, Maudet C, et al. Probiotic strain Bacillus subtilis CU1 stimulates immune system of elderly during common infectious disease period: A randomized, double-blind placebo-controlled study. *Immun Ageing*. 2015; 12 (1): 1-11.
97. Choi J-H, Pichiah PBT, Kim M-J, Cha Y-S. Cheonggukjang, a soybean paste fermented with B. licheniformis-67 prevents weight gain and improves glycemic control in high fat diet induced obese mice. *J Clin Biochem Nutr*. 2016; 59 (1): 31-8.
98. Shobharani P, Padmaja RJ, Halami PM. Diversity in the antibacterial potential of probiotic cultures Bacillus licheniformis MCC2514 and Bacillus licheniformis MCC2512. *Res Microbiol*. 2015; 166 (6): 546-54.
99. Endres JR, Clewell A, Jade KA, Farber T, Hauswirth J, Schauss AG. Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, Bacillus coagulans, as a food ingredient. *Food Chem Toxicol*. 2009; 47 (6): 1231-8.
100. Endres JR, Qureshi I, Farber T, Hauswirth J, Hirka G, Pasic I, et al. One-year chronic oral toxicity with combined reproduction toxicity study of a novel probiotic, Bacillus coagulans, as a food ingredient. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49 (5): 1174-82.
101. Salvetti E, Orrù L, Capozzi V, Martina A, Lamontanara A, Keller D, et al. Integrate genome-based assessment of safety for probiotic strains: Bacillus coagulans GBI-30, 6086 as a case study. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 100 (10): 4595-605.
102. FDA. GRAS Notice No. GRN 000660 [Internet]. 2017 [Consultado el 18 de Mayo de 2020]. Disponible en: URL: <https://www.fda.gov/media/104471/download>.
103. FDA. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000597 [Internet]. 2016 [Consultado el 18 de Mayo de 2020]. Disponible en: URL: <https://www.fda.gov/food/gras-notice-inventory/agency-response-letter-gras-notice-no-grn-000597>.
104. Soares MB, Almada CN, Martinez RCR, Pereira EPR, Balthazar CF, et al. Behavior of different Bacillus strains with claimed probiotic properties throughout processed cheese ("requeijão cremoso") manufacturing and storage. *Int J Food Microbiol*. 2019; 307 (108288): 1-9.