



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“COMPARACIÓN DE MEZCLAS DE BACTERIAS
LÁCTICAS COMO BIOCONSERVADORES Y SU
POSIBLE EFECTO EN UN QUESO TIPO UNTABLE”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

JOB JIMÉNEZ MONROY

ASESORES:

**Dra. CLARA INÉS ÁLVAREZ MANRÍQUE
I.B.Q. LETICIA FIGUEROA VILLARREAL**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Comparación de Mezclas de Bacterias Lácticas
como Bioconservadores y su Posible Efecto en
un Queso Tipo Untable.

que presenta el pasante: Job Jiménez Monroy
con número de cuenta: 09951137-3 para obtener el título de:
Ingeniero en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Mayo de 2005

PRESIDENTE	Dra. Clara Inés Álvarez Manríque	
VOCAL	IBQ. Saturnino Maya Ramírez	
SECRETARIO	MC. María Eugenia Ramírez Ortiz	
PRIMER SUPLENTE	MC. María Guadalupe Amaya León	
SEGUNDO SUPLENTE	IA. Miriam Edith Fuentes Romero	

AGRADECIMIENTOS

A ti Papá: Gracias por tu comprensión, por tu apoyo incondicional y por que siempre has creído en mi. Siempre estarás en mi pensamiento.

A ti Mamá: Gracias por tu cariño, por tu comprensión y por tu apoyo sincero.

Asesoras: I.B.Q. Leticia y Dra. Clara Inés. Gracias por su orientación, por las atenciones y por su valioso tiempo al desarrollo y término de esta tesis.

M. en C. Maria Eugenia: Gracias por su orientación y apoyo durante la experimentación en el laboratorio de LAPRYFAL y para la terminación de esta tesis.

INDICE

Introducción	VII
CAPITULO I Generalidades	
1.1. Leche como materia prima	
1.1.1.- Definición de la leche	1
1.1.2.- Aspectos nutritivos de la leche	1
1.1.3.- Definición del queso	2
1.1.4.- Aspectos nutritivos del queso	3
1.1.5.- Clasificación de los queso	3
1.1.6.- Queso fresco tipo untable	5
1.1.7.- Descripción general del proceso de elaboración del queso tipo untable	7
1.1.8.- Coagulación enzimática	8
1.1.9.- Patógenos más comunes asociados a la leche	10
1.2. Cultivos Iniciadores	
1.2.1.- Importancia del cultivo iniciador	12
1.2.2.- Clasificación de los microorganismos utilizados como cultivo iniciador	12
1.2.3.- Tecnología de los cultivos iniciadores	13
1.2.4.- Cultivos iniciadores de los quesos	15
1.2.5.- Sistemas biológicos de conservación	17
1.2.6.- Bacteriocinas	18
1.2.6.1.- Clasificación de las bacteriocinas	19
1.2.6.2.- Mecanismo de acción de las bacteriocinas	19
1.2.6.3.- Principales bacteriocinas estudiadas y utilizadas en la elaboración de alimentos	23
1.2.7.- Bioquímica de la formación de ácido láctico	26
1.2.8.- Producción de compuestos aromáticos	28
1.2.8.1.- Producción de diacetilo	29
1.2.8.2.- Producción de acetaldehído	30
1.3.- Textura	30
1.3.1.- Técnicas instrumentales	31

CAPITULO II

2. Metodología	
2.1.- Objetivo general	33
2.2.- Objetivos particulares	33
2.3.- Metodología	
2.3.1.- Cuadro metodológico	34
2.4.- Descripción del cuadro metodológico	
➤ Actividad 1.1: Selección de las cepas (2M6, ATCC y 143-3) en base a su capacidad inhibitoria sobre ETEC.	35
➤ Actividad 2.1: Efecto de la actividad antibacteriana de la mezcla seleccionada y la mezcla SLH A-B en leche reconstituida contra ETEC.	36
➤ Actividad 2.2: Efecto del sobrenadante de las mezclas de <i>Lactobacillus</i> diluidas (25, 50, 75% y sin diluir) sobre la inhibición de microorganismos patógenos.	36
➤ Actividad 3.1: Aplicación de las mezclas en la elaboración del queso tipo untable.	36
➤ Actividad 3.2: Análisis químico al producto.	41
➤ Actividad 3.3: Análisis fisicoquímico y de aroma al producto.	41
➤ Actividad 3.4: Prueba de adhesividad al producto.	42
➤ Actividad 4.1: Análisis de la actividad inhibitoria en el producto.	44
➤ Actividad 4.2: Evaluación del efecto antagónico de la flora láctica natural de la leche sobre las mezclas utilizadas como cultivo iniciador.	45

CAPITULO III

3. Resultados y análisis de resultados

➤ Actividad 1.1: Selección de las cepas (2M6, ATCC y 143-3) en base a su capacidad inhibitoria sobre ETEC.	46
➤ Actividad 2.1: Efecto de la actividad antibacteriana de la mezcla seleccionada y la mezcla SLH A-B en leche reconstituida contra ETEC.	47
➤ Actividad 2.2: Efecto del sobrenadante de las mezclas de <i>Lactobacillus</i> diluidas (25, 50, 75% y sin diluir) sobre la inhibición de microorganismos patógenos.	52
➤ Actividad 3.1: Aplicación de las mezclas en la elaboración del queso tipo untable.	56
➤ Actividad 3.2: Análisis químico al producto.	56
➤ Actividad 3.3: Análisis fisicoquímico y de aroma al producto.	57
➤ Actividad 3.4: Prueba de adhesividad al producto.	60
➤ Actividad 4.1: Análisis de la actividad inhibitoria en el producto.	62
➤ Actividad 4.2: Evaluación del efecto antagónico de la flora láctica natural de la leche sobre las mezclas utilizadas como cultivo iniciador.	65
Conclusiones	66
Bibliografía	67

INDICE DE TABLAS

No. Tabla:	Titulo	Pág.
1.-	Clasificación de los quesos de acuerdo a su humedad y tipo de maduración.	4
2.-	Bacterias lácticas que se utilizan como cultivos iniciadores.	16
3.-	Microorganismos que pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas del género <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> .	18
4.-	Tipos de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas.	21
5.-	Espectro de inhibición de bacterias contra microorganismos no lácticos.	22
6.-	Criterio para el uso de cultivos iniciadores productores de sakacina como protección en productos cárnicos.	26
7.-	Inhibición de <i>Salmonella typhi</i> por los metabolitos producidos por la mezcla 2M6-ATCC a diferentes % de dilución (25, 50, 75 y 100%).	52
8.-	Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> por los metabolitos producidos por la mezcla 2M6-ATCC a diferentes % de dilución (25, 50, 75 y 100%).	53
9.-	Inhibición de <i>Salmonella typhi</i> por lo metabolitos producidos por la mezcla SLH A-B a diferentes % de dilución (25, 50, 75 y 100%).	53
10.-	Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> por lo metabolitos producidos por la mezcla SLH A-B a diferentes % de dilución (25, 50, 75 y 100%).	54
11.-	Comparación de la acción bactericida de los metabolitos producidos por las mezclas 2M6-ATCC y SLH A-B sobre el crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> .	54
12.-	Composición química del queso fresco tipo untable, utilizando las cepas 2M6-ATCC y SLH A-B	56
13.-	Composición química del queso fresco crema.	56
14.-	Resultados obtenidos sobre la producción de aroma en los quesos elaborados, durante 15 días almacenados en refrigeración.	59
15.-	Valores de fuerza máxima para el diseño de bloques aleatorios.	60
16.-	Comparación de los pares de medias por el método de Duncan.	61
17.-	Porcentaje de inhibición que ejerce la flora natural de la leche sobre las cepas utilizadas como cultivo iniciador después de 24 hrs. de contacto.	65

INDICE DE FIGURAS

No. Figura:	Título	Pág.
1.-	Diagrama general de elaboración del queso tipo untable.	6
2.-	Mecanismo general de acción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas en las células Gram-positivas sensibles.	20
3.-	Metabolismo de la lactosa en las bacterias ácido lácticas homofermentativas.	28
4.-	Cuadro metodológico.	34
5.-	Diagrama de proceso del queso tipo untable a nivel experimental.	38
6.-	Cantidad de leche utilizada para la elaboración del queso y el cultivo iniciador a una concentración de 1.5%.	39
7.-	Formación de granos de la cuajada.	40
8.-	Separación de la cuajada y el lactosuero a través de un paño.	40
9.-	Conteo de lactobacilos en Agar Rogosa (a) y coliformes en agar MacConkey (b).	47
10.-	Comprobación en placa de la inhibición del crecimiento de <i>Salmonella typhi</i> en Agar Salmonella-Shigella (a) y <i>Listeria monocytogenes</i> en Agar BHI (b).	52

INDICE DE GRÁFICAS

No. Gráfica	Título	Pág.
1.-	Inhibición del crecimiento de ETEC por metabolitos de <i>Lactobacillus spp.</i>	46
2.-	Evolución del crecimiento de la mezcla 2M6-ATCC en leche reconstituida.	48
3.-	Inhibición del crecimiento de ETEC por la mezcla 2M6-ATCC en leche reconstituida.	49
4.-	Evolución del crecimiento de la mezcla SLH A-B en leche reconstituida.	50
5.-	Inhibición del crecimiento de ETEC por la mezcla SLH A-B en leche reconstituida.	50
6.-	Comparación del crecimiento de las mezclas 2M6-ATCC y SLH A-B en leche reconstituida.	51
7.-	Comparación del pH de los quesos elaborados utilizando diferentes <i>Lactobacillus</i> .	57
8.-	Comparación de la acidez en quesos frescos utilizando diferentes <i>Lactobacillus</i> .	57
9.-	Adhesividad en el queso fresco elaborado con cultivos iniciadores.	60
10.-	Evolución del crecimiento de los <i>Lactobacillus</i> en el queso tipo untable.	62
11.-	Efecto de la mezcla de <i>Lactobacillus</i> sobre la inhibición del crecimiento de microorganismos coliformes.	63

INTRODUCCIÓN

Los productos lácteos fermentados están aumentando su popularidad como alimentos nutritivos, estables, naturales y saludables. El aroma, el sabor y la textura de los alimentos lácteos fermentados a menudo se debe al crecimiento de bacterias ácido lácticas (Byong, 2000).

Las bacterias ácido-lácticas forman un grupo diverso de microorganismos, entre los cuales están los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Son microorganismos Gram-positivos, catalasa, reductasa y oxidasa negativos, inmóviles e incapaces de formar esporas (Bourgeois-Larpent, 1995; Byong, 2000, Early, 2000).

Algunas cepas de bacterias ácido lácticas asociadas a los alimentos fermentados producen unas proteínas bacterianas denominadas bacteriocinas (Beuchat et al., 2001). Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza proteica y actividad antimicrobiana (Byong, 2000).

Las bacteriocinas pueden inhibir a algunas bacterias patógenas sin cambiar la naturaleza fisicoquímica del alimento a conservar (Beuchat et al., 2001). Así mismo también algunas bacterias ácido lácticas se caracterizan por la síntesis de ácido láctico y la tolerancia de las bacterias lácticas a este ácido orgánico y a un pH inferior a 7, por lo que se pueden utilizar en la conservación de alimentos: (productos lácteos, productos cárnicos, productos vegetales fermentados, etc). Estas condiciones que para las bacterias lácticas son soportables, para otros microorganismos no lo son: (*Pseudomonas*, *Enterobacterias*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, etc) (Bourgeois-Larpent, 1995).

La leche es un alimento excelente para los mamíferos y también lo es para los microorganismos. Durante su conservación y transporte, la leche presenta numerosos problemas microbiológicos, higiénicos y sanitarios. Pero desde hace tiempo el hombre ha sabido prolongar la vida útil de la leche mediante la acidificación añadiendo jugo de limón, y principalmente por la formación de ácido láctico por *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (Bourgeois-Larpent, 1995).

La transformación de la leche en queso es una excelente forma de conservación mediante la acidificación, coagulación y desuerado de la cuajada. La coagulación y el desuerado implican un grado de desecación que dificulta el crecimiento de los microorganismos, la acidificación producida por el metabolismo de las bacterias lácticas es una barrera contra el desarrollo de las bacterias proteolíticas, responsables de la putrefacción, y el de otros microorganismos (Bourgeois-Larpent, 1995).

A pesar de las mejoras en el proceso de los alimentos el número de toxiinfecciones asociadas al consumo de alimentos continúa estando presente; y junto a este aspecto, existe una tendencia por parte de los consumidores a favor de los alimentos menos procesados. Consecuencia de ello es el interés en la bioconservación mediante bacterias lácticas. El objetivo de la bioconservación es extender la vida útil y aumentar la seguridad de los alimentos utilizando una microflora natural o controlada y/o sus productos metabólicos.

Algunas bacteriocinas tienen un amplio espectro de inhibición sobre otras bacterias entre las que se encuentran patógenos asociados a alimentos como *Listeria*, *Staphylococcus*, y algunos *Bacillus*.

Dado que en la industria alimentaria ha aumentado el uso de bacteriocinas y microorganismos que las producen resulta atractivo el empleo de *Lactobacillus* como bioconservador en la elaboración de un queso fresco, para mejorar su seguridad y calidad de una forma más natural y saludable.

La finalidad del presente estudio fue el de aplicar dos mezclas de *Lactobacillus* en la elaboración de un queso tipo untable. Dichas mezclas estaban compuestas por *Lactobacillus spp.* *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus*. Con el objetivo de estudiar el efecto bioconservador de estas mezclas aplicadas en la elaboración del queso; así como también comparar el efecto fisicoquímico, textural y microbiológico del queso obtenido; durante un periodo de 15 días.

CAPITULO I

1.1. Generalidades

Leche como materia prima

1.1.1.- Definición:

La norma oficial mexicana (NOM) nos dice que la leche es el producto proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas, o de otras especies animales. Se excluye el producto obtenido 15 días antes del parto y 5 días después de éste o cuando tenga calostro (NOM-121-SSA-1994).

1.1.2.- Aspectos nutritivos de la leche

La leche de vaca contiene casi todos los constituyentes de importancia nutricional para el hombre; ya que está compuesta por una mezcla compleja de lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales. Pero es deficiente en vitamina C y D (Buss et al., 1997; Fennema, 2000).

La leche es particularmente valiosa por su contenido en proteínas de alta calidad (caseína, lactoglobulina y lactoalbúmina) y calcio fácilmente asimilable, así como por ser una fuente de riboflavina. La leche entera es además una fuente importante de energía, especialmente para los lactantes. Sin embargo, la leche descremada y semidescremada puede ser muy útil para las personas que beben mucha leche pero que quieren reducir su consumo de grasa, (Buss et al., 1997). El contenido en colesterol es moderado, unos 14 mg por 100 g. (Cervera et al., 1999).

En la leche es notable el contenido de vitamina B₂ o riboflavina, vitamina termorresistente (resiste la ebullición) aunque fotosensible (se destruye con la luz). Es de notar que la leche de vaca es pobre en vitamina C. En cambio, disuelta en la grasa láctea, se encuentran la vitamina A. El agua constituye el 87% del peso total de la leche. En ella se encuentran los nutrientes en suspensión. Conviene resaltar la presencia del sodio en cantidades relativamente elevadas (Cervera et al., 1999; Fennema, 2000).

Debido a la facilidad con que la leche se descompone por acción de la flora bacteriana, se utilizan diversos métodos para su conservación y por consiguiente trae la pérdida de ciertos nutrientes:

En la *leche pasteurizada* (72° C por 15 segundos) se pierde aproximadamente un 10% de tiamina y de vitamina B₁₂, y un 25% de la vitamina C. Las pérdidas producidas durante la elaboración de *leche en polvo* por atomización y la *leche ultrapasteurizada* (130° C por 1-2

segundos) también determinan pérdidas vitamínicas muy semejantes a las producidas por la pasteurización. En la *leche esterilizada* (120° C por 20-60 minutos), se pierde aproximadamente 60% de vitamina C y el 20% de tiamina contenidas en la leche original. La *leche evaporada* se obtiene por concentración de la leche líquida a bajas temperaturas; posteriormente se esteriliza en las latas (115° C por 15 minutos), en general las pérdidas de nutrientes son similares a las producidas en la elaboración de leche esterilizada (Buss et al., 1997).

1.1.3.- Definición del queso

General: Según la NOM nos dice que es el producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiados, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento posterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos (NOM-121-SSA1-1994).

Fresco: Es el producto que cumplen de manera general con lo señalado anteriormente y se caracteriza por ser un producto de alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración (NOM-121-SSA1-1994).

Madurado: Este producto se caracteriza por ser de pasta dura, semidura o blanda, con o sin corteza; sometido a un proceso de maduración mediante la adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en él cambios bioquímicos y físicos característicos del producto de que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, el cual puede o no requerir condiciones de refrigeración (NOM-121-SSA1-1994).

Procesado: Es el producto que se caracteriza por ser elaborado con mezclas de quesos, fusión y emulsión con sales fundentes, aditivos para alimentos permitidos e ingredientes opcionales, sometidos a proceso térmico de 70° C durante 30 segundos o someterse a cualquier otra combinación equivalente o mayor de tiempo y temperatura, lo que le permite prolongar su vida de anaquel (NOM-121-SSA1-1994).

1.1.4.- Aspectos nutritivos del queso

Cuando se añade cuajo a la leche templada y acidificada, la caseína de la leche coagula formando una cuajada firme que puede ser sometida a diferentes tratamientos para elaborar distintos tipos de queso. La mayor parte de las proteínas, la grasa, la vitamina A y una gran cantidad de calcio quedan retenidos en la cuajada, mientras que la mayor parte de la lactosa y de las vitaminas del grupo B se pierden en el suero que se elimina por el desuerado. Durante la maduración y el almacenamiento, operaciones que están considerablemente influenciadas por el contenido en sal, pueden producirse cambios de menor importancia en el contenido en vitaminas (Buss et al., 1997), hidrólisis de lípidos y de proteínas (Cervera et al., 1999).

Composición del queso

- Proteínas, entre el 25 y el 35%. A mayor cantidad de agua corresponde un porcentaje menor de proteínas (Cervera et al., 1999).
- Grasas, entre el 16 y el 40% o más, dependiendo del % humedad y de que el queso haya sido enriquecido o no con grasa láctea. La cantidad de colesterol corresponde al que se encuentra en la grasa láctea presente en el queso (Cervera et al., 1999).
- Los quesos maduros y los fundidos no contienen lactosa, ya que se ha expulsado con el suero, o bien se ha provocado su fermentación (Cervera et al., 1999).
- El queso contiene niveles apreciables de minerales, de los que el calcio, el hierro y el fósforo son los más importantes (Scott, 2002).

Las personas intolerantes a la lactosa, es decir aquellos adultos que tienen deficiencia de lactasa en sus secreciones digestivas, normalmente pueden comer queso, excepto aquellos quesos frescos, muy blandos, que pueden contener aún apreciables cantidades de lactosa sin fermentar (Scott, 2002).

1.1.5.- Clasificación de los quesos

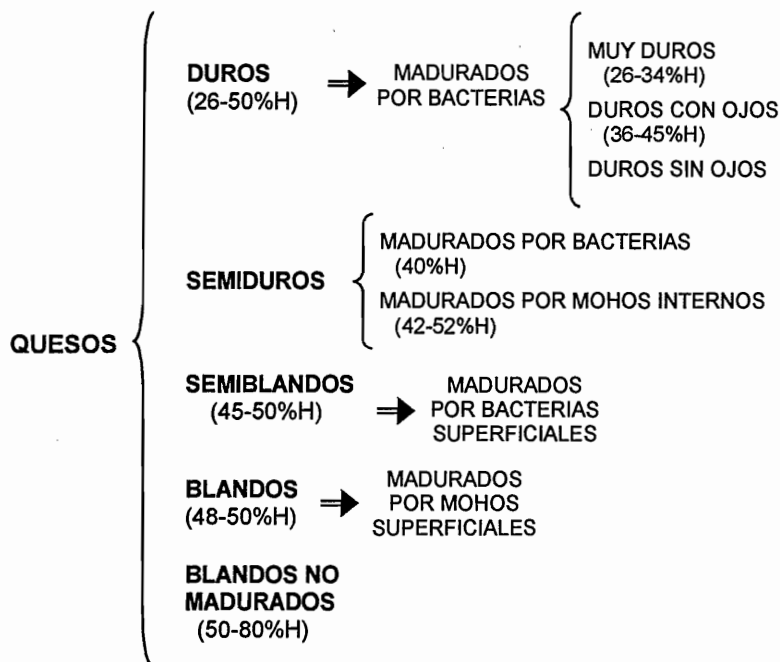
Existe una gran variedad de quesos, y por lo mismo es difícil establecer una división rígida de ellos. Debido a sus características que se pueden usar para agruparlos son múltiples y no siempre son comunes a todas las variedades de quesos (Madrid, 1994; Robinson, 1997).

Son varios los criterios que se pueden seguir para su clasificación según (Madrid, 1994):

- La leche con la que hayan sido elaborados.
- El método de coagulación de la leche.
- El contenido en humedad del queso.
- El contenido en grasa del queso.
- La textura del queso acabado.
- El método seguido en su maduración.
- El tipo de microorganismo empleados en su elaboración.
- El país o región de origen.

A continuación en la Tabla 1 se presenta una clasificación de los quesos de acuerdo a su humedad y tipo de maduración (Madrid, 1994; Robinson, 1997).

Tabla 1: Clasificación de los quesos de acuerdo a su humedad y tipo de maduración (Madrid, 1994; Robinson, 1997).



El contenido en agua de los quesos es uno de los criterios más importantes para su clasificación. Según los métodos de elaboración, la separación de suero puede ser muy reducida o muy fuerte, con lo que resultarán quesos de mayor o menor humedad. El proceso de maduración influye también mucho en este aspecto. Los quesos frescos que no han

sufrido un proceso de maduración tienen un alto contenido acuoso, mientras que aquellos que son sometidos a varios meses de maduración pierden paulatinamente gran parte de su humedad (Madrid, 1994).

1.1.6.- Queso fresco tipo untable

Queso crema: Es el resultado de la coagulación enzimática de la leche desnatada, parcialmente desnatada, entera e incluso enriquecida con crema. Una vez obtenida y desuerada la cuajada se mezcla bajo una gran turbulencia hasta obtener una textura untuosa. Se pueden incorporar algunos condimentos o finas hierbas que contribuyen a intensificar su sabor (Early, 2000; Scott, 2002; Spreer, 1991).

Este tipo de queso se consume en estado fresco. Durante su proceso de elaboración experimenta una serie de cambios, como lo es la fermentación láctica que se desarrolla en la leche destinada a la elaboración del queso, por lo que los cultivos lácticos juegan un papel importante. La diferencia con respecto a otros quesos es que no tiene lugar una actividad proteolítica dirigida, como sucede en la fase de maduración principal de otros quesos (Spreer, 1991).

Los cultivos pueden estar compuestos por bacterias lácticas mesófilas como *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* var. *diacetylactis* y *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris*; con una proporción aproximada de 1.0-2.5% (Madrid, 1994).

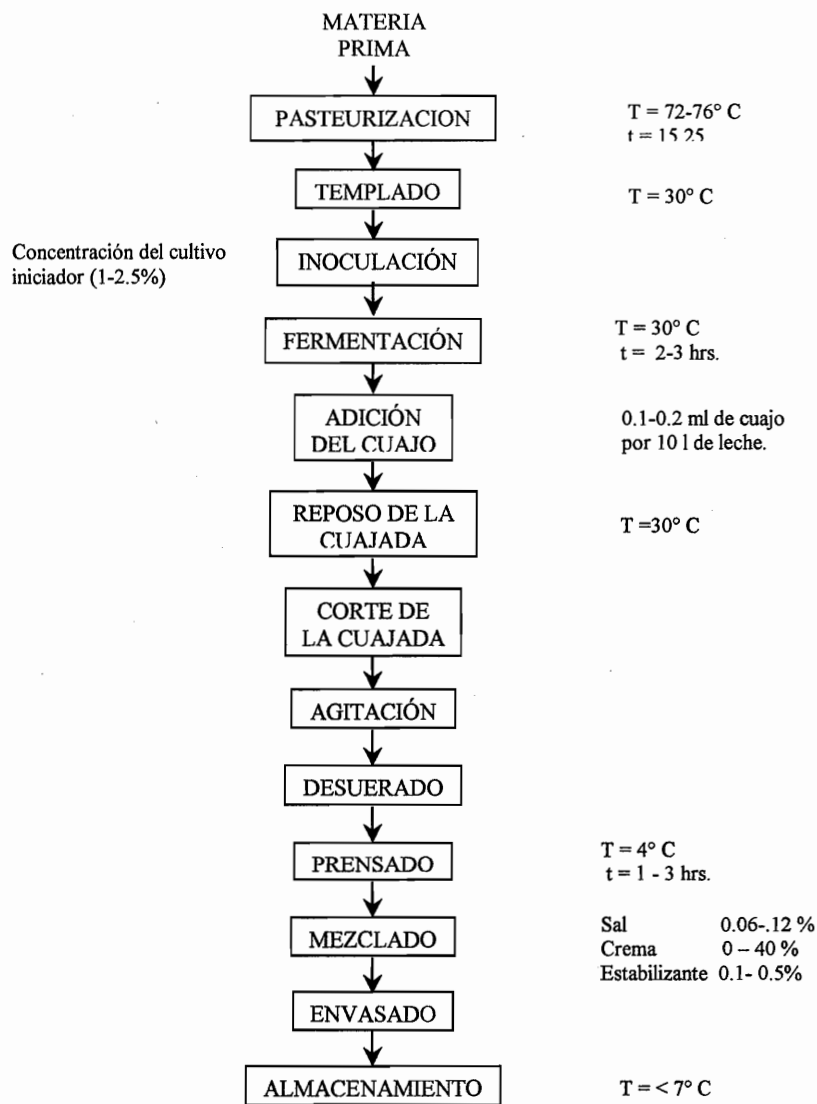
Las características organolépticas típicas de este tipo de queso son: color blanco lechoso, cuerpo y textura blandos, buena aptitud para untar o extender, sin sinéresis, consistencia suave y uniforme y un aroma y sabor ligeramente ácido; en algunas ocasiones a mantequilla por el contenido de grasa (Scott, 2002).

Otras características importantes sobre este tipo de quesos es que presentan un alto contenido de humedad, que suele oscilar alrededor de (50-80%), deben conservarse en refrigeración hasta el momento de su consumo y se pueden hacer con leche descremada o con adición de crema (Madrid, 1994).

Pueden existir diferentes tipos de este queso en base a su contenido graso. Los tipos van desde un 10% para el queso descremado hasta un 60-85% para el queso doble crema. Este tipo de queso se elabora mezclando la crema estandarizada al 30% con la cuajada (Spreer, 1991).

A continuación en la figura 1 se describe el proceso general de elaboración del queso tipo untable siguiendo el diagrama de bloques.

Figura 1: Diagrama general de elaboración del queso tipo untable



Fuente: Adaptado de (Early 2000; Scott, 2002; Spreer, 1991).

1.1.7.- Descripción general del proceso de elaboración del queso tipo untable.

- ⊗ **Materia prima:** El tratamiento previo de la leche es la pasteurización a 72-76° C durante 15-25 segundos que es la que se hace en el sistema tradicional. Este tipo de queso se puede elaborar con leche desnatada, y por lo tanto prácticamente no contiene grasa (Early, 2000).
- ⊗ **Templado:** La leche tratada térmicamente normalmente se enfría a una temperatura de 30° C, dependiendo la temperatura exacta de la receta del queso. Esta temperatura es necesaria tanto para el crecimiento de las bacterias del cultivo iniciador inoculado, como para el subsiguiente proceso de coagulación con cuajo (Scott, 2002).
- ⊗ **Inoculación del cultivo:** Los cultivos pueden estar compuestos por bacterias lácticas mesófilas como *Lactococcus lactis spp. lactis*, *Lactococcus lactis spp. cremoris*, *Lactococcus lactis spp. lactis var. diacetylactis* y *Leuconostoc mesenteroides spp. cremoris*; en una proporción aproximada de 1.0 a 2.5% (Dilanjan, 1984; Early, 2000).
- ⊗ **Fermentación:** La leche se fermenta durante unas horas (2-3 hrs.) para que se desarrollen y produzcan ácido láctico, a una temperatura de 30° C (Dilanjan, 1984; Early, 2000). El ácido láctico es responsable del sabor ácido del queso y tiene su importancia durante la coagulación de la leche (Byong, 2000).
- ⊗ **Adición del cuajo:** Generalmente después de la fermentación de la leche se añade cuajo para facilitar la formación de la cuajada y conseguir una mayor separación del suero (Early, 2000). Se pueden añadir cuajo de 0.1 hasta un máximo de 0.2 ml a 10 litros de leche. Para un normal desarrollo de la coagulación es necesario adicionar calcio en forma de cloruro de calcio; la dosis suficiente es de 1 g de cloruro de calcio puro a 10 litros de leche (Scholg, 1997).
- ⊗ **Reposos de la cuajada:** La precipitación o floculación, depende más de la temperatura (30° C) y solo ocurre en caliente y en presencia de iones de calcio disponible (Scott, 2002).
- ⊗ **Corte de la cuajada:** El corte de la cuajada favorece la expulsión del suero (que contiene la mayoría del agua, los azúcares de la leche y parte de las proteínas) (Byong, 2000). El principal método empleado por los maestros queseros tradicionales para decidir si se pasa al corte de la cuajada se basa en sumergir una varilla o un vástago de termómetro bajo la capa superficial y levantar el coágulo para que se haga una brecha. Una fisura limpia con suero verdoso en la base de la grieta indica que la cuajada está lista para cortar. Una rotura blanda e irregular con suero blanquecino indica que la cuajada está demasiado blanda (Scott, 2002).

- ⊕ Agitación: La agitación suave de la cuajada, hasta que sale el primer flujo de suero de las partículas de cuajada, es necesaria para evitar la pérdida de grasa y de finos o polvos de cuajada (Scott, 2002).
- ⊕ Desuerado: El coágulo resultante se separa del lactosuero, con lo que se concentran los sólidos y se obtiene una pasta blanca y extensible.
- ⊕ Prensado: El principal objetivo de prensar el queso, es forzar a las partículas sueltas de cuajada a adoptar una forma lo suficientemente compacta para manipularla y expulsar el suero libre (Scott, 2002).
- ⊕ Mezclado: Este tipo de queso se puede elaborar mezclando crema con 30% de grasa a la cuajada desnatada en una concentración de 0-40%, inmediatamente después de que la cuajada se enfría. Un elevado contenido en crema imparte a estos productos una consistencia cremosa (Early, 2000). Para mejorar las características deseadas se pueden utilizar estabilizantes como pectina, almidón y algarrobo entre 0.1 y el 0.5% (Spreer, 1991). El salado desempeña múltiples funciones ya que controla el crecimiento y la actividad microbiana (Byong, 2000). Los ingredientes se mezclan perfectamente bajo una gran turbulencia hasta obtener una pasta cremosa (Early, 2000).
- ⊕ Envasado: Los quesos frescos se han de envasar inmediatamente después de su elaboración para prevenir que se contamine, utilizando laminas de aluminio, papeles forrados de plástico o envases de cartón (Spreer, 1991).
- ⊕ Almacenamiento: El objetivo del almacenamiento en refrigeración es impedir que los microorganismos típicos del producto se sigan desarrollando y acidifiquen excesivamente el producto. También se realiza para mantener controlados los efectos que puede causar la posible recontaminación con mohos y levaduras (Spreer, 1991).

1.1.8.- Coagulación enzimática

Físicamente el fenómeno se traduce en la floculación de las micelas de caseína que se enlazan para formar un gel compacto aprisionando el líquido de dispersión que constituye el suero. Para realizar esta floculación se recurre en quesería a la acidificación láctica (coagulación ácida) y al cuajo (coagulación enzimática). Ninguno de estos dos modos de floculación se utiliza absolutamente aislado. En realidad todas las cuajadas de quesería se obtienen por acción simultánea del cuajo y del ácido láctico (coagulación mixta) proveniente de la transformación de la lactosa por las bacterias lácticas. No obstante siempre existe el predominio de uno de los dos modos de floculación (Veisseyre, 1988).

Para efectos de este proyecto únicamente se tratara la coagulación enzimática.

La coagulación por vía enzimática consiste en transformar la leche del estado líquido al estado de gel por la acción de enzimas proteolíticas, casi siempre de origen animal. La κ -caseína es hidrolizada en el enlace 105-106 (fenilalanina-metionina), dando origen al péptido soluble (caseinomacropéptido) y la para κ -caseína. Varios sustitutos de quimosina parecen romper este enlace o muy cerca del mismo (Mahaut et al., 2003; Pérez, 1995). Sobre la α_{s1} -caseína se han reportado por lo menos 25 sitios sensibles a la quimosina; esto debido probablemente a las diferentes condiciones de ensayo, tales como pH y concentración de NaCl, ambos afectando a su vez el estado de agregación de la α_{s1} -caseína y por ello la susceptibilidad de los diferentes enlaces a su hidrólisis (Pérez, 1995).

El pH óptimo para la proteólisis de la caseína completa es de 5.8, lo mismo que para la α_{s1} -caseína sola, siendo la hidrólisis de esta última más dependiente que la β -caseína. Los cambios de temperatura no parecen afectar la naturaleza de los productos, para a medida que la temperatura aumenta de 4 a 32° C se degrada más α_{s1} -caseína que β -caseína (Pérez, 1995).

La hidrólisis de la β -caseína es estimulada en quesos con altos contenidos de humedad, mientras que la α_{s1} -caseína no se ve afectada por diferencias en los contenidos de humedad en el queso. Con un aumento en la concentración de caseína de 10-20% la velocidad de hidrólisis de β -caseína disminuye, mientras que la de α_{s1} -caseína permanece inalterada. La hidrólisis de β -caseína también es inhibida a concentraciones de NaCl por debajo de las cuales se inhibe la α_{s1} (Pérez, 1995).

Existen ciertos factores de los que depende el desarrollo de la coagulación de la leche por acción del cuajo (Scott, 2002; Veisseyre, 1988):

- * La dosis del cuajo: La velocidad de coagulación es sensiblemente proporcional a la dosis de cuajo utilizada. Esta regla sólo es válida si el volumen de leche está comprendido entre 2 000 y 15 000 veces el del cuajo comercial al 1/10 000.
- * La temperatura: La velocidad de coagulación es máxima a 40-42° C. Por debajo de 10° C el gel no se forma. Entre 10 y 20° C la gelificación es muy lenta. Entre 20 y 40-42° C se acelera progresivamente y disminuye a partir de 50° C y a 65° C el coágulo no se produce debido a la inactivación térmica de la enzima.
- * El pH de la leche: El cuajo se inactiva en medio alcalino. Por lo tanto no puede provocar la coagulación. Cuando el pH es inferior a 7 se observa una aceleración de la gelificación por dos razones. En primer lugar porque se acerca al pH óptimo de acción de la enzima (5.5). Por otra parte se reducen las cargas eléctricas de las micelas de caseína con lo que disminuye su estabilidad.

- * Contenido de la leche de iones de Ca^{++} : La presencia de iones de Ca^{++} es necesaria para la propia existencia de las micelas de caseína. Pero estas micelas son muy sensibles al Ca^{++} cuando han sido sometidas a la acción del cuajo. Por tanto, las más mínimas modificaciones del contenido de la leche en iones Ca^{++} puede influir sobre la velocidad de coagulación. También se sabe que si una leche se trata con un reactivo que secuestre el calcio no coagula. Igualmente, una leche calentada a temperaturas superiores a 70°C no coagula debido a la insolubilidad de las sales de calcio. Cuando se quiere acelerar la acción del cuajo o corregir la pérdida de cuajo se añade cloruro de calcio que aumenta el contenido en calcio iónico y por lo tanto favorece la coagulación.

1.1.9.- Patógenos más comunes asociados a la leche

La flora bacteriana de la leche pasteurizada destinada a la fabricación de queso está compuesta de microorganismos termodúricos que han sobrevivido a la pasteurización. También puede existir una flora contaminante post-pasteurización entre la que pueden existir micrococcos, coliformes, bacterias ácido lácticas y enterococos. Estos microorganismos proceden de utensilios, del aire, del agua de lavado y del personal (Robinson, 1997).

Si las bacterias lácticas acidifican rápidamente la leche, los microorganismos patógenos no se desarrollan, pero cuando la acidificación es lenta (porque la técnica de fabricación así lo requiere o porque hay inhibición de los cultivos), pueden presentarse problemas de intoxicación alimentaria (Early, 2000).

Debido a la persistencia de algunos de estos microorganismos patógenos en la leche y en productos lácteos, a continuación se mencionan algunas características generales de algunos de ellos.

- * *Escherichia coli* enterotoxigénico "ETEC": Perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. *E. coli* es un bacilo catalasa-positivo, oxidasa-negativo, fermentador, Gram-negativo, no esporógeno, es un organismo mesófilo típico que crece a temperaturas desde $7-50^\circ \text{C}$, con una temperatura óptima de 37°C . Es un habitante casi universal del intestino de las personas y de los animales de sangre caliente (Adams-Moss, 1997). Con base en los síndromes y características de la enfermedad, y también en su efecto en determinados cultivos celulares y en los grupos serológicos se admiten cinco grupos de virulencia de *E. coli*: enteroagregante (EaggEC), enterohemorrágico (EHEC), enteroinvasor (EIEC), enteropatógeno (EPEC) y enterotoxigénico (ETEC). Las cepas ETEC provocan diarrea tanto en los niños como en las personas adultas. Esta cepa se encuentra entre las causas principales de la diarrea de los viajeros. Los síntomas pueden variar desde una ligera diarrea sin fiebre

hasta un síndrome grave parecido al cólera, con heces acuosas sin sangre ni moco, dolores de estómago y vómito. La gastroenteritis por ETEC es causada por la ingestión de 10^6 - 10^{10} células viables por gramo que deben colonizar el intestino delgado y producir enterotoxinas (Jay, 2002).

- ☼ *Listeria monocytogenes*: Es un microorganismo Gram-positivo, anaerobio facultativo, catalasa-positivo, oxidasa-negativo, asporógeno y cuya morfología es desde cocoide a bacilar y posee flagelos peritricos. *L. monocytogenes* crecerá dentro de un amplio intervalo de temperatura, desde 0-42° C, con un crecimiento óptimo entre 30-35° C (Adams-Moss, 1997). Las listerias están distribuidas por todas partes en la naturaleza, y se pueden encontrar en la materia vegetal en descomposición, en las tierras, en las heces de los animales, en las aguas residuales, en el ensilado y en el agua (Jay, 2002, Rogga et al., 2005; Ryser-Elmer, 1999). Los síntomas de la enfermedad que es más probable en mujeres puede ser fiebre, dolor de cabeza y accidentalmente síntomas gastrointestinales, pero puede haber una infección transplacentaria asociada al feto, que puede provocar aborto, nacimientos prematuros o dolores de parto prematuros; hasta los de una meningitis y de una meningoencefalitis (Adams-Moss, 1997). Este patógeno también puede ser transportado por numerosos animales incluyendo el ganado vacuno, ovejas, cabras, puercos y aves (Rogga et al., 2005; Ryser-Elmer, 1999).

- ☼ *Salmonella typhi*: Las salmonelas pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos Gram-negativos, asporógenos que son facultativamente anaerobios, catalasa-positivos, oxidasa-negativos y generalmente son móviles con flagelos peritricos (Adams-Moss, 1997). Las salmonelas crecen activamente en un amplio intervalo de temperaturas ($\leq 54^\circ\text{C}$) y también exhiben propiedades psicrotróficas, según se refleja en la capacidad para crecer en alimentos almacenados a temperaturas comprendidas entre 2 y 4° C (Doyle et al., 2001). La mayoría de las salmonelas son consideradas patógenas para el hombre, aunque difieren en cuanto a las características y gravedad de la enfermedad que causan. Las salmonelas son responsables de varios síndromes clínicos diferentes como enteritis y enfermedad sistémica. La enteritis es una infección gastrointestinal y por su gravedad puede variar desde la vehiculación asintomática a una diarrea grave. En la enfermedad sistémica "Fiebre tifoidea" hay una aparición lenta de síntomas que incluye fiebre, dolor de cabeza, sensibilidad abdominal y constipación. En la segunda fase de la enfermedad, el organismo llega a la vesícula biliar donde se multiplica. El flujo de bilis infectada recontamina el intestino delgado causando su inflamación y ulceración. La fiebre persiste y va acompañada de una diarrea en la que son excretadas grandes cantidades de bacterias. En los casos más graves puede haber hemorragia de las úlceras y una perforación del intestino que causa peritonitis (Adams-Moss, 1997)

1.2. Cultivos Iniciadores

1.2.1.- Importancia del cultivo iniciador

Se conoce con el nombre de iniciadores a los microorganismos adicionados durante la industrialización de algunos alimentos, cuyo objetivo es estandarizar los productos e impartirles características y propiedades específicas, que tengan por resultado mayor aceptabilidad de los mismos (Pérez-Pablo, 1995). Los microorganismos necesarios para fermentar los alimentos se pueden añadir como cultivos puros o como cultivos mixtos (Frazier-Westhoff, 1993; Robinson, 1997) o algunas veces es posible que no se les añada cultivo alguno si se sabe que los microorganismos deseados existen en número suficiente en la materia prima inicial (Frazier-Westhoff, 1993).

Por consiguiente se ha comprobado que en la fermentación de alimentos no es necesaria la adición de cultivos puros o mixtos de microorganismos, aunque en algunas, por ejemplo, en la fermentación de los encurtidos y en la de las aceitunas verdes, es conveniente. Por otra parte los cultivos iniciadores, puros o mixtos, se emplean para elaborar ciertos productos lácteos, como por ejemplo las leches fermentadas, algunos tipo de mantequilla, y la mayoría de los tipo de queso; así como también en las fermentaciones del pan, de las bebidas de malta, de los vinos, de licores destilados, del vinagre y en el tratamiento del cacao y del café (Frazier-Westhoff, 1993).

La función de los cultivos iniciadores es la de fermentar la lactosa, transformándola en ácido láctico. En este grupo se incluyen tanto especies mesófilas, como: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus casei*, y *L. plantarum*; (que presentan un crecimiento óptimo entre 25 y 30° C) como termófilas, tales como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *L. bulgaricus* y *L. helveticus*; (que presentan un crecimiento óptimo entre 37 y 42° C) (Doyle et al., 2001; Early, 2000; Robinson, 1997).

1.2.2.- Clasificación de los microorganismos utilizados como cultivo iniciador

Como se puede ver existe una gran variedad de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos o combinación de los mismos), que se utilizan en los procesos fermentativos de la leche para la producción de queso y otros productos fermentados. Entre todos estos microorganismos un grupo de bacterias, las bacterias ácido lácticas son las más importantes (Robinson, 1997).

El término bacteria ácido láctica se refiere de manera genérica a los microorganismos que utilizan como sustrato hidratos de carbono y producen principalmente ácido láctico como producto final de su metabolismo.

Las bacterias ácido lácticas comprenden los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Aslim et al., 2004; Robinson et al., 2000; Robinson, 1997). A continuación se mencionan las características más relevantes de cada uno de ellos:

- ⊕ El género *Lactococcus* se utiliza ampliamente en la industria láctea. Comprende las siguientes especies: *Lc. lactis*, *subesp. diacetylactis* y *Lc. cremoris*. Algunas cepas de *Lactococcus* son capaces de metabolizar el citrato que contiene la leche produciendo diacetilo, que es uno de los principales compuestos responsables del aroma y generando CO₂ en la misma reacción (Early, 2000). Estas bacterias son homofermentativas, produciendo ácido láctico a partir de la glucosa (Early, 2000; Robinson, 1997).

- ⊕ En el género *Leuconostoc*, sólo *L. cremoris* (denominado anteriormente como *L. citrovorum* y *L. dextransicum*) se han utilizado como cultivos iniciadores. Son heterofermentativos, capaces de producir ácido láctico, CO₂ y sustancias aromáticas (p.e. etanol y ácido acético) a partir de la glucosa (Early, 2000; Robinson, 1997). Dado el escaso poder acidificante se siembran con los *Lactococcus* para potenciar la formación del aroma, p.e. (Especialmente en los quesos frescos y en variedades de maduración muy corta) (Early, 2000).

- ⊕ En el género de *Lactobacillus* se tiene interés por dos especies que son las de *Lb. helveticus* y *Lb. delbrueckii*, antes *Lb. bulgaricus* y *Lb. lactis* las cuales actualmente se consideran subespecies de *Lb. delbrueckii*. Estas bacterias lácticas termófilas son más acidotolerantes que las mesófilas y hacen descender el pH hasta valores muchas veces inferiores a 4. Otra característica muy importante es su capacidad para metabolizar la galactosa, mientras que otras excretan la galactosa al medio. La acumulación de galactosa en el medio puede causar problemas en determinados productos, p.e. Este azúcar puede ser utilizado como fuente de energía por bacterias lácticas que no forman parte de los cultivos iniciadores produciéndose aromas extraños y por otro lado la presencia de galactosa origina pardeamientos (reacción de Maillard) durante el horneado (Early, 2000).

1.2.3.- Tecnología de los cultivos iniciadores

En la industria los cultivos iniciadores son una parte muy importante en los procesos de industrialización, por ello es de vital importancia su conservación además de que deben contar con el mayor número posible de células viables, de tal forma que los cultivos puedan modificar el medio

e impartir con ello las características deseadas en los productos donde son inoculados; y deben estar exentos de contaminantes (Robinson, 1997; Pérez, 1995).

Los cultivos se presentan en distintas formas dependiendo de su utilización en la industria.

Cultivos Iniciadores Líquidos

En estado líquido es la forma más popular utilizada para la manipulación de los cultivos en las industrias. Los cultivos iniciadores se conservan habitualmente en pequeñas cantidades y es necesario tener un volumen apropiado para la fabricación de cualquier producto; para ello se requiere primero propagarlo de acuerdo con el siguiente esquema (Mahaut et al., 2003; Madrid, 1994; Robinson, 1997):

Cultivo stock → Cultivo madre → Cultivo intermedio → Cultivo para la producción

El cultivo <<stock>> inicial se mantiene en leche reconstituida a partir de leche desnatada en polvo (10-12% de sólidos no grasos) libre de antibióticos que ha sido previamente esterilizada en autoclave (1 kg/cm² durante 15 minutos). Los subcultivos se preparan semanal o diariamente (Robinson, 1997).

La actividad de los cultivos iniciadores depende de una serie de factores, tales como la velocidad de enfriamiento después de la incubación, la acidez final alcanzada y la temperatura y duración del tiempo de almacenamiento. La refrigeración es importante para el control de la actividad metabólica del cultivo iniciador (Robinson, 1997).

Cultivos Iniciadores Congelados

Los cultivos iniciadores líquidos (<<madre o intermedio>>) pueden conservarse mediante congelación entre -20 y -40° C durante algunos meses. La congelación y el almacenamiento prolongado en este estado pueden dañar a ciertos *Lactobacillus* pero el uso de un medio compuesto por un 10% de leche descremada, 5% de sacarosa, crema fresca, 0.9% de cloruro de sodio o 1% de gelatina permite una mayor viabilidad celular. Además se ha utilizado biomasa (10¹⁰-10¹² u.f.c./ml) congelada a -30° C en presencia de ciertos agentes criogénicos (citrato de sodio, glicerol o B-glicerofosfato de sodio) como forma de conservar cultivos mesófilos, *Lactobacillus* o bacterias ácido propiónicas (Robinson, 1997).

Aunque se ha demostrado que la congelación a -40° C es un procedimiento útil para la conservación de los cultivos iniciadores, la ultracongelación a -196° C en nitrógeno líquido es un mejor método. La

congelación de los cultivos en nitrógeno líquido ha hecho posible la inoculación directa de la leche destinada a la fabricación de queso y yogur o a la obtención del cultivo final (Robinson, 1997).

Cultivos Iniciadores Liofilizados

Un método alternativo de conservar los cultivos iniciadores es la liofilización. El desarrollo de tal proceso persigue evitar el trabajo que implica el mantenimiento de los cultivos <<stock>> en estado líquido. Los cultivos liofilizados se preparan deshidratando el cultivo iniciador una vez congelado. Este método de conservación de cultivos iniciadores proporciona una mayor viabilidad de los microorganismos componentes del cultivo (Mahaut et al., 2003; Robinson, 1997).

Se ha observado que tanto el proceso de congelación como el de deshidratación puede producir daños en la membrana celular de las bacterias pero este efecto se minimiza mediante la adición de ciertos agentes criogénicos antes de la congelación y deshidratación (Robinson, 1997). Así como también la edad del cultivo afecta la resistencia a la liofilización, siendo los más resistentes los cultivos en fase estacionaria máxima. También una mayor concentración celular favorece la resistencia a la liofilización (Pérez, 1995).

La liofilización se ha utilizado en la conservación de los microorganismos de interés lactológico, alcanzando buenos resultados, tanto en mantener la viabilidad como la actividad de los cultivos (Pérez, 1995).

Los cultivos iniciadores conservados por liofilización tienden a tener una fase de potencia larga y se utilizan como inóculos para la preparación del cultivo <<madre>>. Se necesitan mayores cantidades cuando se utilizan para la inoculación directa; asimismo, la incubación puede requerir un tiempo mayor que el habitual (Robinson, 1997).

1.2.4.- Cultivos iniciadores de los quesos

La elaboración de un queso depende de la fermentación de la lactosa por las bacterias ácido lácticas para producir ácido láctico principalmente. El ácido láctico imparte el característico sabor ácido a la cuajada, ayuda a la formación del coágulo; y al favorecer la contracción de la cuajada y expulsión del suero, contribuye a que el queso adquiera la textura típica. El bajo pH de la cuajada (5.0-5.2) colabora en la inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas responsables de alteraciones. Las bacterias ácido lácticas elaboran también, en pequeñas cantidades sustancias aromáticas y de actividad proteolíticas y lipolíticas (Robinson, 1997).

Es indispensable disponer de un cultivo iniciador satisfactorio, capaz de producir la suficiente cantidad de ácido a la velocidad deseada en cada variedad de queso. De esta forma se evitarán sabores y aromas anómalos y la cuajada adquirirá las características adecuadas para que se desarrolle el sabor típico de cada queso. Los cultivos iniciadores se multiplican durante la fabricación del queso pasando de alrededor de 10^7 UFC/ml en la leche a 10^8 - 10^9 UFC/g en la cuajada (Robinson, 1997).

En la tabla 2 se presentan algunos ejemplos de los cultivos iniciadores empleados en la elaboración de diferentes productos:

Tabla 2: Bacterias lácticas utilizadas como cultivos iniciadores:

Tipo de fermento	Nombre antiguo	Nombre actual	Productos
Mesófilo (Temperatura óptima 20-30° C)			
O	<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus cremoris</i> spp.	quesos frescos, Cheddar.
	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	mimolette, Feta.
L ó B	<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i>	pastas blandas.
	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	pastas prensadas.
D	<i>Leuconostoc citrovorum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> spp. <i>cremoris</i>	mantequilla
	<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i>	mantequilla
	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	
	<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i>	pastas blandas
LD ó BD	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	mantequilla
Termófilos (Temperatura óptima 37-45° C)			
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> spp. <i>thermophilus</i>	yogur
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	mozzarella
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	emmental
	<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>	comté

O: homofermentativos acidificantes estrictos

B ó L: cultivos acidificantes con *Leuconostoc*

D: cultivos acidificantes con *diacetylactis* (cit +)

Fuente: Adaptado de (Mahaut et al., 2003; Robinson, 1997).

En la leche pueden existir antibióticos procedentes de vacas tratadas de mastitis. Estas sustancias, como la penicilina, eureomicina, etc., inhiben el crecimiento de todas las cepas que habitualmente forman parte de los cultivos iniciadores. Las aglutininas y peroxidases que pueden estar

presentes de una forma natural en algunas leches inhiben a muchas cepas de las bacterias componentes del cultivo. Tales cepas crecen mejor en leche pasteurizada dado que estas sustancias se desactivan durante el tratamiento térmico (Robinson, 1997).

1.2.5.- Sistemas biológicos de conservación

Un creciente número de consumidores prefieren alimentos poco procesados y preparados sin conservadores químicos (Devlieghere et al., 2003).

Una de las consecuencias de esta tendencia de los consumidores es el aumento de confianza en la refrigeración para garantizar la seguridad de los alimentos mínimamente procesados y sin conservadores. Sin embargo existen dos factores que hacen que no sea prudente confiar demasiado en la refrigeración. El primero es que el 20% de los refrigeradores comerciales y domésticos mantienen temperaturas $>10^{\circ}$ C. El segundo factor es la capacidad de *Listeria monocytogenes* y otros patógenos para crecer a temperaturas próximas a las de congelación (Doyle et al., 2001).

Es por ello que se ha implantado la incorporación de barreras adicionales frente al crecimiento microbiano (Doyle et al., 2001). Una de estas barreras es el uso de bacterias lácticas. Su uso en la conservación de los alimentos es aceptada por los consumidores como natural (Devlieghere et al., 2003; Lash et al., 2004).

Los cultivos de bacterias lácticas que producen bacteriocinas se añaden a alimentos sin fermentar o se utilizan como cultivos iniciadores en los alimentos fermentados para mejorar su seguridad y calidad (Doyle- et al., 2001; Ryser-Elmer, 1999).

Según Aymerich-Hugas en 1998 consideraron que si por bioconservación se entiende la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad sanitaria de los alimentos mediante la microflora natural o sus metabolitos, entonces las bacterias lácticas son los candidatos ideales para su selección como cultivos bioprotectores; y de esta manera se llegó a definir el termino de bioconservación.

La **bioconservación** se define como el uso de bacterias lácticas, sus productos metabólicos o ambos con el fin de mejorar la seguridad y calidad de los alimentos (Devlieghere et al., 2003, Doyle et al., 2001).

En la tabla 3 se incluyen algunos ejemplos de las bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* identificadas a la fecha.

Tabla 3: Microorganismos que pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. breve</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>L. casei</i> spp. <i>rhamnosus</i> (GG)	<i>B. infantis</i>
<i>L. johnsonii</i> LJ1	<i>B. longum</i>
<i>L. fermentum</i>	
<i>L. reuteri</i>	
<i>L. delbrueckii</i> sbp. <i>bulgaricus</i>	

Fuente: Cuadernos de nutrición, 2004

1.2.6.- Bacteriocinas

Como resultado de la utilización de bacterias ácido lácticas en los alimentos se producen metabolitos secundarios como las bacteriocinas (Byong, 2000).

El término bacteriocinas inicialmente se utilizó para sustancias producidas por bacterias Gram negativas como las colicinas producidas por *Escherichia coli* (Bourgeois-Larparent, 1995; Mossel et al., 1995; Robinson et al., 2000).

Las bacteriocinas son producidas por microorganismos y son bactericidas contra otros microorganismos a bajas concentraciones. Estructuralmente son péptidos o proteínas de bajo peso molecular y su producción casi siempre está codificada en plásmidos¹ o en transposones². Las bacteriocinas actúan integrándose en la membrana de cepas de bacterias desestabilizando las funciones de la membrana, causando la muerte de la célula y su lisis (Atlas-Bartha, 2001).

Se denominan bacteriocinas a las moléculas que responden a los cinco criterios siguientes, tratándose principalmente de *Lactobacillus* y *Lactococcus* (Bourgeois-Larparent, 1995):

- ⊕ Tienen un amplio espectro de acción.
- ⊕ Poseen una parte proteica necesaria para su actividad.
- ⊕ Son bactericidas.
- ⊕ Para actuar la bacteriocina se fija sobre un receptor específico localizado sobre la célula diana.
- ⊕ La célula productora sintetiza igualmente una molécula que la inmuniza contra su propia bacteriocina; el soporte genético de las dos moléculas, bacteriocinas y moléculas de inmunidad es un plásmido.

¹ Son moléculas de DNA que de forma natural aparecen en algunas bacterias. Transportan genes para la inactivación de antibióticos, producción de toxinas y degradación de productos naturales (Stryer, 2001).

² Son secuencias de DNA de gran movilidad y trasladan genes a otros lugares del genoma bacteriano (Stryer, 2001).

1.2.6.1.- Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas se pueden clasificar de la siguiente manera (Cleveland et al., 2001, Naidu, 2000):

Clase I: Lantibióticos. Son péptidos pequeños (<5 kDa) que contienen algunos aminoácidos poco comunes como la lantionina y b-metil-lantionina. Ej. nisina.

Tipo A: Son péptidos formadores de poros, catiónicos y elongados que en algunos casos constan de dos componentes, (lactacina).

Tipo B: Son péptidos globulares inmunológicamente activos que actúan como inhibidores enzimáticos.

Clase II: No lantibióticos. Son péptidos pequeños (<10 kDa), estables al calor; y se pueden subdividir como:

Clase IIa: Bacteriocina de un péptido con una doble glicina (Tir-Gli-Asn-Gli-Val) y dos cisteínas formando un enlace disulfuro S-S en la N-terminal a la mitad del péptido. Son péptidos activos contra *Listeria*. Ej. pediocina PA-1, sakacina A y P, leucocina A.

Clase IIb: Son bacteriocinas que requieren combinarse con dos cadenas de polipéptidos para mejorar su actividad antimicrobiana. Ej. lactococina G y F, lactacina F, plantaracina EF y JK.

Clase IIc: Péptidos no modificados que se transportan mediante péptidos líder. Ej. divergicina A.

Clase III: Son péptidos grandes (>30 kDa), lábiles al calor, sin aminoácidos modificados en su estructura primaria. Ej. helveticina Jy V-1829, lactacina A y B.

Clase IV: Son bacteriocinas de péptidos largos compuestas con otras macromoléculas (carbohidratos o lípidos), (aun no aceptada completamente).

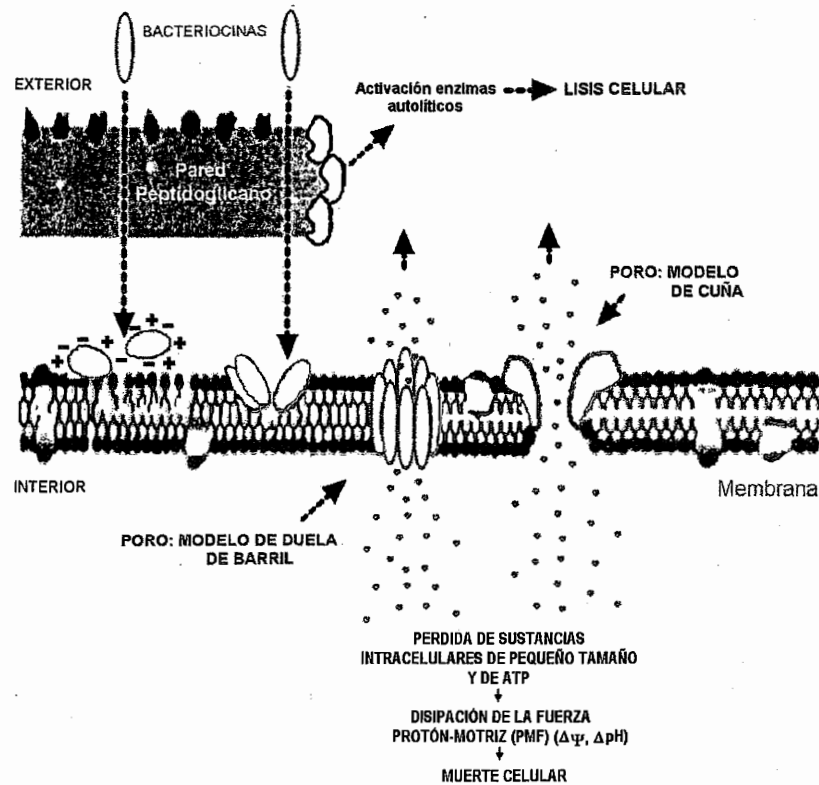
1.2.6.2.- Mecanismo de acción de las bacteriocinas

Actualmente existen dos grandes modelos que explican el mecanismo por el que las bacteriocinas generan poros en las membranas plasmáticas. El modelo de cuña, aplicable a la nisina y otros lantibióticos y el modelo de duela de barril, aplicable a diversas bacteriocinas de la clase II. En cualquier caso la formación del complejo de poración en las membranas provoca la disipación de la fuerza protón-motriz (PMF) y en última instancia la muerte celular (figura 2) (Martínez et al., 2000; Robinson et al., 2000; Ryser-Elmer, 1999).

La PMF es un gradiente electroquímico necesario para que se efectúen gran parte de los procesos metabólicos dependientes de energía que tienen lugar en las células; consta de dos componentes: un potencial de

membrana ($\Delta\Psi$) y un gradiente de pH (ΔpH). En general, el colapso de la PMF conduce a una reducción significativa del contenido de ATP intracelular, inhabilita el transporte activo de nutrientes e impide el mantenimiento de concentraciones adecuadas de ciertos iones, como los K^+ y Mg^{2+} . Una vez que las moléculas de bacteriocina han formado un complejo de poración, la muerte de las células sensibles puede ir acompañada o no de un proceso de lisis celular; además la muerte celular puede activar sistemas autolíticos que a su vez, serían responsables de la lisis de algunas cepas (Doyle et al., 2001, Martínez et al., 2000).

Figura 2: Mecanismo general de acción de las bacteriocinas de las bacterias lácticas en las células Gram-positivas sensibles.



Fuente: Martínez et al., 2000.

En estudios realizados en laboratorio se han aislado bacterias lácticas: *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Lactococcus* que producen bacteriocinas activas contra *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *C. tyrobutiricum* y *Listeria*. Los agentes activos poseen una parte proteica necesaria para su actividad; se producen durante la fase exponencial de crecimiento; su

modo de acción es bactericida y son activas entre pH 4 y 8 (Bourgeois-Larpen, 1995). También se han aislado bacterias que producen agentes activos contra *C. sporogenes*, *Brochetrix thermosphacta*, *Bacillus cereus* y *Streptococcus faecalis* (Bourgeois-Larpen, 1995).

De las bacterias ácido lácticas se han aislado una gran variedad de bacteriocinas las cuales se han clasificado en tres grupos (ver Tabla 4).

Tabla 4: Tipos de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas

Cepa	Bacteriocina	Masa molecular (kDa)
Bacteriocinas estables al calor		
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> LMG2130	Lactococcina A	5.8
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> 9B4	Lactococcina B	
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	Lactococcina M	
<i>Lb. acidophilus</i> 11088	Lactacina F	6.3
<i>Leu. gelidium</i> UAL187	Leucocina A	3.9
<i>Ped. acidilactici</i> PAC1.0	Pediocina PA-1	4.6
Bacteriocinas labiles al calor		
<i>Lb. helveticus</i> 481	Helveticina J	37
<i>Lb. delbrukii</i> JCM1106	Lacticina A	
<i>Lb. delbrukii</i> JCM 1248	Lacticina B	
<i>Lb. acidophilus</i> LAPT1060	Acidophilina A	
<i>Lb. casei</i> B80	Caseicina 80	42
Lantibióticos		
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> ATCC114	Nisina A	33.5
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> NIZ022186	Nisina Z	
<i>Lb. sake</i> L45	Lactosina S	3.8
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i> CNRZ481	Lacticina 481	2.9
<i>Carnobacterium ssp.</i> U149	Carnocina U149	4.6
<i>Lb. plantarum</i> LPC010	Plantaricina S	
<i>Ent. faecium</i> T136	Enterocina A	4.8
	Enterocina B	

Fuente: Naidu, 2000.

Los efectos inhibidores de las bacteriocinas dependen de la naturaleza del fermento inhibidor, de la naturaleza de las cepas contaminantes a inhibir, proporciones relativas de las bacterias presentes y las condiciones de cultivo. El fenómeno de inhibición puede incluir uno o muchos mecanismos: competencia nutricional, cambios fisicoquímicos del medio (pH, formación de agentes reductores) y formación de productos antimicrobianos (ácidos orgánicos <<láctico o acético>>, peróxido de hidrógeno, enzimas antimicrobianas, bacteriocinas) (Devlieghere-Vermeiren-Debere, 2003).

Existen numerosas bacteriocinas producidas por bacteria ácido lácticas y cada una tiene espectros de inhibición particulares. Las propiedades bactericidas de estas sustancias son activas contra especies estrechamente relacionadas con la cepa productora así como también contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa (Naidu, 2000). Según estudios *in vitro* se ha demostrado que algunas bacteriocinas tienen un amplio espectro de inhibición sobre bacterias Gram positivas y Gram Negativas; como se resume en la tabla 5 (Lash et al., 2000).

Tabla 5: Espectro de inhibición de bacteriocinas contra microorganismos no lácticos.

Bacterias susceptibles	Bacteriocina
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Sakacina A
<i>Bacillus cereus</i>	Lactocina S, Lactostrepcina 5, Pediocina A, Pediocina Ach, Sakacina A
<i>Bacillus coagulans</i>	Nisina
<i>Bacillus licheniformis</i>	Nisina
<i>Bacillus pumilis</i>	Thermofilina
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Nisina
<i>Bacillus subtilis</i>	Lacticina 481, Nisina, Thermofilina
<i>Bronchothrix thermospacta</i>	Curvacina A, Pediocina Ach, Sakacina A, Sakacina P
<i>Clostridium bifermentans</i>	Nisina
<i>Clostridium botulinum</i>	Nisina, Pediocina A, Reuterina, Sakacina A
<i>Clostridium butyricum</i>	Nisina, Reuterina
<i>Clostridium perfringens</i>	Nisina, Pediocina A, Pediocina Ach, Pediocina VTT, Reuterina, Thermofilina
<i>Clostridium sporogenes</i>	Nisina, Pediocina A
<i>Clostridium tyrobutricum</i>	Lacticina 481, Lactocina S, Pediocina Ach
<i>Escherichia coli</i>	Reuterina, Thermofilina
<i>Listeria innocua</i>	Lacticina 481, Lactocina S, Pediocina A, Pediocina Ach
<i>Listeria ivanovii</i>	Pediocina A, Pediocina Ach, Pediocina PAC10
<i>Listeria monocytogenes</i>	Carnobacteriocina A&B, Curvacina A, Enterocina 1146, Leucocina, Nisina, Pediocina A, Pediocina Ach, Pediocina JD, Pediocina PA-1, Pediocina PAC10, Pediocina VTT, Piscicolina 61, Lactacina B, Reuterina, Sakacina A, Sakacina P
<i>Listeria seeligeri</i>	Pediocina A
<i>Listeria welchii</i>	Lacticina 481, Pediocina A
<i>Proteus mirabilis</i>	Nisina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Thermofilina
<i>Pseudomona fluorescens</i>	Thermofilina
<i>Salmonella enteritidis</i>	Reuterina, Thermofilina
<i>Salmonella infantis</i>	Pediocina VTT, Reuterina
<i>Salmonella typhimurium</i>	Reuterina, Thermofilina
<i>Shigella sp.</i>	Reuterina, Thermofilina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nisina, Lacticina 481, Pediocina A, Pediocina Ach, Sakacina A, Thermofilina, Plantari SIK83
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Curvacina, Lacticina 481, Lactocina S, Pediocina Ach
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Nisina
<i>Staphylococcus simulans</i>	Nisina
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Nisina
<i>Yersinia enterocolotica</i>	Thermofilina

Fuente: Naidu, 2000.

1.2.6.3.- Principales bacteriocinas estudiadas y utilizadas en la elaboración de alimentos

A continuación se describen las características generales de las bacteriocinas más utilizadas y estudiadas en la elaboración de alimento.

Nisina

La nisina descubierta en 1944, es producida por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* principalmente (Devlieghere et al., 2003, Lash et al., 2004). Contiene una molécula de lantionina, un aminoácido que contiene un grupo de tioéter raramente encontrado en el metabolismo bacteriano. Otros aminoácidos β -insaturados no muy comunes entran en la composición de la nisina, la dehidroalanina y la dehidrobutirina (Cleveland et al., 2001, Bourgeois-Larparent, 1995).

La nisina es resistente a las enzimas proteolíticas excepto a la α -quimotripsina. Su estructura en anillos le confiere termorresistencia. Es inestable en medio básico. En un tampón a pH 10, la nisina es inactivada al 80% (Bourgeois-Larparent, 1995). La temperatura es el determinante principal de la acción inhibitoria de la nisina. Esta bacteriocina es mucho menos efectiva a temperaturas elevadas que a temperaturas de refrigeración frente a esporas de *C. botulinum*. La nisina también inhibe las células vegetativas de listeria y estafilococos a temperaturas de refrigeración (Doyle et al., 2001; Ryser-Elmer, 1999).

La concentración mínima inhibitoria de la nisina es inferior a 128 U.I./ml para las células vegetativas de *Bacillus*, *Clostridium*, algunas cepas de *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Pneumococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* de los grupos A, B, N, *Mycobacterium tuberculosis* es también sensible a concentraciones que según las cepas varían de 100 a 500 U.I./ml (Bourgeois-Larparent, 1995).

La nisina se puede utilizar como un agente de conservación en la industria alimentaria y su uso como aditivo ha sido aceptado por la FAO. Se utiliza para la conservación de quesos fundidos, de pasta cocida y prensada y de leches esterilizadas. Las condiciones de aplicación de la nisina están ligadas a sus propiedades y a su espectro de acción. El pH debe ser inferior a 7; y su efecto bactericida concierne a las bacterias Gram positivas, especialmente los *Bacillus* y *Clostridium* (Bourgeois-Larparent, 1995).

La nisina se utiliza en la elaboración de quesos fundidos, ya que ha resultado ser muy eficaz en la prevención de la formación de la toxina de *Clostridium botulinum* con una humedad superior al 55%. Así también ha resultado ser una muy buena alternativa como sustituta de los nitritos en los productos cárnicos (Bourgeois-Larparent, 1995).

Las razones por las que se permite el uso de la nisina como aditivo alimentario son las siguientes (Bourgeois-Larpen, 1995):

- * Es producida por un organismo normalmente utilizado en las fermentaciones alimentarias.
- * La nisina residual en los alimentos es digerida, ya que es sensible a la α -quimitripsina.
- * Los análisis efectuados han demostrado la ausencia de toxicidad.
- * Los estudios sobre la posible adquisición de resistencia a la nisina por parte de algunos microorganismos son escasos.

Espectro antimicrobiano

La nisina es efectiva contra bacterias Gram Positivas, incluyendo aquellas formas resistentes al calor. Los niveles que se requieren para inhibir esporas generalmente son menores que los que se requieren para inhibir células vegetativas. Las bacterias Gram Negativas son resistentes a la nisina por que su membrana exterior es impermeable a la nisina, sin embargo si las bacterias Gram Negativas son expuestas a un tratamiento alterno se puede dañar la membrana externa; y de esta forma la nisina puede tener acceso a la membrana citoplasmática y causar la inhibición. Algunos tratamientos que pueden dar sensibilidad a las bacterias Gram-negativas son: presión hidrostática, calentamiento, congelamiento y calentamiento, ácido láctico y EDTA. Las levaduras son resistentes a la nisina exactamente por la misma razón que las bacterias Gram Negativas. De cualquier forma la insensibilidad de las levaduras a la nisina permite el uso de ésta en productos fermentados con levaduras (Naidu, 2000).

Pediocina

El término Pediocina es usado actualmente para los péptidos antibacterianos o bacteriocinas producidas por algunas cepas del género *Pediococcus*. El género *Pediococcus* está incluido en el grupo de las bacterias ácido lácticas (Naidu, 2000). Dos especies de este género, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici* se han reportado como productoras de Pediocina (Devlieghere et al., 2003, Naidu, 2000). Los *Pediococcus* son bacterias Gram Positiva, inmóviles, anaerobias facultativas y homofermentativas (Naidu, 2000).

Espectro antimicrobiano

Comparado a otras bacteriocinas y algunos lantibióticos la familia de pediocinas; pediocina A de *Ped. pentosaceus* FBB61 y pediocinas de cepas de *Ped. acidilactici* tienen un amplio espectro bactericida contra bacterias Gram Positiva. Por otro lado también se tienen antecedentes que

la pediocina A inhibe el crecimiento de varias cepas de *Ped. pentosaceus*, *Ped. acidilactici*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus spp.*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium sporogenes* (Naidu, 2000). Además también inhibe el crecimiento de 6 a 8 cepas de *Lis. monocytogenes* (Naidu, 2000; Ryser-Elmer, 1999).

También se ha observado que fracciones precipitadas con sulfato de amonio de pediocina PA-1/AcH, forma zonas de inhibición en el crecimiento de *Bac. cereus*, *Clo. perfringens*, *Sta. aureus* y algunas cepas de *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. En un estudio posterior usando una preparación purificada de pediocina PA-1/AcH fue capaz de inhibir el crecimiento de algunas cepas de *Lis. monocytogenes*, *Bac. cereus*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, *C. laramie* y algunas especies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Lactococcus*. Aunque esporas bacterianas no son sensibles a la pediocina Pa-1/AcH y otras bacteriocinas no se observó crecimiento al inocular esporas de *Clostridium laramie*, *C. perfringens* y *C. botulinum* en un caldo propio conteniendo pediocina. Un estudio posterior mostró que la pediocina produce un efecto bactericida sobre el germinado y crecimiento de esporas (Naidu, 2000).

Aunque son inactivas frente a las esporas, las pediocinas inhiben las células vegetativas de *L. monocytogenes*. Las pediocinas son más efectivas que la nisina en carne y más efectivas todavía en productos lácteos (Doyle et al., 2001; Ryser-Elmer, 1999).

Reuterina

Los lactobacilos producen un gran número de componentes antimicrobianos de cadena corta, ácidos orgánicos, principalmente láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, dióxido de carbono, bacteriocinas y reuterina. La reuterina, β -hidroxipropionaldehído tiene un amplio espectro antimicrobiano contra células procariontas y eucariotas. La reuterina es un producto intermedio del metabolismo anaerobio del glicerol por *Lactobacillus reuteri*. La reuterina es resistente al calor, a enzimas proteolíticas y lipolíticas, es estable en un amplio rango de pH y tiene una alta solubilidad en agua y grasa. *L. reuteri* no es un habitante natural del tracto gastrointestinal de humanos y animales. De igual modo *L. reuteri* y la reuterina son ideales para usarse como bioconservadores en alimentos y en otras aplicaciones (Naidu, 2000).

Espectro antimicrobiano

La reuterina tiene un amplio espectro antimicrobiano, siendo activo contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras, fungi y protozoarios (Naidu 2000).

Sakacina

La sakacina es una bacteriocina producida por algunas cepas de *Lactobacillus sakei* (Devlieghere et al., 2003). Esta bacteriocina consiste en péptidos pequeños. Ellos son hidrofóbicos y tienen un alto contenido de pequeños aminoácidos (principalmente glicina). La sakacina A fue la primera bacteriocina descrita y producida por *L. sakei* LB706, una bacteria aislada de carne cruda. La sakacina tiene una fuerte actividad contra la *Listeria*.

Tabla 6: Criterios para el uso de cultivos iniciadores productores de sakacina como protección en productos cármicos.

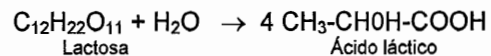
Su adaptación al medio (carne)	<ul style="list-style-type: none">♦ Crecimiento en la carne♦ Competitividad♦ Naturaleza psicrotrofa (carne fría)
Su funcionalidad en el medio	<ul style="list-style-type: none">♦ Tolerancia a la sal♦ Producción de sakacina♦ Eficacia de la sakacina♦ Estabilidad de la sakacina♦ Difusión de la sakacina♦ Espectro de actividad
No provoca efectos negativos	<ul style="list-style-type: none">♦ No hay producción de gas o limo♦ No produce decoloración♦ No hay producción de toxinas o aminas biogenas♦ Homofermentativo♦ Limitación en la acidificación y en la actividad proteolítica.

Fuente: Naidu, 2000.

1.2.7.- Bioquímica de la formación de ácido láctico

La lactosa es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa, es el único azúcar que se encuentra presente en la leche en forma libre (Doyle et al., 2001).

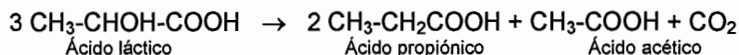
La hidrólisis enzimática es posible por algunas levaduras y numerosas bacterias, que transforman la lactosa en ácido láctico principalmente (Veisseyre, 1988).



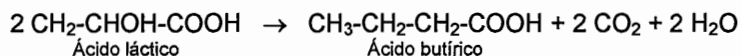
Esta reacción se acompaña por lo general de la producción de sustancias secundarias, según los microorganismos responsables de la

degradación y las condiciones en las que actúan. Algunas de estas sustancias desempeñan un papel importante en la formación del aroma de los productos lácteos: *acetilmetilcarbinol* y *diacetilo* (Veisseyre, 1988).

El ácido láctico puede ser transformado también en ácido propiónico y gas carbónico. Esta es una fermentación que se produce en el afinado de los quesos de pasta cocida (Gruyere, Emmental). La fermentación propiónica es la causa de la formación de los "ojos" en la pasta (Veisseyre, 1988).



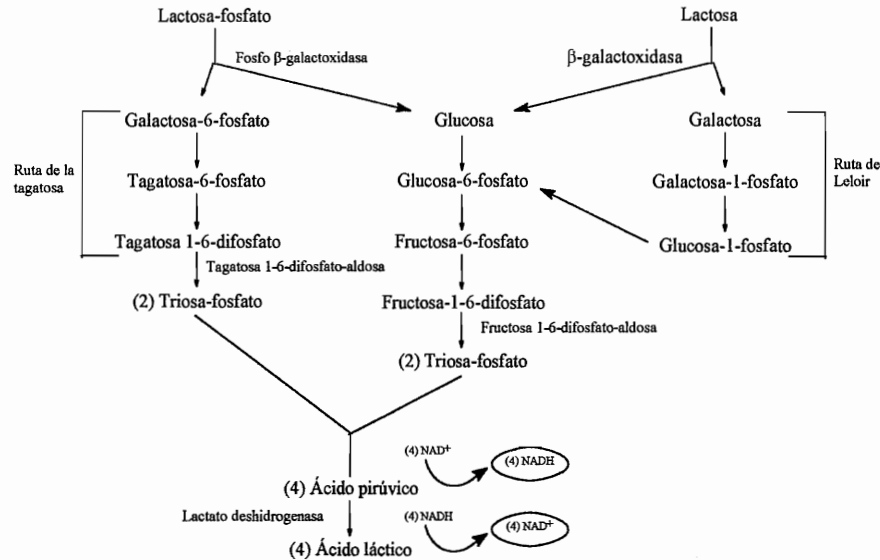
El ácido láctico también puede dar origen al ácido butírico cuando actúan sobre el microorganismos anaerobios del género *Clostridium*. Este ácido de olor nauseabundo pone en peligro las características organolépticas de los productos. Además el desprendimiento de hidrógeno, que acompaña su formación provoca la hinchazón de los quesos (Veisseyre, 1988).



Los lactococos introducen la lactosa en el interior de la célula mediante el sistema de la fosfotransferasa del fosfoenolpiruvato. La lactosa es fosforilada durante la translocación y posteriormente escindida mediante una foso-β-galactosidasa a glucosa y galactosa-6-fosfato (figura 3). El resto de glucosa entra en la vía glucolítica y la galactosa-6-fosfato es transformada a tagatosa-6-fosfato mediante la ruta de la tagatosa. Ambos azúcares son transformados por aldolasas específicas a triosas fosfato, que se transforman a piruvato a expensas de NAD⁺. Para continuar la producción de energía debe de regenerarse el NAD⁺. Normalmente ésto se consigue mediante la reducción del ácido pirúvico a ácido láctico (Doyle et al., 2001).

Lactococcus thermophilus y algunos *Lactobacillus* termófilus transportan la lactosa mediante un sistema antiporte lactosa-galactosa conducido por un gradiente electroquímico de protones. La lactosa no es fosforilada pero es escindida por una β-galactosidasa para dar glucosa y galactosa. El resto de glucosa entra a la ruta glucolítica, pero la galactosa es secretada al exterior de la célula y se acumula en el queso o en la leche. Los lactobacilos termófilos que no excretan la galactosa y las cepas de *L. helveticus* capaces de transportar la galactosa secretada, utilizan la ruta de Leloir para metabolizar la galactosa (Doyle et al., 2001).

Figura 3: Metabolismo de la lactosa en las bacterias ácido lácticas homofermentativas.



Fuente: Doyle et al., 2001.

1.2.8.- Producción de compuestos aromáticos

Aunque al ácido láctico es el metabolito final más importante del metabolismo de la lactosa en los productos lácteos fermentados es el responsable del sabor ácido; existen otros compuestos volátiles que contribuyen a la producción de aroma.

El aroma fundamental de las leches fermentadas es producido por compuestos volátiles como el ácido acético el acetaldehído y el diacetilo. Por ejemplo en el yogur, estos compuestos volátiles son formados por las bacterias ácido lácticas del cultivo iniciador (*Lactococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus*) (Doyle et al., 2001).

En el caso de la elaboración de los quesos madurados se efectúa un gran número de reacciones que conducen a la síntesis de los compuestos volátiles deseables, antes de someterla al proceso de maduración, la cuajada tiene un escaso aroma y un sabor ácido típico de los ácidos láctico y acético. Una vez terminada la maduración (que en ciertos casos puede durar más de dos años), el queso presenta una gama muy amplia de sustancias volátiles, que en número llega a superar las 200. Todas estas transformaciones las efectúan los microorganismos propios de la leche, los añadidos como inóculo, y las enzimas (propias y las que se añaden para acelerar la maduración) (Baduí, 1999).

1.2.8.1.- Producción de diacetilo

En cuanto a metabolitos producidos por los microorganismos iniciadores, el diacetilo ocupa un lugar preponderante (Pérez, 1995; Robinson et al., 2000). Este metabolito es el principal componente del aroma, que se produce por la degradación del citrato en la leche. En el metabolismo del citrato no se genera energía y en la ruta, además del diacetilo, como productos finales se forman: acetato, 2,3-butanodiol, acetoína (componente no aromático) y CO₂ (Early, 2000).

La cantidad que se produce de cada uno de estos compuestos varía dependiendo de las cepas utilizadas y de las siguientes condiciones (pH, temperatura, concentración de lactosa y de citrato, presencia de iones Cu⁺⁺ y Fe⁺⁺). Las concentraciones medias de las sustancias resultantes de la fermentación del citrato, son: 1-10 partes por millón (ppm) de diacetilo, 200-500 ppm de acetoína, 1-10 ppm de acetaldehído, 0-1 ppm de acetona y 0-3 ppm de etanol (Early, 2000).

Para incrementar la producción de diacetilo se requieren por lo menos tres cosas: a) las cepas bacterianas utilizadas deben ser capaces de producir diacetilo, b) el medio debe ser controlado de tal manera que el crecimiento del microorganismo sea adecuado, c) el medio, incluyendo su composición, deberá ser tal que el microorganismo puede producir cantidades apreciables de ácido pirúvico, que no sea requerido para la síntesis de material celular o reoxidación del NADH (Pérez, 1995).

Lactococcus diacetylactis fermenta los carbohidratos principalmente por la ruta metabólica de la glucólisis hasta ácido pirúvico, para obtener energía y permitir la síntesis de material celular. El suplemento de NAD⁺ está limitado y el NADH + H debe ser reoxidado para continuar la oxidación de la glucosa. El mecanismo primario utilizado por las bacterias lácticas es utilizar al piruvato como aceptor de hidrógeno y formar ácido láctico, por lo tanto en ausencia de otro aceptor de hidrógeno poco ácido pirúvico está disponible para la producción de diacetilo y acetoína. Cuando el citrato está presente los microorganismos tienen una vía alternativa para la producción de ácido pirúvico, sin la producción simultánea de NADH. Por la degradación de citrato no hay producción de energía pero existe ácido pirúvico en exceso que se puede utilizar en la síntesis de diacetilo y acetoína. La cantidad de diacetilo producida no será importante mientras el pH del medio no baje hasta valores de 5.5 o menos; esto se debe a que la citrato permeasa responsable de la entrada del citrato a la célula es más activa a estos valores de pH (Pérez, 1995).

La leche contiene entre 0.15 a 0.2% de ácido cítrico, pero no todas las bacterias ácido lácticas son capaces de metabolizarlo. Sin embargo, las especies de *Leuconostoc*, *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* citrato y los lactobacilos heterofermentativos facultativos metabolizan el ácido cítrico. Las especies de *Leuconostoc* y las cepas citrato de *Lactococcus lactis*

subesp. lactis utilizan simultáneamente el ácido cítrico y la lactosa pero no obtienen energía a partir del ácido cítrico (Doyle et al., 2001).

En la formación del diacetilo participa una oxidación descarboxilativa no enzimática del α -acetolactato (un intermediario inestable procedente de dos moléculas de ácido pirúvico). El α -acetolactato sólo puede producirse cuando el ácido pirúvico se acumula en el interior de la célula. Las especies de *Leuconostoc* metabolizan el ácido cítrico durante el crecimiento pero no se forma diacetilo hasta que el pH está por debajo de un valor de 5.4 (Doyle et al., 2001).

1.2.8.2.- Producción de acetaldehído

En este caso el acetaldehído al igual que el etanol son cuantitativamente productos finales menores del metabolismo de carbohidratos en las bacterias lácticas (Pérez, 1995; Robinson et al., 2000).

Los factores que afectan el sabor final en los quesos madurados son muy variados; (*S. diacetylactis* pese a ser un buen productor de diacetilo es un microorganismo impredecible y errático en la producción de buen sabor). Una razón de ello es que produce acetaldehído. El acetaldehído se detecta en quesos como un defecto de sabor. Tanto *S. cremoris* como *L. cremoris* pueden corregir el defecto convirtiendo el acetaldehído producido en etanol (Pérez, 1995).

Tanto el acetil fosfato como el piruvato deben utilizarse en la síntesis de acetaldehído deshidrogenasa. Los cofactores requeridos para la actividad del aldehído deshidrogenasa incluyen NAD^+ y/o NADP^+ , así como ferredoxina. La presencia del aldehído deshidrogenasa dependiente de CoA provee a los microorganismos de un mecanismo para la generación de energía vía la oxidación de acetaldehído (Pérez, 1995).

En los productos fermentados por bacterias lácticas termófilas (principalmente *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*), el principal componente del aroma es el acetaldehído, que en cantidades de 20-40 ppm imparte un óptimo aroma; otros componentes del aroma, como el diacetilo y la acetona, se encuentran en proporciones muy inferiores (Early, 2000). Las cepas citrato de *Lc. lactis subesp. lactis* también producen acetaldehído (Doyle et al., 2001).

1.3.- Textura

La palabra textura deriva del latín *textura*, que significa tejido, y originalmente se tomó en referencia a la estructura, sensación y apariencia de los tejidos (Rosenthal, 2001).

La textura se define como "Todos los atributos mecánicos, geométricos y superficiales de un producto perceptibles por medio de receptores mecánicos, táctiles y, si es apropiado, visuales y auditivos" (Jack et al., 1995; Rosenthal, 2001).

Las propiedades texturales de un alimento son un grupo de características físicas que surgen de los elementos estructurales del alimento, y son percibidos por el sentido del tacto; están relacionadas con la deformación, desintegración y flujo del alimento bajo la acción de una fuerza, y son medidas objetivamente por medio de funciones de masa, tiempo y distancia (Bourne, 1982).

Las características de la textura pueden ser divididas en tres grupos:

- *Mecánicas*: Estas características son percibidas cuando el alimento es sometido a un esfuerzo (cortado o comprimido) (Brennan, 1988).
- *Geométricas*: Se refiere al arreglo de los constituyentes del alimento y se pueden percibir en la apariencia del mismo (Brennan, 1988).
- *De composición*: Los atributos de composición también se relacionan con la percepción de los alimentos pero no con sus propiedades geométricas (Brennan, 1998).

1.3.1.- Técnicas instrumentales

Las técnicas instrumentales utilizadas para medir la textura de los alimentos están clasificadas en tres grupos:

- ⊕ ***Ensayos empíricos***: Miden alguna propiedad física bajo condiciones bien definidas. Se efectúan con instrumentos que con frecuencia son diseñados o contruidos para un material específico, por lo que los resultados son función del instrumento, el método, la carga aplicada, la velocidad de aplicación de la carga, la geometría, dimensiones y orientación de la muestra (Bourne, 1982).

Los ensayos empíricos arrojan como resultado generalmente un solo dato (distancia, fuerza, área, tiempo y velocidad). Las variables que intervienen no siempre son conocidas ni controladas. Los resultados que originan con en ocasiones específicos para un tipo de material y es difícil encontrar traducciones de un idioma a otro. Solo son válidos y comparables bajo el mismo instrumento, método, condiciones y geometría de la muestra. Son ampliamente utilizados en la industria (alimentos,

recubrimientos, materiales de construcción, petroquímica y farmacia) (Casas-Ramírez, 1998).

- ⊕ **Ensayos imitativos:** Son aquellos que tratan de simular las condiciones a las que el material está sometido en la boca (Bourne 1982).

De la misma forma que en las pruebas empíricas, influyen las dimensiones, forma, orientación del material, el dispositivo utilizado para la aplicación de los esfuerzos y el procedimiento (Bourne, 1982).

Dentro de estos instrumentos podemos encontrar el Texturometro de la General Foods. La máquina está equipada para proporcionar medidas de esfuerzo y/o deformación durante la secuencia de ensayo. Un ensayo imitativo que pretende proporcionar valores estándar de la textura de los alimentos es el Análisis de Perfil de Textura (TPA, Texture Profile Análisis) (Bourne, 1982; Rosenthal, 2001).

Los texturómetros cuentan con una amplia variedad de dispositivos de prueba (conos, placas, agujas, cilindros, esferas, cuchillas, celdas de corte y extrusión) y efectúan las pruebas ya sea bajo tensión y compresión (De Man, 1979).

- ⊕ **Ensayos fundamentales:** Los ensayos fundamentales miden propiedades físicas de los materiales tales como el módulo de Young o la razón de Poisson. De este tipo de ensayo se obtienen las funciones materiales, es decir aquellas que solo dependen del material y no del instrumento y el método. Dichos ensayos son científicamente rigurosos, y los datos son expresados en unidades científicas bien definidas como masa, longitud y tiempo y todas las variables son conocidas y controladas (Bourne, 1982).

Estos métodos son usados en investigación, en especial para materiales de estructura y comportamiento complejo (Bourne, 1982; Rosenthal, 2001). Una limitante de la aplicación de este tipo de pruebas en alimentos es la heterogeneidad de la muestra, que complica las pruebas debido a la dificultad de asegurar que los perfiles de velocidad o deformación son iguales (Rosenthal, 2001).

CAPITULO II

2. Metodología

En el presente trabajo se plantea la utilización de dos mezclas de bacterias lácticas como posibles bioconservadores en un queso tipo untable.

2.1.- Objetivo general

Determinar experimentalmente el efecto bioconservador de dos mezclas de lactobacilos, así como su posible efecto en la textura y parámetros químicos y fisicoquímicos en la elaboración de un queso tipo untable.

2.2.- Objetivos particulares

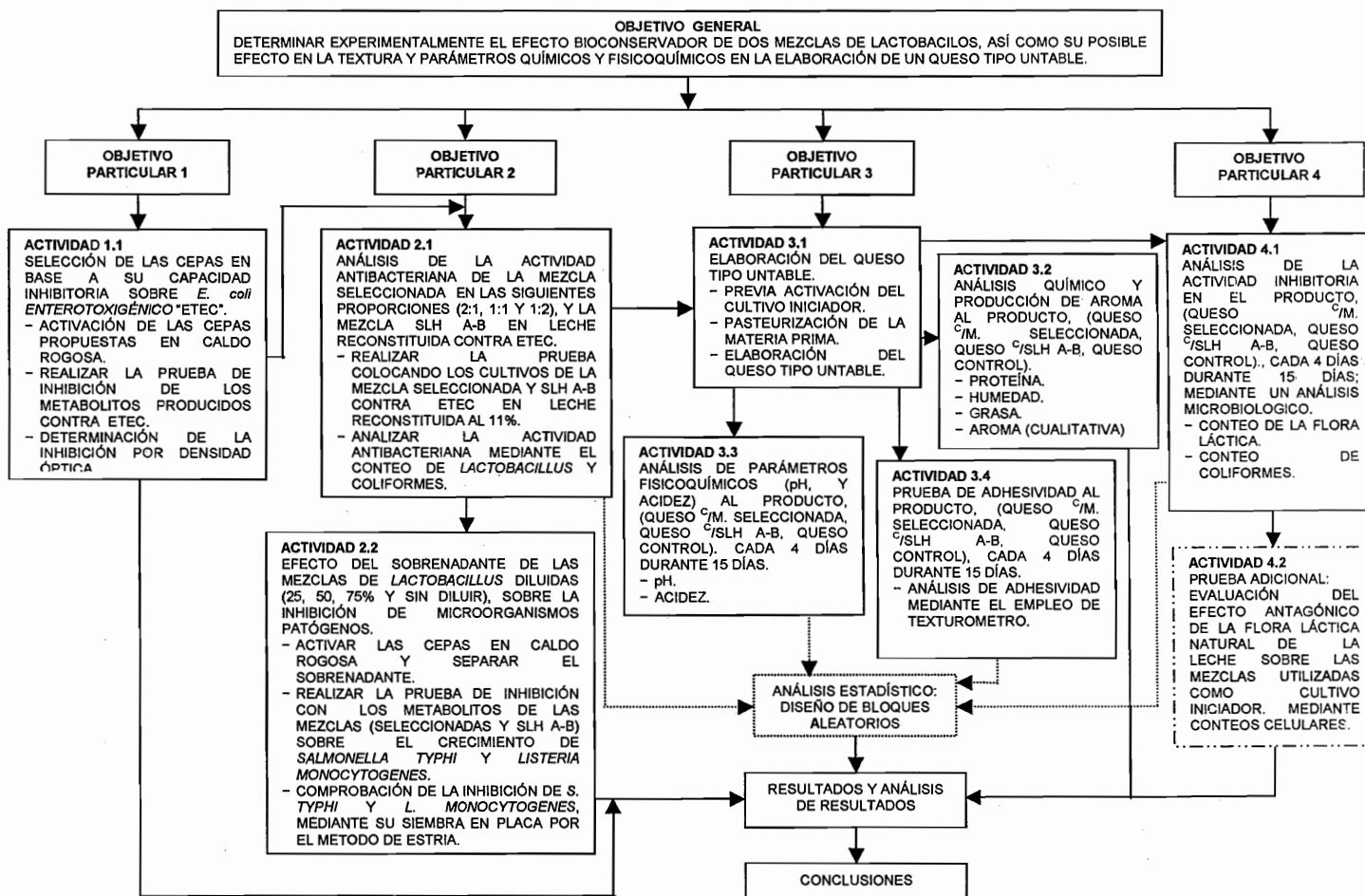
1. Seleccionar "in vitro" las cepas de *Lactobacillus spp.* que presenten el mejor crecimiento y actividad antibacteriana contra ETEC; para analizar su efecto antibacteriano contra microorganismos patógenos.
2. Determinar "in vitro" la actividad antibacteriana de la mezcla seleccionada y una mezcla comercial "SLH A-B" contra diferentes microorganismos patógenos (*Salmonella typhi* y *Listeria Monocytogenes*); para aplicarlos como cultivo iniciador en la elaboración de un queso tipo untable.
3. Aplicación de la mezcla seleccionada y la mezcla comercial en la elaboración de queso tipo untable, para analizar los posibles efectos en la textura (adhesividad), parámetros fisicoquímicos y producción de aroma.
4. Determinar el efecto bioconservador de la mezcla seleccionada con respecto a la mezcla comercial, evaluando las características microbiológicas del queso elaborado, para comprobar la actividad antibacteriana de los cultivos iniciadores utilizados.

2.3.- Metodología

La experimentación se realizó en cuatro fases como se muestra a continuación en el cuadro metodológico (figura 4).

2.3.1.- Cuadro metodológico:

Figura 4: Cuadro metodológico experimental



2.4.- Descripción del cuadro metodológico

Cepas microbianas.

El Laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Posgrado proporcionó tres cepas de *Lactobacillus spp* (2M6, ATCC y 143-3) para trabajar en este proyecto. Asimismo se adquirió una muestra comercial de cultivos protectores "SACCO LYOFAST" (SLH A-B, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*).

Las bacterias se activaron sembrándolas en caldo Rogosa y posteriormente en Agar Rogosa.

De igual forma el laboratorio proporcionó tres cepas de microorganismos patógenos (*Escherichia coli enterotoxigénico* "ETEC", *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*), para evaluar la actividad de las cepas de *Lactobacillus*.

Objetivo Particular 1

Actividad 1.1: Selección de las cepas (2M6, ATCC y 143-3) en base a su capacidad inhibitoria sobre ETEC.

Esta actividad se realizó con el fin de seleccionar aquellas cepas con el mejor crecimiento y actividad inhibitoria contra el crecimiento de ETEC.

Las cepas (2M6, ATCC y 143-3) se sembraron en caldo Rogosa incubándose a 37° C por 24 hrs. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a separar el sobrenadante, centrifugando los cultivos a 3500 RPM por 15 minutos a una temperatura de 5° C. Una vez obtenido el sobrenadante (5 ml aproximadamente) de cada cepa se inoculó con 200 µl de "ETEC" previamente activado en caldo infusión cerebro corazón, (BHI), e incubado en agitación a 37° C por 4 hrs. La mezcla se incubó por 24 hrs. a 37° C. Se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro modelo 390 TURNER; a 590 nm como medida indirecta en la inhibición del crecimiento, comparando las diferentes lecturas con el control positivo formado por ETEC y caldo Rogosa; y se seleccionaron aquellas cepas con mejor actividad inhibitoria para su posible uso en la elaboración de queso tipo untable. Esta prueba se realizó por triplicado.

Objetivo Particular 2

Actividad 2.1: Efecto de la actividad antibacteriana de la mezcla seleccionada y la mezcla SLH A-B en leche reconstituida contra ETEC.

Las mezclas propuestas (2M6-ATCC y SLH A-B), fueron probadas en leche reconstituida al 11%. La mezcla 2M6-ATCC se probó a diferentes proporciones (2:1, 1:1 y 1:2) frente a ETEC; y la mezcla SLH A-B se probó en la relación 1:1 contra ETEC. Se realizaron conteos en placa de (lactobacilos en Agar Rogosa y coliformes en Agar MacConkey, para verificar su crecimiento, cada 24 hrs. durante 4 días; y de esta manera demostrar su actividad inhibitoria contra ETEC. Esta prueba se realizó por triplicado para corroborar los datos obtenidos; y se le aplicó un análisis estadístico por bloques aleatorios para poder concluir si las medias obtenidas son iguales o diferentes entre los resultados, de acuerdo a la comparación entre la estadística de prueba (R.V.) y el valor crítico de *F*.

Actividad 2.2: Efecto del sobrenadante de las mezclas de *Lactobacillus* diluidas (25, 50, 75% y sin diluir) sobre la inhibición de microorganismos patógenos.

Se observó el efecto del sobrenadante de las mezclas propuestas (2M6-ATCC y SLH A-B) a diferentes concentraciones (25, 50, 75% y sin diluir), sobre el crecimiento de microorganismos patógenos (*S. typhi* y *L. monocytogenes*); inoculando 100 µl de cada patógeno de forma individual al sobrenadante de las mezclas, e incubando a 37° C por 24 hrs. Comprobando su crecimiento por el método de estría utilizando como medio de cultivo para *S. typhi* Agar Salmonella-Shigella, y para *L. monocytogenes*, Agar BHI. Esta prueba se realizó por triplicado.

Objetivo Particular 3.

Actividad 3.1: Aplicación de las mezclas en la elaboración del queso tipo untable

Se utilizaron dos mezclas de *Lactobacillus* para la elaboración de quesos; la primera compuesta por *Lactobacillus* spp. (2M6-ATCC), la segunda mezcla compuesta por *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum* (SLH A-B) y un control (sin cultivo).

La aplicación de la mezcla (2M6-ATCC) como cultivo iniciador implicó diferentes etapas como: activación, propagación y cultivo iniciador.

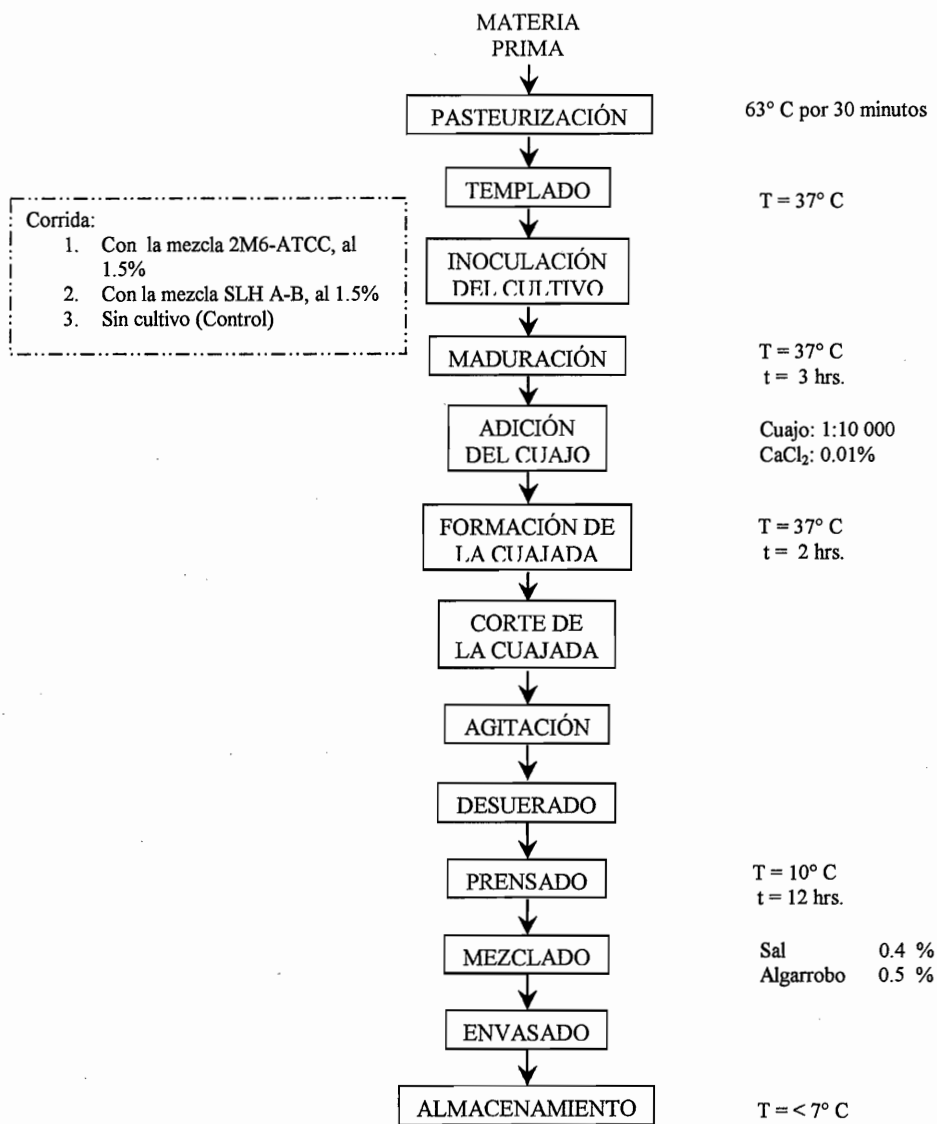
Como medio de cultivo se utilizó leche descremada libre de inhibidores reconstituida al 11% de sólidos totales y esterilizada a 121° C por 15 minutos.

- * Activación: De la cepa láctica se inocularon 2 asadas en condiciones de esterilidad a tres tubos que contenían Caldo Rogosa esterilizado y se incubaron a 37° C de 18-24 hrs. dependiendo las características de crecimiento (turbidez del medio).
- * Propagación: Se seleccionó el tubo que presentara mayor turbidez, y de éste con una pipeta estéril se pasó 0.15 ml (1.5%) en condiciones de esterilidad a cada uno de tres tubos que contenían 10 ml de leche esterilizada y se incubaron a 37° C de 18-24 hrs. hasta la formación de un gel.
- * Cultivo iniciador: Se seleccionó el tubo con una mejor apariencia del gel, y de éste con una pipeta estéril se pasó 0.7 ml (1.5%) a un matraz con 45 ml de leche esterilizada y se incubó a 37° C hasta la formación de un gel (18-24 hrs). (Cultivo iniciador para 3 litros de leche).

Con respecto a la mezcla comercial (**SLH A-B**) específicamente es para inoculación directa y únicamente se recomienda diluir previamente el contenido del sobre en leche reconstituida esterilizada y/o agua purificada libre de cloro y después aplicarlo a la leche, (Según su ficha técnica).

A continuación se describe el proceso de elaboración del queso tipo untable a nivel experimental, representado en el diagrama de bloques de la figura 5.

Figura 5: Diagrama de proceso del queso tipo untable a nivel experimental



Descripción del proceso de elaboración

- ♦ **Materia prima:** La leche destinada a la elaboración de queso debe reunir las mejores condiciones de calidad microbiológica por lo cual debe ser sometida a un tratamiento térmico de pasteurización, ya que constituye un intento de estandarización de su calidad biológica mediante la destrucción de los microorganismos y enzimas no deseados (Scott, 1991). La leche utilizada para la elaboración del queso se sometió a un tratamiento de pasteurización lenta (63° C por 30 minutos).
- ♦ **Templado:** Para la inoculación del cultivo iniciador la leche se calentó ligeramente a una temperatura de 37° C para favorecer el crecimiento de los lactobacilos.
- ♦ **Inoculación del cultivo:** Una vez teniendo la temperatura de 37° C de la leche, se procedió a inocular el cultivo, previamente activado en leche descremada. Se adicionó a una concentración de 1.5%, ya que a esa concentración se asegura la producción de ácido láctico, (Fig. 6). Utilizando una mezcla de cultivo iniciador compuesta por *Lactobacillus spp.*, y otra mezcla compuesta por *Lactobacillus plantarum* y *L. rhamnosus*.



Figura 6: La imagen muestra la cantidad de leche utilizada para la elaboración del queso y el cultivo iniciador a una concentración de 1.5%.

- ♦ **Maduración:** La maduración de la leche es consecuencia de la proliferación del cultivo lácteo, durante 3 hrs. a 37° C.
- ♦ **Adición del cuajo:** Se añadió cuajo para acelerar la coagulación de las proteínas y para conferirle una mayor consistencia al coágulo (Spreer, 1991). La técnica consistió en disolver el cuajo (CUAMEX, 8 gotas por litro) en 50 ml de agua fría o templada para facilitar la disolución en la leche mediante agitación y posteriormente dejar en reposo. El éxito de este fenómeno dependió de mantener la temperatura constante y un contenido de sales cálcicas de la leche, (cloruro de calcio al 0.01%) para asegurar la correcta formación de la cuajada.

- ♦ *Formación de la cuajada:* La formación del gel de caseína bajo la acción del cuajo comprende la transformación de la caseína en paracaseína (proceso enzimático) y la coagulación de la paracaseína bajo la acción de los iones de calcio. Durante el tiempo de cuajado continua la fermentación láctica y la proliferación microbiana.
- ♦ *Corte de la cuajada:* Para extraer el lactosuero de la cuajada es necesario cortar la cuajada en pequeños granos, (Fig. 7). Para el corte de la cuajada se pueden utilizar cuchillas o liras, haciéndose un corte en sentido transversal y longitudinal, formándose granos.

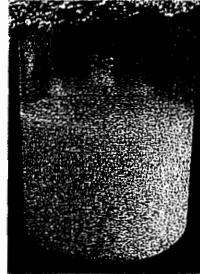
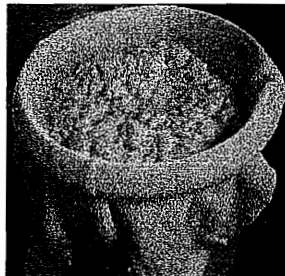


Figura 7: Formación de granos de la cuajada.

- ♦ *Agitación:* Para conservar el grano individualizado y evitar que se apelmace formando grumos y se pierda el ritmo del desuerado, es necesario mantener el grano en constante movimiento, ya que se crean las condiciones físicas necesarias en la cuajada para permitir la filtración del suero hacia a fuera del grano (Keating, 1999).
- ♦ *Desuerado:* Los granos obtenidos del corte de la cuajada se separan del lactosuero, haciéndose pasar la mezcla a través de un paño de malla fina, (Fig. 8); con lo que se logra la concentración de los sólidos y se obtiene una pasta blanda, la cual se deja reposar por 30 minutos.

Figura 8: Separación de la cuajada y el lactosuero a través de un paño.



- ♦ *Prensado*: El prensado tiene como finalidad eliminar el suero sobrante, según (Scholz, 1997), en el transcurso de esta operación se aflojará unas cuantas veces la masa de cuajada para voltearla y entremezclarla, ya que el desuerado se produce con rapidez en las zonas más externas mientras que la masa se conserva todavía muy húmeda en el centro. Si la cuajada ya no es brillante y húmeda sino mate, la cuajada alcanzó la consistencia deseada, pudiendo entonces realizar el mezclado.
- ♦ *Mezclado*: Una vez obtenida la cuajada se le incorpora 0.4% de sal y 0.5% de algarrobo, los cuales se mezclan perfectamente bajo una gran turbulencia hasta obtener una pasta cremosa, de aspecto liso y homogénea.
- ♦ *Envasado*: El queso fresco tipo untable se ha de envasar inmediatamente después de su elaboración para prevenir que se contamine y evitar así que se produzca una pérdida de calidad (Spreer, 1991).
- ♦ *Almacenamiento*: El objetivo del almacenamiento en refrigeración a $< 7^{\circ} \text{C}$ es impedir que los microorganismos típicos del producto se sigan desarrollando y acidifiquen excesivamente. También se realiza para mantener controlados los efectos que puede causar la posible recontaminación con mohos y levaduras (Spreer, 1991).

Actividad 3.2: Análisis químico al producto

A los quesos elaborados se le hicieron las determinaciones de (Humedad, Proteína y Grasa), para conocer la composición química inicial del producto, cada uno de los quesos tuvieron tres replicas y a cada muestras se le hicieron tres determinaciones.

Proteína (Técnica Micro Kjeldahl), AOAC, 1990.

Humedad (Técnica Bidwell-Sterling), Pearson, 1998.

Grasa (Técnica de Gerber), Pearson, 1998.

Actividad 3.3: Análisis fisicoquímico y de aroma al producto

De igual forma se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y de producción de aroma a los quesos elaborados; por un periodo de 15 días para comparar los posibles cambios ocurridos. Cada queso elaborado tuvo tres replicas, y a cada una de las muestras se le hicieron tres repeticiones. Aplicando el análisis estadístico por bloques aleatorios.

Acidez (NOM-091-SSA1-1994)

pH potencial H₂ (Horwitz, 2000)

Producción de aroma (cualitativa)

Reactivos y materiales:

Cápsula de porcelana plana

Agitador

Pipeta de 5 ml

NaOH al 30%

Procedimiento:

- 1.- Pesar en la cápsula de porcelana 2 grs. de muestra.
- 2.- Adicionar 3 ml de NaOH al 30%.
- 3.- Mezclar perfectamente la muestra.
- 4.- Dejar reposar la muestra. La reacción llega a su fin aproximadamente a las 2 hrs.
- 5.- Observar la coloración de la muestra.

Coloración:

Amarilla significa la presencia de diacetilo.

Rosa, carmín o rojo naranja, la de acetil metil carbinol.

Sin coloración, no hay producción de aroma.

- 6.- Reportar la observación.

Actividad 3.4: Prueba de adhesividad al producto

Al producto terminado se le realizó la prueba de adhesividad para observar algún posible cambio en la textura del producto. Estas determinaciones se hicieron cada cuatro días durante el tiempo que duro la prueba. Cada uno de los quesos tuvo tres replicas y para cada determinación se utilizaron seis muestras. A los resultados obtenidos se les aplicó el análisis estadístico por bloques aleatorios.

Equipo:

Texturómetro TAXT2

Condiciones de la prueba:

Fuerza de compresión: 200 g

Tiempo de espera: 20 segundos.

Geometría de compresión: cilindro de acrílico de 1 in.

Temperatura 22° C.

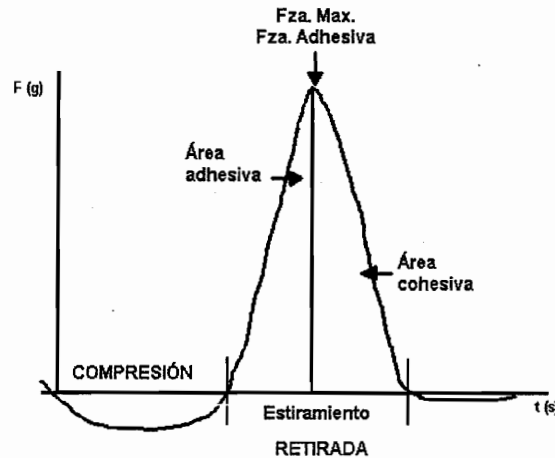
Espesor de la muestra 6 mm.

Diámetro de la muestra 5.8 cm.

Procedimiento:

- 1.- La muestra se coloca sobre la base del texturómetro.
- 2.- El dispositivo de carga se mueve justo antes de tocar la muestra.
- 3.- Se realiza la prueba. Momento en el cual se aplica la fuerza a la muestra, misma que se mantiene durante un tiempo de 20 segundos.
- 4.- Al finalizar la prueba el dispositivo se retira automáticamente, momento en el cual se procede a colocar otra muestra y a limpiar la superficie del cilindro para posteriormente realizar otra determinación.
- 5.- Durante el proceso de compresión y retirada se grafica la fuerza en función de la distancia y/o el tiempo.
- 6.- Almacenamiento de los datos obtenidos. Para la interpretación de los resultados en gráficas de Fuerza Vs Distancia o Fuerza Vs Tiempo, como se muestra en la gráfica 1.

Gráfica 1: Curva típica de Adhesividad (Fuerza Vs Tiempo)



Objetivo Particular 4

Actividad 4.1: Análisis de la actividad inhibitoria en el producto

Se realizó un análisis microbiológico al producto para analizar el efecto bioconservador de las cepas utilizadas. De cada uno de los quesos propuestos tuvieron tres replicas; y cada determinación se hizo por triplicado. Posteriormente se aplicó el análisis estadístico por bloques aleatorios.

Análisis microbiológico (NOM-110-SSA1-1994)

El análisis microbiológico que se realizó fue con la finalidad de evaluar la proliferación de los lactobacilos, y la inhibición de bacterias indeseables, haciendo el conteo de lactobacilos (agar Rogosa) y coliformes (agar MacConkey).

Reactivos y materiales:

Solución de hidróxido de sodio 0.85%
Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml
Tubos con tapón de rosca.
Cajas de petri
Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0^\circ \text{C}$.
Balanza granataría con sensibilidad de 0,1 g.
Incubadora con termostato
Microscopio óptico
Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

Procedimiento:

1. Tomar 1.0 ml o 1.0 g de la muestra y diluir con 9.0 ml del diluyente el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente. Repetir la operación hasta terminar la serie de diluciones.
2. Tomar las diluciones problema que se requieran, y sembrar en las cajas 50 μl en el medio de cultivo correspondiente al análisis. Dejar secar las gotas.
3. Invertir las cajas y colocarlas en la incubadora.
4. Contar las colonias de cada placa después de 24 o 48 hrs. de incubación.
5. Si es necesario, cuando la morfología colonial no sea suficiente, examinar microscópicamente para distinguir las colonias.

Expresión de resultados

Considerar las cuentas de placas con 10 a 150 colonias como las adecuadas para el informe. Multiplicar por el inverso de la dilución. Analizar los resultados obtenidos.

Actividad 4.2: Evaluación del efecto antagónico de la flora láctica natural de la leche sobre las mezclas utilizadas como cultivo iniciador.

Se llevó a cabo este análisis para demostrar que la flora láctica natural de la leche puede tener en algunos casos un efecto antagónico sobre la actividad de los cultivos iniciadores.

Se aislaron las colonias lácticas de la leche en agar Rogosa, y posteriormente se sembraron en caldo Rogosa incubándose a 37° C por 24 hrs. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a separar el sobrenadante, centrifugando el cultivo a 3500 RPM por 15 minutos a una temperatura de 5° C. Una vez obtenido el sobrenadante se repartió en 8 tubos con (10 ml aproximadamente); cada una de las cepas de lactobacilos se cultivaron en caldo Rogosa por 24 hrs. a 37° C y posteriormente se inocularon en el sobrenadante (200 µl), con su correspondiente control, y se incubaron a 37° C por 24 hrs. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a realizar el conteo de lactobacilos mediante una serie de diluciones y conteos realizados en cajas con agar Rogosa. Estas determinaciones se hicieron por triplicado.

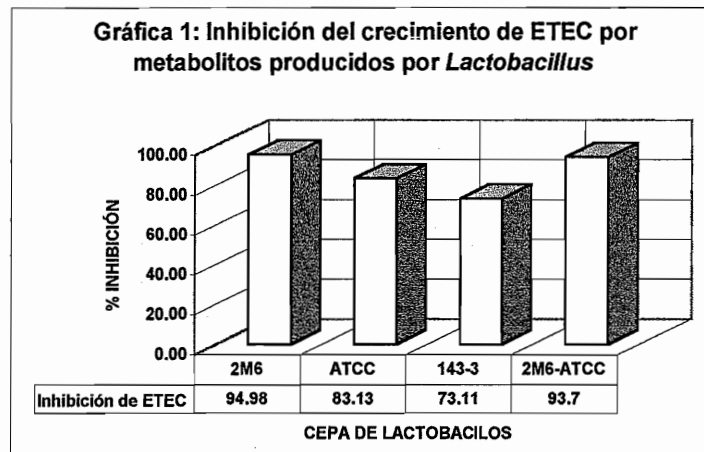
CAPITULO 3

3. Resultados y Análisis de resultados

Objetivo Particular 1

Actividad 1.1: Selección de las cepas en base a su capacidad inhibitoria sobre ETEC.

La selección de las cepas propuestas (2M6, ATCC y 143-3) fue de acuerdo a las cepas que presentaron un mayor porcentaje de inhibición. Se pueden observar en la gráfica 1.



En la gráfica 1 se muestra la respuesta obtenida de las cepas de *Lactobacillus* (2M6, ATCC y 143-3), con respecto al microorganismo de prueba "ETEC". Las cepas 2M6 y ATCC presentaron un porcentaje mayor de inhibición (94.98 y 83.1% respectivamente); mientras que la actividad inhibitoria de la cepa 143-3 fue del 73.1% por lo cual se descartó su utilización en la realización de esta experimentación por ser una inhibición muy baja.

Los metabolitos producidos por las cepas impidieron el crecimiento de "ETEC". En este punto se decidió utilizar las cepas 2M6 y ATCC combinadas, ya que se tenía el antecedente de la producción de aroma por la cepa ATCC. Además se podría complementar la actividad de la mezcla como cultivo iniciador con una actividad de inhibición de casi 94%, y al mismo tiempo contribuiría en el aroma del producto.

Según (Lash et al., 2004); algunas cepas de *Lactobacillus* son efectivas inhibiendo el crecimiento de algunas bacterias Gram Negativas como (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*,

Shigella flexneri y *Salmonella typhi*. Como se ha demostrado con las cepas de *Lactobacillus* spp., utilizadas en la experimentación, principalmente las cepas 2M6 y ATCC.

Estas cepas utilizadas en el experimento si podrían funcionar como cultivos protectores debido a su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables. Según (Devlieghere et al., 2003), mencionan que algunas cepas de *Lactobacillus* son capaces de producir componentes antimicrobianos semejantes a las bacteriocinas.

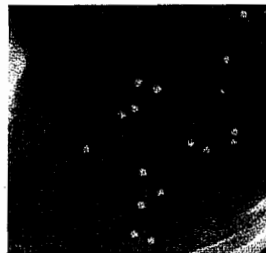
Estas características son de gran importancia ya que las bacterias ácido lácticas y las bacteriocinas son potencialmente útiles en los alimentos a causa de sus características antibacterianas, además de que se pueden usar como bioconservadores en alimentos fermentados (Lash et al., 2004).

Objetivo Particular 2

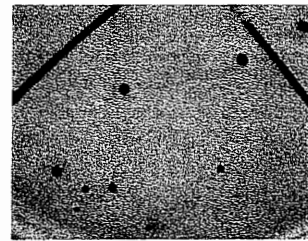
Actividad 2.1: Efecto de la actividad antibacteriana de la mezcla seleccionada y la mezcla SLH A-B en leche reconstituida contra ETEC.

Para evaluar la actividad de las mezclas 2M6-ATCC y SLH A-B como cultivo iniciador se probaron sus capacidades de adaptación y de crecimiento en leche reconstituida al 11%, evaluando su capacidad de inhibición sobre ETEC. A continuación se muestran los resultados obtenidos. En la figura 9 se muestra en crecimiento de *Lactobacillus* y coliformes.

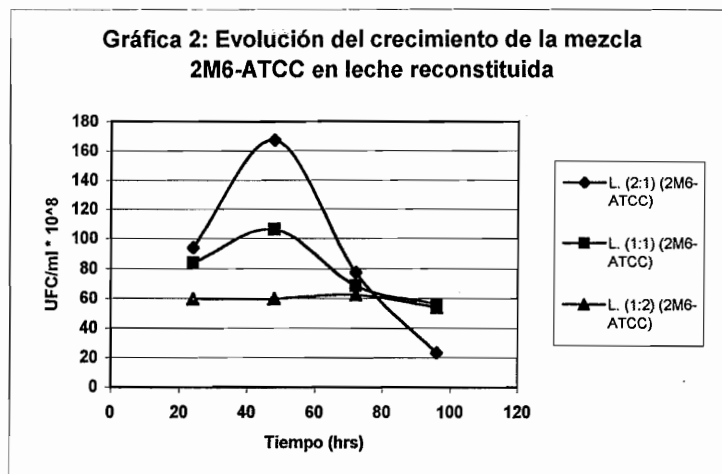
Figura 9: Conteo de lactobacilos en Agar Rogosa (a) y coliformes en agar MacConkey (b).



(a)



(b)

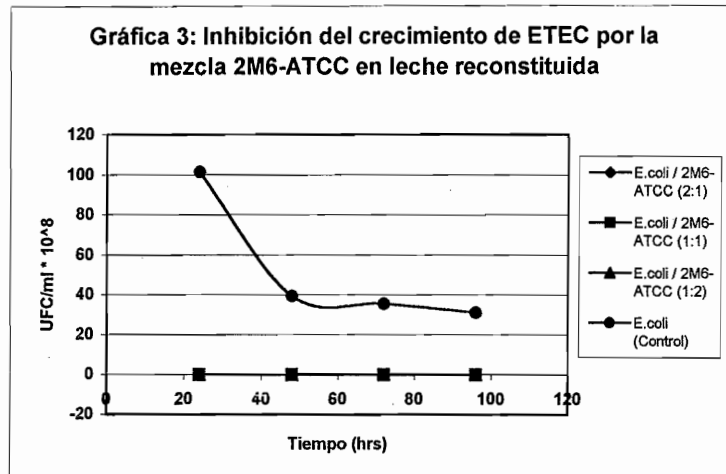


De acuerdo al análisis estadístico se obtuvo que $R.V.$ fue menor que F con los siguientes resultados 1.183 y 5.14 respectivamente con $\alpha = 0.05$. Lo que nos indica que no hay una diferencia significativa entre el crecimiento de los *Lactobacillus*.

En la gráfica 2 se observa el crecimiento de la mezcla 2M6-ATCC en las siguientes proporciones (2:1, 1:1 y 1:2).

Como se puede observar las tres mezclas propuestas presentan una actividad celular inicial excelente a las 24 hrs. de incubación; a las 48 hrs. la mezcla 2:1 presentó el mayor crecimiento celular de 17×10^9 UFC/ml con respecto a las mezclas 1:1 y 1:2 las cuales se mantuvieron en una actividad menor de 11×10^9 y 60×10^8 respectivamente. Finalmente al término de la prueba, a las 96 hrs. la mezcla 2:1 presentó un crecimiento celular ligeramente menor de 23.5×10^8 UFC/ml con respecto a las otras proporciones 1:1 y 1:2, (56×10^8 y 54×10^8 UFC/ml respectivamente).

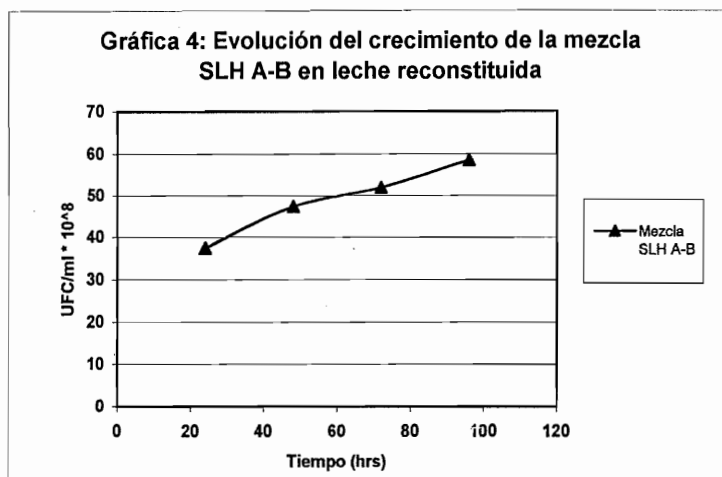
Siguiendo este criterio fue más conveniente la utilización de la mezcla 1:1 ya que no presentaba un crecimiento celular acelerado, lo cual aseguraba la viabilidad del cultivo por más tiempo. Debido a que la mezcla 2:1 presenta un crecimiento acelerado al inicio y decae drásticamente al final de la prueba (96 hrs.).



Según el análisis estadístico indica que el valor de R.V. fue menor que el valor crítico de F, con los siguientes valores 1.0 y 5.14 respectivamente y con $\alpha = 0.05$. Lo que significa que las medias no tienen una diferencia significativa, es decir que cualquier mezcla inhibió eficazmente a ETEC.

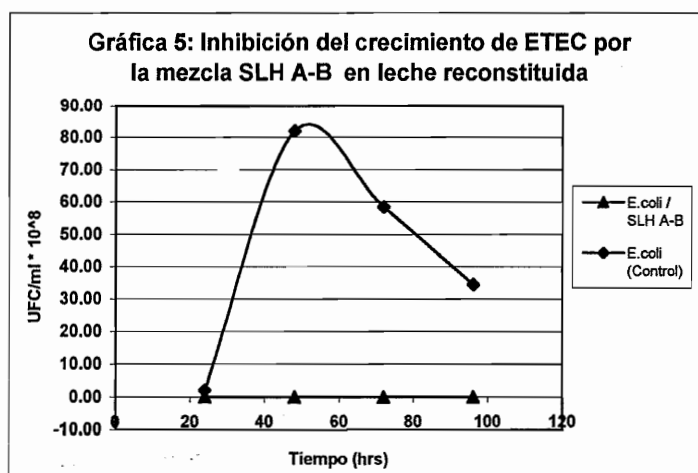
En el grafico 3 se observa cual fue la respuesta del microorganismo ETEC con respecto a cada una de las mezclas propuestas (2:1, 1:1 y 1:2).

Como se puede observar en el gráfico 3 las tres mezclas experimentales (2:1, 1:1 y 1:2) presentaron actividad inhibitoria ya que se disminuye el crecimiento de ETEC (0.03×10^8 UFC/ml, 0.17×10^8 UFC/ml y 0 UFC/ml respectivamente), en comparación con el control ya que este presenta un crecimiento inicial de 10×10^9 UFC/ml. De tal forma se puede observar, que a las 48 hrs. de contacto con las tres mezclas propuestas, se inhibió el crecimiento de ETEC en su totalidad.



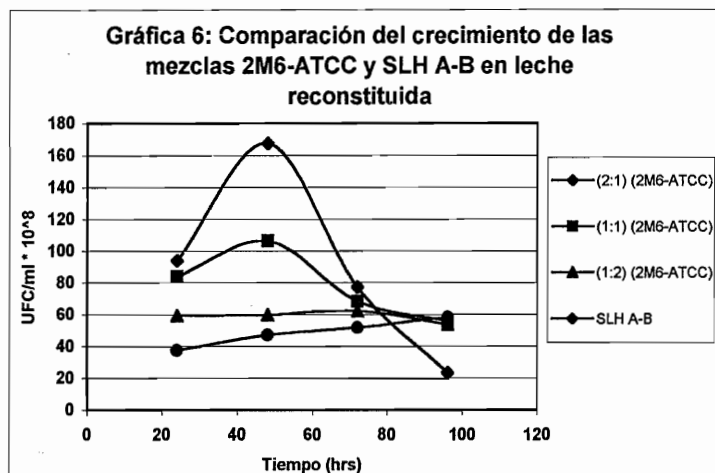
En la gráfica 4 se observa el crecimiento de la mezcla de lactobacilos SLH A-B.

Como se puede observar la mezcla SLH A-B presentó un crecimiento inicial excelente de 38×10^8 UFC/ml a las 24 hrs. manteniendo su crecimiento celular durante el tiempo que duró la prueba, es decir a las 48, 72 y 96 hrs. se registraron las siguientes lecturas 48×10^8 UFC/ml, 52×10^8 UFC/ml y 59×10^8 UFC/ml respectivamente. Lo que indicó una buena adaptación.



En la gráfica 5 se observa cual fue la capacidad de inhibición de la mezcla SLH A-B sobre el crecimiento de ETEC.

Se observa que tuvo una buena actividad inhibitoria desde el inicio ya que el control presenta un crecimiento inicial de 2×10^8 UFC/ml mientras que en contacto con la mezcla SLH A-B se registró un crecimiento de 0.05×10^8 UFC/ml; y a las 48 hrs. de contacto con la mezcla ya había inhibido en su totalidad el crecimiento de ETEC.



En la gráfica 6 se compara el crecimiento de la mezcla SLH A-B con respecto al crecimiento de las mezclas de 2M6-ATCC, lo cual indica una gran diferencia en las tendencias de crecimiento; lo que hace pensar que la mezcla SLH A-B podría tener una mejor viabilidad del inóculo por más tiempo en comparación con las mezclas propuestas de 2M6-ATCC; ya que la tendencia de crecimiento de la mezcla SLH A-B al final de la prueba prácticamente está en el mismo rango de las lecturas de las mezclas 1:1 y 1:2 (56×10^8 y 54×10^8 UFC/ml respectivamente); y para la mezcla SLH A-B es de 59×10^8 UFC/ml; lo que hace suponer que mantendría su actividad celular por más tiempo, en cambio las mezclas de 2M6-ATCC prácticamente esta decayendo su actividad celular.

Como se ha podido ver la acción bactericida de las mezclas 2M6-ATCC y SLH A-B fue efectiva sobre el crecimiento de ETEC. Según se ha reportado en otras investigaciones que el empleo de algunas cepas de *Lactobacillus* son efectivas inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram Negativas como *Escherichia coli* (Lash et al., 2004).

Algunos otros investigadores reportan que algunas cepas de *Lactobacillus plantarum* presentaron una débil actividad de inhibición contra *E. coli* (Aslim et al., 2004).

Otras investigaciones señalan que la combinación de *Lactobacillus plantarum* con *Lactobacillus lactis* presentan un mejor control contra el crecimiento de Enterobacterias (Macedo et al., 2004).

Actividad 2.2: Efecto del sobrenadante de las mezclas de *Lactobacillus* diluidas (25, 50, 75% y sin diluir), sobre la inhibición de microorganismos patógenos.

Dilución mínima de los metabolitos de la mezcla (2M6-ATCC) que se requieren para inhibir *Salmonella* y *Listeria*.

En la figura 10 se muestra la división de la caja de acuerdo a la serie de diluciones para comprobar la inhibición de los microorganismos patógenos.

Figura 10: Comprobación en placa de la inhibición del crecimiento de *Salmonella* en Agar Salmonella-Shigella (a) y *Listeria* en Agar BHI (b).

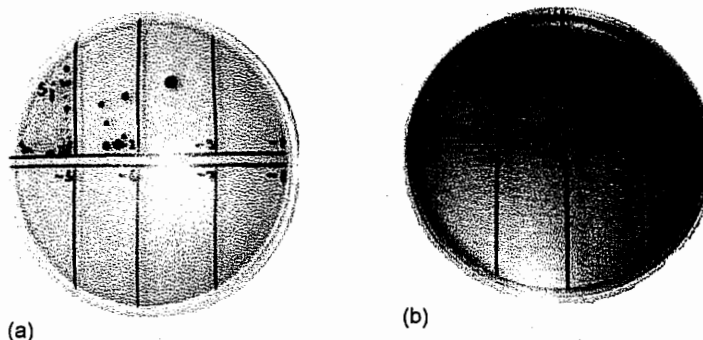


Tabla 7: Inhibición del crecimiento de *Salmonella typhi* por los metabolitos producidos por la mezcla 2M6-ATCC a diferentes concentraciones (25, 50, 75% y sin diluir).

Control: *Salmonella* 3.1×10^8 UFC/ml

% del sobrenadante	Dilución							
	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
25	+	+	+	+	+	+	-	-
50	+	+	+	-	-	-	-	-
75	+	-	-	-	-	-	-	-
Sin diluir	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Presente
- Ausente

Como se puede observar en la (Tabla 7) las diluciones que presentaron mayores porcentajes de inhibición fueron 75 y 100%, ya que inhibieron el

crecimiento de *Salmonella* en 7 y 8 ciclos logarítmicos respectivamente; mientras que en las diluciones de 25 y 50% solo se inhibió el crecimiento en 2 y 5 ciclos logarítmicos respectivamente.

Tabla 8: Inhibición de *Listeria monocytogenes* por los metabolitos producidos por la mezcla 2M6-ATCC a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100%).

Control: *Listeria* 7.15×10^8 UFC/ml

% del sobrenadante	Dilución							
	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
25	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+	-	-
75	+	+	+	+	-	-	-	-
Sin diluir	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Presente
- Ausente

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos sobre la inhibición de *Listeria*. Se puede observar que se tiene una inhibición total de su crecimiento solo al 100%, mientras que al 25, 50 y 75% la inhibición es nula o deficiente, teniendo 0, 2 y 4 ciclos logarítmicos respectivamente.

Debido a la adaptación de su crecimiento en leche y a la capacidad observada de la mezcla (2M6-ATCC) sobre la inhibición en el crecimiento de ETEC, *Salmonella* y *Listeria* se demuestra que tiene excelentes características para ser utilizado como cultivo iniciador en la elaboración de queso y que podría inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos.

Dilución mínima de los metabolitos de la mezcla (SLH A-B) que se requieren para inhibir *Salmonella* y *Listeria*.

Tabla 9: Inhibición de *Salmonella typhi* por los metabolitos producidos por la mezcla SLH A-B a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y sin diluir).

Control: *Salmonella* 3.5×10^8 UFC/ml

% del sobrenadante	Dilución							
	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
25	+	+	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-
Sin diluir	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Presente
- Ausente

Como observa en la tabla 9 la mezcla SLH A-B presentó una excelente acción bactericida sobre el crecimiento de *Salmonella* en las diferentes

diluciones, ya que al 25% solo hubo crecimiento en 2 ciclos, en las diluciones de 50, 75 y 100% inhibió en su totalidad el crecimiento.

Tabla 10: Inhibición de *Listeria monocytogenes* por los metabolitos producidos por la mezcla SLH A-B a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y sin diluir).

Control: *Listeria* 5.75X10⁸ UFC/ml

% del sobrenadante	Dilución							
	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
25	+	+	+	-	-	-	-	-
50	+	+	-	-	-	-	-	-
75	+	-	-	-	-	-	-	-
Sin diluir	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Presente
- Ausente

En la tabla 10 se observa la acción bactericida de la mezcla SLH A-B sobre el crecimiento de *Listeria*, el cual no fue tan efectivo como con *Salmonella*, pero también tiene un excelente rango de inhibición sobre *Listeria*; ya que en la dilución al 100% hubo una inhibición total, mientras que al 25, 50 y 75% hubo crecimiento en 3, 2 y 1 ciclo logarítmico respectivamente.

Tabla 11: Comparación de la acción bactericida de los metabolitos producidos por las mezclas 2M6-ATCC y SLH A-B sobre el crecimiento de *Salmonella* y *Listeria*.

[] del sobrenadante	Ciclos de crecimiento inhibidos			
	<i>Salmonella typhi</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	
	2M6-ATCC	SLH A-B	2M6-ATCC	SLH A-B
25	2	6	0	5
50	5	8	2	6
75	7	8	4	7
Sin diluir	8	8	8	8

8 excelente inhibición
0 muy mala inhibición

En la tabla 11 se resumen los resultados, con la finalidad de hacer una comparación con respecto a la mezcla 2M6-ATCC contra la mezcla SLH A-B sobre la acción bactericida sobre el crecimiento de *Salmonella* y *Listeria*, la mezcla SLH A-B presentó una actividad inhibitoria mayor sobre *Salmonella* y *Listeria*, lo que permitiría si así se requiriera usarse diluida. Mientras que la mezcla 2M6-ATCC solo es 100% efectiva sin diluir.

La adaptación a las condiciones ácidas hace mayor la persistencia de *Salmonella* en los alimentos y probablemente es un importante mecanismo de supervivencia ambiental. La adaptación se desencadena a

valores externos de pH de 5.5-6.0 y mantienen el pH intracelular por encima de 5.0-5.5. Las células adaptadas a las condiciones ácidas tienen una mayor resistencia a los ácidos orgánicos en los productos lácteos fermentados y sobreviven mejor durante la fermentación y maduración (Leyer- Johnson, 1992).

La aplicación de las mezclas 2M6-ATCC y SLH A-B pueden controlar la presencia de este microorganismo, debido a su acción bactericida como se ha podido demostrar en la experimentación. Además de que se tiene la referencia que la utilización de algunas cepas de *Lactobacillus* son efectivas inhibiendo el crecimiento de algunas bacterias Gram Negativas como (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri* y *Salmonella typhi*) (Lash et al., 2004).

Listeria monocytogenes es uno de los microorganismos que más preocupan actualmente a la industria láctea ya que aunque la listeriosis no es una enfermedad frecuente, los brotes típicos tienen un gran impacto socio-económico debido a que se acompañan de las tasas de mortalidad más elevadas provocadas por un patógeno de transmisión alimentaria en los países desarrollados (Martínez et al., 2000). De aquí la importancia de la aplicación de cultivos iniciadores en los alimentos para mejorar su seguridad y calidad.

Las mezclas 2M6-ATCC y SLH A-B presentaron buena actividad de inhibición sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Es posible que la combinación de las cepas de *Lactobacillus* y la posible producción de bacteriocinas diferentes desempeñen una mejor actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *Listeria*; como lo mencionan (Martínez et al., 2000). La actividad y espectro antimicrobiano de una bacteriocina se puede aumentar si se combina con otras bacteriocinas (se ha observado que una combinación de sakacina A y nisina A inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* de una forma mucho más efectiva que cualquiera de las dos bacteriocinas por separado).

Por otro lado también se puede destacar la acción inhibitoria de la mezcla SLH A-B compuesta por *L. plantarum* y *L. rhamnosus*, ya que según (Martínez et al., 2000), han empleado con éxito a (*L. plantarum* WHE 92) aislado de queso para prevenir la aparición de *L. monocytogenes*.

Según algunos autores (Devlieghere et al., 2003), reportan que el crecimiento de *Listeria monocytogenes* se detiene cuando el número de bacterias ácido lácticas han alcanzado 10^7 UFC/g.

Objetivo Particular 3

Actividad 3.1: Aplicación de las mezclas en la elaboración del queso tipo untable

De acuerdo a las características del queso fresco según (Buriti et al., 2005), es un excelente medio de cultivo y tiene las mejores condiciones para el crecimiento y supervivencia de las cepas lácticas. Ya que presenta una alta a_w , pH arriba de 5, bajo contenido en sal y ausencia de conservadores. Por lo tanto fue un medio ideal para estudiar la actividad de las mezclas en estudio.

Por otro lado el uso de cultivos iniciadores en la elaboración de queso es importante ya que se pretende aumentar su vida de anaquel y aumentar su seguridad. Por sus características antibacterianas funcionan como bioconservadores mejorando la calidad y seguridad de los alimentos (Buriti et al., 2005 y Lash et al., 2004).

Actividad 3.2: Análisis químico al queso tipo untable.

Tabla 12: Composición química del queso fresco tipo untable, utilizando las cepas 2M6-ATCC y SLH A-B.

Componente	2M6-ATCC	SLH A-B	Control
Proteína	14.28	14.35	14.38
Humedad	56.75	56.29	56.58
Grasa	18.46	18	17.91

La tabla 12 muestra los resultados obtenidos del análisis químico realizado al queso tipo untable. Se puede observar que estos resultados entre los diferentes quesos son muy similares, ya que se evaluaron únicamente al inicio del experimento.

Tabla 13: Composición química del queso fresco crema.

Componente	%
Proteína	18.8
Humedad	57.0
Grasa	23.0
Carbohidratos	1.2

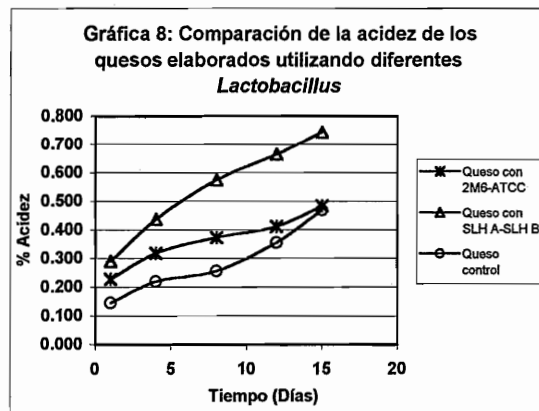
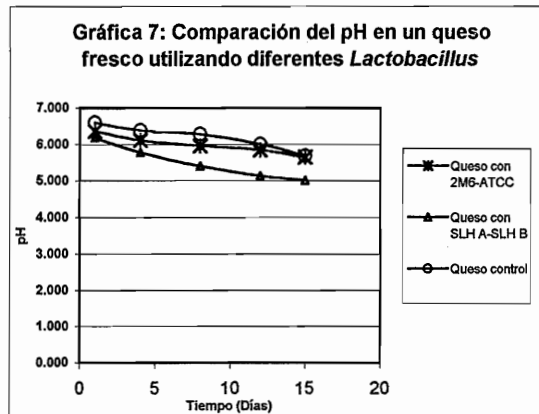
Fuente: Senser et al., 1999.

Comparando los resultados reportados de la tabla 12 con respecto a la tabla 13, se tiene que el contenido de proteína y de grasa de los quesos elaborados fue ligeramente inferior con respecto al reportado en la bibliografía, y con respecto a la humedad prácticamente resultaron

idénticos. El bajo contenido en grasa pudo deberse a que no se utilizó un mayor porcentaje de crema en la elaboración del queso como se indicó en el diagrama general de elaboración. Con respecto al contenido de proteína pudo haber una ligera pérdida de proteínas durante la elaboración del queso.

Actividad 3.3: Análisis fisicoquímico y de producción de aroma al producto.

Resultados del análisis fisicoquímico



De acuerdo al análisis estadístico se obtuvo que R.V. fue mayor que el valor crítico de F para pH y acidez; con los siguientes resultados: pH (R.V. 37.649 y F 4.46; con $\alpha= 0.05$), y acidez (R.V. 35.118 y F 4.46 con $\alpha= 0.05$). Lo que indica que las medias obtenidas tienen una diferencia significativa entre ellas. Es decir que la actividad del cultivo iniciador aplicado es diferente entre ellos.

En las gráficas 7 y 8; se presentan los resultados obtenidos sobre la influencia que ejercieron las mezclas utilizadas de lactobacilos (2M6-ATCC y SLH A-B) en el queso fresco tipo untable sobre el pH y la acidez durante 15 días almacenados en refrigeración a 7° C.

Como se puede observar el queso elaborado con la mezcla 2M6-ATCC presentó un valor de pH inicial de 6.37, y de ácido láctico producto por la fermentación de 0.22 y al final de la prueba alcanzó un valor de pH y de acidez de 5.7 y 0.48 respectivamente. Con respecto al queso elaborado con la mezcla SLH A-B presentó un valor inicial de pH de 6.19 y de acidez de 0.29, y al final de la prueba alcanzó un pH de 5.0 y una acidez de 0.74. Con respecto al queso control presentó valores inferiores de pH y de acidez con respecto a los quesos elaborados con cultivos iniciadores; ya que al inicio tuvo un valor de pH de 6.6 y de acidez de 0.15, alcanzando al final de la prueba valores de pH de 5.7 y de acidez de 0.47.

Como se puede apreciar en el queso control no hay mucha actividad de la flora natural de la leche en el queso, ya que durante casi toda la evaluación (día 1-12) sus valores de pH y acidez fueron inferiores comparados con los obtenidos con las mezclas de lactobacilos. Es decir la mezcla SLH A-B presentó más actividad en el queso debido a que durante toda la prueba presentó los valores más bajos de pH y más actividad fermentativa por una mayor producción de ácido láctico; de igual forma la mezcla 2M6-ATCC presentó mayor actividad en el queso en comparación con el queso control pero fue menor en comparación con el queso elaborado con la mezcla SLH A-B.

Como se ha podido observar el queso elaborado con la mezcla SLH A-B presentó el pH más bajo durante la experimentación en comparación con el queso elaborado con la mezcla 2M6-ATCC y el control. Esto es algo lógico debido a que el uso de cultivos iniciadores y durante la fermentación ya sea de leche o en este caso la del queso los cultivos metabolizan la lactosa a ácido láctico. Esta producción de ácido disminuye el pH y produce un medio que es desfavorable a bacterias patógenas y microorganismos indeseables (Aslim et al., 2004; Buriti et al., 2005).

La adición de cultivos lácticos es importante ya que influencia la velocidad de disminución del pH, ya sea durante la fermentación de la leche o los niveles finales alcanzados en el queso (Macedo et al., 2004).

Por otro lado es importante mencionar que según (Aslim et al., 2004), afirman que un bajo pH en los alimentos fermentados potencia el efecto antimicrobiano de ácidos orgánicos. Lo que pudo contribuir a una mejor acción inhibitoria de la mezcla SLH A-B en el queso.

Otros investigadores como (Buriti et al., 2005), nos señalan que una acidificación deficiente puede deberse al tipo de acidificación empleada, y

en este caso con respecto a la mezcla 2M6-ATCC a una mala adaptación en la leche y/o baja concentración del inóculo. Aquí es importante mencionar que pudo existir una inhibición mutua entre la mezcla de *Lactobacillus* (2M6-ATCC) y la flora láctica de la leche, como se demuestra más adelante en la actividad 4.2.

Resultados de la producción de aroma

Tabla 14: Resultados obtenidos sobre la producción de aroma en los quesos elaborados, durante 15 días almacenados en refrigeración.

QUESO \ DÍA	1	4	8	12	15
Queso/2M6-ATCC	—	—	—	—	—
Queso/SLH A-B	—	×	×	×	×
Queso control	—	—	—	—	—

— Sin producción aroma

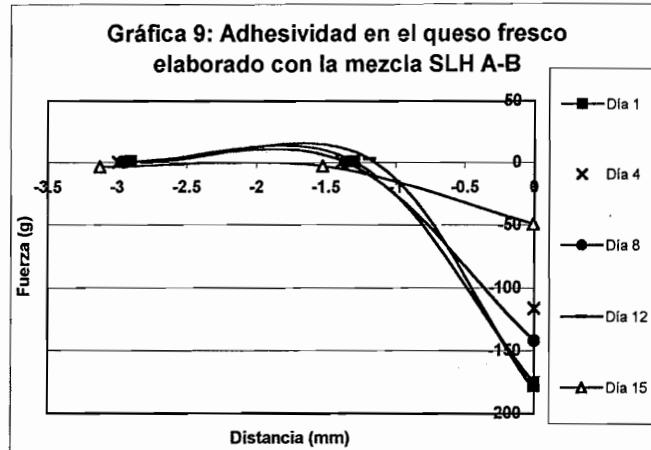
× Producción de diacetilo

Como se puede observar en la tabla 14 en el queso elaborado con la mezcla 2M6-ATCC no hubo producción de aroma durante el tiempo que duró la prueba. Con respecto al queso elaborado con la mezcla SLH A-B al primer día no se pudo apreciar que hubiera la presencia de compuestos aromáticos, pero a partir del cuarto día se registró la presencia de diacetilo hasta el final de la prueba.

El queso elaborado con la mezcla SLH A-B presentó la producción de diacetilo. Algunos autores como (Bintsis-Robinson, 2004) consideran que el aroma del queso es el resultado del balance entre varios componentes volátiles. Estos componentes son producto de la acción de microorganismos y enzimas sobre la lactosa, lípidos y proteínas de la cuajada ó queso. Estos compuestos volátiles contribuyen al aroma y sabor del queso terminado.

Con respecto a la otra mezcla utilizada (2M6-ATCC), pudieron influir otros factores para que la producción de aroma fuera apreciable, como el pH, y el crecimiento o adaptación de las cepas al medio (queso) (Early, 2000; Pérez, 1995).

Actividad 3.4: Prueba de adhesividad al producto.



En la gráfica 9 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos. No se obtuvo una tendencia clara debido a la variación de los resultados por lo que no fue posible reportar algún cambio o hacer un análisis comparativo entre los tres tipos de quesos elaborados. Por lo tanto posteriormente se justifica estadísticamente el rechazo de los resultados.

El análisis estadístico de bloques aleatorios arrojó lo siguiente:

Tabla 15: Valores de fuerza máxima para el diseño de bloques aleatorios.

Fuerza Máxima					
Días	Queso con			Total	Media
	2M6-ATCC	SLH A-B	Control		
1	0.85	122.98	143.44	267.27	89.09
4	0.97	4.79	4.8	10.56	3.52
8	1.36	25.9	9.9	37.16	12.39
12	12.25	88.83	6.07	107.15	35.72
15	2.16	3.54	0	5.7	1.90

Según el análisis se obtuvo una R.V. de 1.930 y un valor crítico de F de 4.46, con $\alpha = 0.05$, lo que indica que las medias obtenidas no tienen una diferencia significativa entre ellas. Pero si comparamos las medias obtenidas en la tabla 15 se puede ver que son muy diferentes entre ellas por lo que no se puede tomar este criterio como cierto; según Daniels, 2002, menciona que existe la posibilidad de que se esté cometiendo un error del tipo II, en términos estadísticos es (cuando no se rechaza una hipótesis nula falsa y por lo tanto se dice que probablemente todas las medias poblacionales son iguales). Esto puede suceder cuando una de las medias o tal vez todas las medias poblacionales son diferentes.

Por lo que se optó por aplicar la Prueba del rango múltiple de Duncan para comparar los pares de medias obtenidos. Al aplicar la prueba se llegó a los siguientes resultados reportados en la tabla 16:

Tabla 16: Comparación de los pares de medias por el método de Duncan.

Comparaciones			
1 Vs 5	87.19	>	66.00
1 Vs 4	53.37	<	64.84
1 Vs 3	76.70	>	63.50
1 Vs 2	85.57	>	60.61
4 Vs 5	33.82	<	64.84
4 Vs 2	32.20	<	63.50
4 Vs 3	23.33	<	60.61
3 Vs 5	10.49	<	63.50
3 Vs 2	8.87	<	60.61
2 Vs 5	1.62	<	60.61

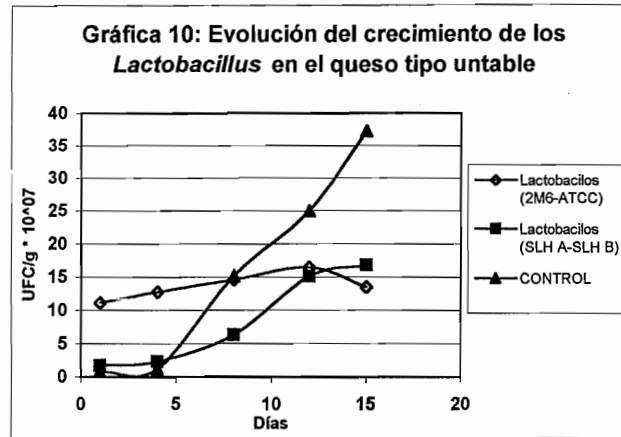
De acuerdo a este análisis se observa que si hay diferencias significativas entre algunos pares de medias, con excepción de las comparaciones (1, 4), (4, 5), (4, 2), (4, 3), (3, 5), (3,2) y (2,5).

Por otro lado algunos autores mencionan que el empleo de cultivos iniciadores trae consigo cambios en las propiedades organolépticas y de textura del alimento donde se aplican (Devlieghere et al., 2003). La textura obtenida inicialmente, se va modificando lentamente por efecto de la proteólisis hasta una textura más blanda y suave (Early, 2000). Por esta razón se realizó la prueba de adhesividad, para detectar algún posible cambio en la textura ocasionado por la acción del cultivo iniciador.

También es importante mencionar que para realizar este tipo de pruebas las variables a controlar influyen mucho sobre los resultados obtenidos. Desde la textura de la muestra, sus dimensiones, la temperatura, así como también la fuerza aplicada por el equipo y el tipo de geometría utilizado para llevar a cabo la compresión de la muestra (Hoseney-Smewing, 1999).

Las propiedades texturales de una misma variedad de queso pueden diferir considerablemente en función de su composición (principalmente debido a la humedad). Por lo que se hace referencia a la influencia de las condiciones de conservación en particular de la humedad y la temperatura (Frau et al., 2000).

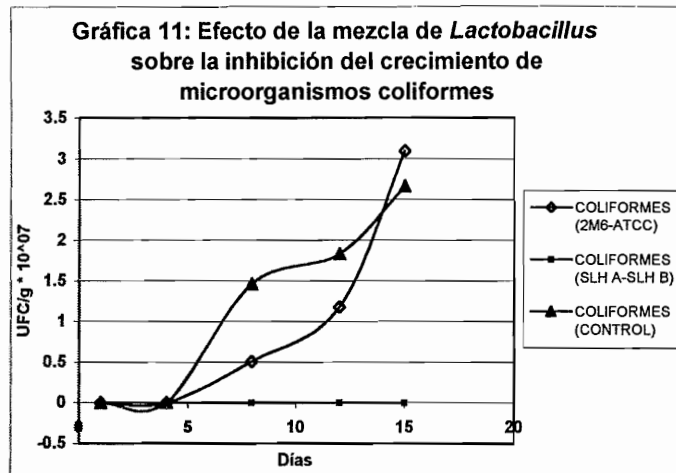
Actividad 4.1: Análisis de la actividad inhibitoria en el producto



Los resultados obtenidos del análisis estadístico indican que R.V. es menor que el valor crítico de F, con los siguientes valores 1.324 y 3.11 respectivamente y $\alpha=0.05$. Lo que indica que no hay una diferencia significativa entre las medias de los resultados obtenidos.

En la gráfica 10 se resumen los resultados obtenidos sobre la actividad celular de los lactobacilos de las mezclas 2M6-ATCC, SLH A-B y los del queso control considerados como flora láctica natural de la leche (no destruida durante la pasteurización a 63° C por 30 minutos).

De acuerdo a los datos reportados en la gráfica 10 sobre el conteo de lactobacilos para el queso con la mezcla 2M6-ATCC al inicio de la prueba presentó una actividad celular superior (11.3×10^7 UFC/g) en comparación con el queso adicionado con la mezcla SLH A-B la cual fue de 1.77×10^7 UFC/g, y con respecto al queso control su flora láctica natural fue muy baja en comparación con las anteriores 0.81×10^7 UFC/g). El crecimiento celular en el queso con la mezcla 2M6-ATCC aumentó a lo largo de la prueba hasta el día 12 reportando un conteo de 16.5×10^7 UFC/g, decayendo al final de la prueba (día 15) hasta 13.5×10^7 UFC/g. Los *Lactobacillus* en el queso elaborado con la mezcla SLH A-B incrementaron su actividad celular hasta llegar a reportar un conteo al final de la prueba de 16.8×10^7 UFC/g. Con respecto a la evolución de la flora láctica en el queso control se incrementó considerablemente después de los 4 días reportándose un conteo de 15.2×10^7 UFC/g al día 5 y siguiendo esta tendencia llegó hasta 37.3×10^7 UFC/g hasta el final de la prueba.



De acuerdo al análisis estadístico el valor de R.V. es mayor que el valor crítico de F, (3.586 y 3.11) respectivamente, con $\alpha = 0.05$. Lo que nos indica que hay una diferencia significativa entre las medias de los resultados. Es decir que la acción inhibitoria de los cultivos lácticos es diferente.

En la gráfica 11 se reportan los resultados obtenidos sobre la evolución del conteo de microorganismos coliformes presentes en el queso y la acción que tuvieron las mezclas adicionadas.

Como se puede ver en el queso control se tuvo una cuenta inicial de coliformes de 46.67×10^3 UFC/g aumentando durante el tiempo que duró la prueba presentando un valor final de 2.67×10^7 UFC/g. Con respecto al queso elaborado con la mezcla 2M6-ATCC no presentó la actividad inhibitoria que se esperaba, ya que al inicio se tuvo un conteo de coliformes de 10.7×10^3 UFC/g y aumento considerablemente a lo largo de la prueba teniendo un conteo final de 3.1×10^7 UFC/g. En el queso elaborado con la mezcla SLH A-B su actividad inhibitoria fue la esperada a pesar de que la actividad celular de los lactobacilos fue inferior comparada con la mezcla 2M6-ATCC como se mostró en el grafico 4.4.9. Al inicio de la prueba se reportó un conteo de coliformes de 8.67×10^3 UFC/g y ya para el día 4 se había inhibido en su totalidad el crecimiento.

En el queso elaborado con la mezcla 2M6-ATCC, la acción bactericida no fue la esperada, ya que no se inhibió el crecimiento de microorganismos coliformes; lo cual pudo deberse a diferentes factores que a continuación se mencionan.

Según algunos investigadores reportan que la composición química y las condiciones físicas del alimento tienen una influencia significativa sobre la actividad de las bacteriocinas (Cleveland et al., 2001). Ya que la principal aplicación de los cultivos iniciadores está limitada a la interacción que existe entre los componentes antimicrobianos (bacteriocinas) y los ingredientes de los alimentos (Devlieghere et al., 2003).

Algunos de estos componentes del alimento puede ser proteínas, grasas y almidón (Devlieghere et al., 2003; Martínez et al., 2000).

Algunos otros factores que pueden alterar la eficiencia de la cepa productora de bacteriocinas es un límite en su espectro de acción, (ya que puede haber algún fenómeno de antagonismo con otros organismos presentes del alimento), inestabilidad genética, mala difusión por las matrices del sólido, Inactivación por enzimas proteolíticas, mala adaptación del cultivo al alimento y baja producción de bacteriocina (Devlieghere et al., 2003; Martínez et al., 2000).

Otros autores mencionan que la presencia de caseína puede reducir la actividad de algunas bacteriocinas (sakacina P, curvacina y nisina) (Aasen et al., 2003).

También es importante mencionar que el nivel de sensibilidad depende de la cepa patógena y de la dosis de la bacteriocina (Martínez et al., 2000). Por lo que podría ser conveniente aumentar la dosis del inóculo en aplicaciones posteriores.

En el queso elaborado con la mezcla SLH A-B la acción bactericida fue excelente, ya que es capaz de producir componentes antimicrobianos capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos coliformes. Según (Devlieghere et al., 2003), los cultivos protectores producen componentes semejantes a las bacteriocinas.

Como se pudo comprobar y según (Buriti et al., 2005) el empleo de cultivos como *Lactobacillus* en la producción de queso resulta excelente para mejorar su calidad y seguridad.

Actividad 4.2: Evaluación del efecto antagónico de la flora láctica natural de la leche sobre las mezclas utilizadas como cultivo iniciador

Tabla 17: Porcentaje de inhibición que ejerce la flora natural de la leche sobre las cepas utilizadas como cultivo iniciador después de 24 hrs. de contacto.

CEPA	% INHIBICIÓN
2M6	6.6
ATCC	7.44
2M6-ATCC	4.19
SLH A-B	1.42

En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos de este experimento, y se puede ver que la flora láctica natural de la leche si ejerce un efecto inhibitor sobre el desarrollo de las cepas. Principalmente sobre las cepas 2M6 y ATCC ya que los valores reportados indican una disminución considerable de su crecimiento. Con respecto a la mezcla SLH A-B la inhibición fue mínima. Con esto se confirmó que la flora láctica de la leche presentó un efecto inhibitor sobre el crecimiento de las cepas 2M6 y ATCC. Algunos autores (Martinez et al., 2000) reportan que este tipo de problemas se traducen como fenómenos de antagonismo entre la flora natural del alimento y los cultivos adicionados intencionalmente.

Conclusiones

- ✦ De acuerdo a los resultados obtenidos, el queso elaborado con la mezcla SLH A-B, fue mejorado con respecto al queso control, cumpliendo con el objetivo general de este trabajo.
- ✦ De acuerdo a los resultados obtenidos "in vitro" los cultivos de 2M6-ATCC y SLH A-B inhiben eficazmente el crecimiento de ETEC en leche reconstituida esterilizada.
- ✦ Los metabolitos producidos por la mezcla 2M6-ATCC y la mezcla SLH A-B inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos como *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*, por lo que podrían ser utilizados como cultivos bioconservadores.
- ✦ El uso de cultivos iniciadores como lo fueron la mezcla SLH A-B y la mezcla 2M6-ATCC no es un método químico de conservación, sino que está basado en antagonismo biológico mediante la producción de bacteriocinas, ácidos orgánicos y diacetilos los cuales propician la inhibición de algunos tipos de flora indeseable.
- ✦ El empleo de la mezcla SLH A-B como cultivo iniciador contribuyó a la producción de aroma, así como también influyó en la disminución del pH en el queso.
- ✦ Para realizar la prueba de adhesividad es importante controlar algunas variables como la cantidad de la muestra, sus dimensiones y su temperatura ya que estas influyen sobre los resultados obtenidos.
- ✦ El queso fresco tipo untable elaborado con la mezcla SLH A-B fue de buena calidad microbiológica sin presentar alteraciones durante 15 días a 7° C.
- ✦ La pasteurización de la materia prima es importante ya que una pasteurización deficiente o mal empleada no destruye en su totalidad a microorganismos alterantes y a la flora láctica normal; lo que trae consigo un efecto antagónico entre el cultivo iniciador y los microorganismos naturales y sobrevivirá aquel que se encuentre en mayor concentración o mejor adaptado; como sucedió con la mezcla 2M6-ATCC.
- ✦ Otros de los factores que pudieron limitar el funcionamiento de la mezcla 2M6-ATCC es la posible interacción o destrucción de los metabolitos producidos por algunos componentes del alimento.
- ✦ El uso de la mezcla 2M6-ATCC podría tener una mejor respuesta, si se utilizara en una concentración mayor o se partiera de una materia prima con excelentes características microbiológicas.

Bibliografía:

- ‡ Aasen, I.M., Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., Naterstad, K., 2003. *Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents*. Int. J. Food Microbiology. 87, 35-43.
- ‡ Adams M. R., Moss M. O., 1997. *Microbiología de los Alimentos*. Ed. Acibia, Zaragoza (España).
- ‡ Alais Charles., 1998. *Ciencia de la Leche. Principios de Técnicas Lecheras*. Ed. Continental, S.A. de C.V. México.
- ‡ AOAC, 1990. *Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist*. Washington. D.C.
- ‡ Aslim, B., Yuksekdog, Z.N., Sarikaya, E., Beyatli, Y., 2004. *Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products*. Lebensm.-Wiss. u.-Technol.
- ‡ Atlas Ronald M; Bartha Richard, 2001. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. 4ª Edición. Ed. Addison Wesley.
- ‡ Aymerich, M.T., Hugas, M., 1998. *Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos*. Eurocarne. 72, 39-49.
- ‡ Baduí Salvador D., 1999. *Química de los Alimentos*. Addison Wesley Longman de México, S.A. de C.V.
- ‡ Bintsis, T., Robinson, R.K., 2004. *A study of the effects of adjunct cultures on the aroma compounds of Feta-type cheese*. Food Chemistry. 88, 435-441.
- ‡ Bourges Hector, 1982. *Nutrición y Alimentos*. Compañía Editorial Continental.
- ‡ Bourgeois-Larpen, 1995. *Microbiología Alimentaria*. Ed. Acibia, Zaragoza (España).
- ‡ Bourne Malcon, 1982. *Food Texture and Viscosity. Concept and Measurement*. Academic Press. London.
- ‡ Brennan, J.G., 1988. *Texture Perception and Measurement. In Sensory Analysis of Foods*. Elsevier Applied Science.
- ‡ Buriti, F.C.A., Rocha, J.S., Assis, E.G., Saad, S.M.I., 2005. *Probiotic potencial of Minas fresh cheese prepared with the addition of Lactobacillus paracasei*. Lebensm Wiss Technol. 38, 173-180.

- ⊕ Buss, D; Tyler, H; Barber, S; Crawley, H; 1997. *Manual de Nutrición*. Ed. Acribia, Zaragoza (España).
- ⊕ Byong H. Lee, 2000. *Fundamentos de Biotecnología de los Alimentos*. Ed. Acribia, Zaragoza (España).
- ⊕ Casas, N.B.; Ramirez, O., M.E., 1998. *Manual de Evaluación de Materiales con Máquina Universal de Deformación*, Agosto UNAM.
- ⊕ Cervera, P; Clapés, J; Rigolfas, R; 1999. *Alimentación y Dietoterapia*. 3ª edición. Ed. Mcgraw-Hill. Interamericana.
- ⊕ Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. *Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation*. Int. J. Food Microbiology. 71, 1-20.
- ⊕ Cuadernos de Nutrición. Volumen 27/Número 1/ Enero-Febrero/2004. Es una publicación de Fomento de Nutrición y Salud, a.c.
- ⊕ Daniels, Wayne. W. 2002. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. 4ª Edición. Editorial Limusa, S.A. de C.V.
- ⊕ De Man, J.M., 1979. *Rheology and Texture in Food Quality*. The Publishing Company. Inc.
- ⊕ Devlieghere, F., Vermeiren, L., Deberé, J., 2003. *New preservation technologies: Possibilities and limitations*. Int. Dairy Journal. 14, 273-285.
- ⊕ Dilanjan Sawen, 1984. *Fundamentos de la Elaboración del Queso*. Ed. Acribia, Zaragoza (España).
- ⊕ Doyle Michael, Beuchal Larry, Montville Thomas, 2001. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Ed. American Society for Microbiology. 1325 Massachusetts, Ave, NW Washington.
- ⊕ Early Ralph, 2000. *Tecnología de los Productos Lácteos*. Ed. Acribia, Zaragoza (España).
- ⊕ Fennema Owem R., 2000. *Química de los Alimentos*. 2ª edición. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España).
- ⊕ Frazier-Westhoff, 1993. *Microbiología de los Alimentos*. Ed. Acribia, Zaragoza (España).
- ⊕ Frau M., Cañellas B., Sánchez E., Rosello C., 2000. *Las Propiedades Texturales del Queso y su Papel en la Industria Láctea*. Alimentaria; Marzo. 55-58.

- ⊕ Horwitz, Dr. William, 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17th Edition. Published by AOAC International. Suite 500, 481 North Frederick Avenue Gaithersburg, Maryland. USA.
- ⊕ Hosoney, R.C., Smewing, J., 1999. *Instrumental measurement of stickiness of doughs and other foods*. *Journal of Texture Studies*. 30.123-136.
- ⊕ Jack, F.R., Paterson, A. and Piggott, J.R., 1995. *Perceived Texture. Direct and Indirect Methods for Use in Product Development*. *Int. J. of Food Science and Technology*. 30. 1-12.
- ⊕ Jay, James M. 2002. *Modern Food Microbiology*. Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, U.S.A.
- ⊕ Keating, Patrick Francis; Gaona Rodríguez Homero, 1999. *Introducción a la Lactología*. 2^a. Edición. Ed. Limusa, México-España-Venezuela-Colombia.
- ⊕ Lash, B.W., Mysliwiec, T.H., Gourama, H., 2004. *Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum (ATCC 8014)*. *Food Microbiology*. 22. 199-204.
- ⊕ Leyer, G.J., Johnson, E.A., 1992. *Applied and Environmental Microbiology*. 58. 2075-2080.
- ⊕ Macedo, A.C., Tavares, T.G., Malcata, F.X., 2004. *Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese*. *Food Microbiology*. 21. 233-240.
- ⊕ Madrid Antonio V., 1994. *Nuevo Manual de Tecnología Quesera*. Mundi-Prensa Libros, S.A. Madrid (España).
- ⊕ Mahaut Michel; Jeantet Romáin; Bruli Gérard, 2003. *Introducción a la Tecnología Quesera*. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza (España).
- ⊕ Martínez, M.I., Martínez, J.M., Horn, N., Dodd, H., Rodríguez, J.M., 2000. *Pediocina PA-1: Una Bacteriocina con Potencial Bioconservante*. *Alimentaría*; Julio-Agosto, 85-93.
- ⊕ Martínez, M.I., Martínez, J.M., Herranz, C., Suárez, A.M., 2000. *Las Bacteriocinas de las Bacterias Lácticas*. *Alimentaría*; Julio-Agosto, 67-74.
- ⊕ Mossel David A. A., Corry Janet E. L., Struijk Corry B., Baird Rosamund M., 1995. *Essentials of the Microbiology of Food*. A Textbook for Advanced Studies. John Wiley & Sons. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.

- # Naidu A.S. 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.
- # NOM-121-SSA1-1994.
- # Pérez Gavilán; Jorge-José Pablo, 1995. *Bioquímica y Microbiología de la Leche*. Ed. Limusa, México.
- # Quintero Ramírez Rodolfo, García Garibay Mariano, López Munguía Agustín, 1999. *Biotecnología Alimentaria*. Ed. Limusa.
- # Robinson Richard K., Batt Carl A., Patel Prodip D., 2000. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, A Harcourt Science and Technology Company.
- # Robinson, R. K. 1997. *Microbiología de los productos lácteos*. Ed. Acribia, Zaragoza (España).
- # Rogga, K.J., Samelis, J.,Kakouri, A., Katsiari, M.C., Savvaidis, I.N., 2005. *Survival of Listeria monocytogenes in Galatyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4° C and 12° C*. Int. Dairy Journal. 15, 59-67.
- # Ryser Elliot T.,Marth Elmer H., 1999. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 2ª Edition. Marcel Dekker Inc. USA.
- # Scholz Wolfgang, 1997. *Elaboración de Quesos de Oveja y de Cabra*. Ed. Acribia, Zaragoza (España)
- # Schlimme Eckhard-Buchheim Wolfgang, 2002. *La Leche y sus Componentes*. Ed. Acribia, Zaragoza (España).
- # Scott R, 2002. *Fabricación de Queso*. Ed. Acribia, Zaragoza (España).
- # Senser, F., Scherz, H., Bei München, G., 1999. *Tablas de Composición de Alimentos. El Pequeño "Souci-Fachmann-Kraut"*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza (España).
- # Spreer, Dr. Ing. Edgar, 1991. *Lactología Industrial*. 2ª Edición. Ed. Acribia, Zaragoza (España).
- # Stryer, Lubert., 2001. *Bioquímica*. 4ª Edición. Tomo I, II. Ed. Reverte, S.A.
- # Veisseyre, Roger., 1988. *Lactología Técnica*. Ed. Acribia, Zaragoza (España).