



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



Coordinación de
Pasantías Académicas

Pasantía de Investigación

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y TECNOLOGÍA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FERMENTOS
LÁCTICOS DE ORIGEN AUTÓCTONO PARA SU USO EN LA
FABRICACIÓN DE QUESO MADURADO**

IRENE LOURDES ZAMBRANO COLINA

MARACAY, JUNIO 2016



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y TECNOLOGÍA



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FERMENTOS LÁCTICOS DE
ORIGEN AUTÓCTONO PARA SU USO EN LA FABRICACIÓN DE QUESO
MADURADO**

Br. Irene Zambrano

Tutor académico: Dr. Ronald Maldonado

Tutora empresarial: Ing. Gabriela González

Maracay, JUNIO 2016



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y TECNOLOGÍA



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE FERMENTOS LÁCTICOS DE
ORIGEN AUTÓCTONO PARA SU USO EN LA FABRICACIÓN DE QUESO
MADURADO**

Br. Irene Zambrano

Tutor académico: Dr. Ronald Maldonado

Tutora empresarial: Ing. Gabriela González

Trabajo presentado como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero
Agrónomo Mención Agroindustrial.

Maracay, JUNIO 2016

APROBACIÓN DEL JURADO

Quienes suscriben, miembros del jurado examinador designados por el Consejo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela del Trabajo de Grado titulado **“Aislamiento y caracterización de fermentos lácticos de origen autóctono para su uso en la fabricación de queso madurado”** presentado por la bachiller **Irene Zambrano, C.I:V-19.530.666**, para optar al título de Ingeniero Agrónomo Mención Agroindustrial, consideramos que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos por los reglamentos respectivos y por lo tanto lo declaramos aprobado.

Dr. Ronald Maldonado.
C.I.
Tutor.

Dra. Marleny Chavarri
C.I:
Jurado Principal

Ing. Gabriela González
C.I:
Jurado Principal

Dr. Bernabé Meléndez.
C.I
Jurado Suplente

DEDICATORIA

A Dios padre celestial a través de su palabra diciendo que me esforzará y fuera valiente ante cada obstáculo que enfrentaba.

A mis padres y a mi hermana que me ayudaron como persona y su apoyo para que estudiara y tuviera un título universitario.

A mi novio hermoso, bello que siempre estuvo a mi lado brindándome su apoyo y amor, y desde que lo conocí me ha hecho reír, eres mi payasito bello mi rafa.

A la Universidad Central de Venezuela, por permitir el ingreso para estudiar la carrera de Ingeniería Agronómica.

A todos los profesores, compañeros y amigos que durante la carrera universitaria aportaron sus conocimientos y experiencias.

A la empresa Lactuario de Maracay, C.A por permitirme realizar la pasantía de investigación y adquirir la experiencia en el campo laboral.

AGRADECIMIENTOS

A Dios padre celestial por permitir que alcanzara esta meta que varias veces creí que no lo lograría

A mis padres que me educaron dándome lo que podían y siendo constante para que lograra este título.

A mi hermana gracias por compartir tus conocimientos y experiencias.

A mi novio precioso, bello gracias por ser una persona importante en mi vida mi ojitos bellos.

A la Universidad Central de Venezuela, por haberme formado académicamente.

Al tutor Dr. Ronald Maldonado por asesorarme durante la investigación para explicarme las dudas que tenía.

A la Ingeniera Gabriela González, por asesorarme durante el desarrollo práctico de la tesis y aportando su experiencia laboral.

A la Sra. Lisi Chacón e Ingeniera Gabriela Mosqueda, quienes me brindaron su ayuda y proporcionaron sus conocimientos y experiencias de trabajo.

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo cocos o bacilos Gram positivo y catalasa negativo que son empleados en la fabricación de productos lácteos, y bacteriocinas. El uso de las BAL es beneficioso a nivel tecnológico, sensorial y como generadores de componentes que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas. En esta investigación se aisló y se obtuvo cultivos puros de BAL en medios de crecimiento MRS y M-17, purificadas en caldo ICC y MRS y se realizó las pruebas preliminares (tinción de Gram y prueba de catalasa). El aislamiento y obtención de BAL se realizó con la finalidad de introducirlos al esquema de elaboración de queso cheddar y comparar sus características fisicoquímicas (pH, acidez, %NaCl), microbiológicas y organolépticas (sabor, acidez, salinidad y preferencia global) con un queso cheddar fabricado con fermento comercial. Los resultados obtenidos demuestran que los quesos elaborados con las BAL de origen autóctono fueron comparables desde el punto de vista fisicoquímico, sensorial, microbiológico con el queso cheddar inoculado con el fermento liofilizado. En este sentido la composición fisicoquímica promedio del queso cheddar elaborado con fermento autóctono fueron los siguientes: Humedad (36,33%), NaCl (1,67%), pH 5,35 y acidez (36,07°D). Se encontró que la población de BAL de origen autóctono mostró una cinética de crecimiento acelerada las primeras 22 horas. El queso cheddar elaborado con el cultivo láctico autóctono obtenido generó las reacciones bioquímicas adecuadas al presentar sabor, acidez, salinidad y preferencia global comparables con el queso cheddar comercial, cumpliendo además lo establecido por (Codex Stan 263, 1966). Por lo tanto, es factible el uso de las BAL de origen autóctono en la inoculación a la leche para la elaboración de este tipo de queso madurado.

PALABRAS CLAVE: Aislamiento, cultivos, autóctonos, queso madurado

ABSTRACT

The lactic acid bacteria (LAB) are a group of coccus or bacillus Gram (+), Catalase (-) that are used for manufacturing of dairy products, and bacteriocins. The use of LAB is beneficial at technology and sensory level as well as producers of components that kill the pathogenic bacteria. The purpose of this paper was the isolating and obtaining of pure cultures from LAB in growth MRS and M-17, purified ICC and MRS broth and preliminary tests (Gram stain and catalase test) was performed. The isolating and obtaining of LAB was performed with the aim of introducing this one into Cheddar cheese-making process and compare their physico-chemical (pH, acidity, %NaCl), microbiological and organoleptics characteristics (taste, acidity, salty and global preference) with a cheddar cheese made with commercial starters. The obtained results showing that the cheese's made with native LAB were comparable from physico-chemical, sensory and microbiological point of view with the cheddar cheese inoculate with starters. In this regard, the average physico-chemical composition of cheddar cheese made with native starters were: moisture (36,33%), NaCl (1,67%), pH (5,35) and acidity (36,07°D). It was found that population of native LAB showed a accelerate growth rate the first 22 hours of incubation. The Cheddar cheese made with native LAB brought about biochemical reaction affecting the taste, acidity, salty and global preference even compare with the cheddar cheese made with commercial starters, more over in agree with the recommendation given by international Institution as Codex Stand-263, (1966) therefore, is feasible the inoculation of native LAB into the milk to elaborate this type of ripened cheese.

KEY WORDS: Isolate, starters, native, ripened cheese.

TABLA DE CONTENIDO

Portada.....	i
Presentación.....	ii
Hoja de veredicto jurado.....	ii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
TABLA DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	3
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Definición de leche.....	4
2.2. Definición de quesos.....	4
2.3. Clasificación.....	4
2.4. Características generales de quesos madurados.....	6
2.5. Agentes que participan en la maduración.....	6
2.6. Composición química del queso cheddar.....	7
2.7. Bacterias ácido lácticas (BAL).....	7
2.7.1. Características generales.....	7

2.7.2. Clasificación de las bacterias ácido lácticas.....	8
2.7.3. Características del Género <i>Lactococcus spp</i>	8
2.8. Fermentos lácticos.....	9
2.8.1. Definición.....	9
2.8.2. Tipos de fermentos lácticos.....	9
2.9. Definición de suero de la leche.....	10
2.9.1. Clasificación del suero en base a su acidez.....	11
2.10. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1.- ZONA DE ESTUDIO.....	13
3.2.- AISLAMIENTO, PRESELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) AUTÓCTONAS.....	13
3.2.1.- Aislamiento de las BAL.....	14
3.2.2.- Pre-selección de las colonias.....	14
3.2.3.- Purificación de las colonias.....	14
3.2.4.- Conservación.....	14
3.3.- CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS BAL AUTÓCTONAS.....	15
3.3.1.- Preparación del suero como medio de crecimiento de BAL.....	15
3.3.2.- Caracterización de las BAL.....	15
3.3.2.1.- Obtención de las curvas de crecimiento de las BAL.....	15
3.3.2.2.- Obtención de las curvas de pH y acidez de las BAL.....	16
3.4.- COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL QUESO MADURADO CON FERMENTOS LÁCTEOS OBTENIDOS POR BAL AUTÓCTONAS CON EL QUESO ELABORADO CON EL FERMENTO LÁCTICO COMERCIAL DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO.....	16
3.4.1.- Hipótesis planteadas y tratamientos experimentados propuestos.....	16
3.4.2.- Elaboración de queso madurado, empleando cultivos iniciadores previamente seleccionados.....	16

3.4.3.- Caracterización físico-química.....	20
3.5.- CUANTIFICAR LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AUTÓCTONAS EN EL QUESO MADURADO CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMERCIALES DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO.....	20
3.5.1.- Preparación de las muestras.....	20
3.5.2.- Cuantificación microbiológica.....	20
3.6.- CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES SENSORIALES EN EL QUESO MADURADO CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AUTÓCTONAS A FIN DE COMPARARLOS CON LOS QUESOS ELABORADOS CON FERMENTOS LÁCTICOS COMERCIALES.....	21
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
4.1.- AISLAMIENTO, PRESELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) AUTÓCTONAS PARA SU CARACTERIZACIÓN E INOCULACIÓN EN QUESO MADURADO.....	22
4.1.1.- Aislamiento de las BAL de origen autóctono de los géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Lactococcus</i> para su caracterización e inoculación en queso madurado.....	22
4.1.2.- Pre-selección de las colonias de BAL de origen autóctono de los géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Lactococcus</i> para su caracterización e inoculación en queso madurado.....	23
4.1.3.- Purificación de las colonias de BAL de origen autóctono del genero <i>Lactococcus</i> para su caracterización e inoculación en queso madurado.....	24
4.1.4.- Caracterización y selección de las BAL autóctonas.....	25
4.2.- COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FISICOQUÍMICA DEL QUESO MADURADO CON FERMENTOS LÁCTICOS OBTENIDOS POR BAL AUTÓCTONAS CON EL QUESO ELABORADO CON EL FERMENTO LÁCTICO COMERCIAL DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO.....	27
4.2.1. Composición fisicoquímica de queso cheddar elaborado con cultivo láctico autóctono (T1) y queso cheddar fabricado con cultivo láctico liofilizado (T2).....	27
4.2.1.1. Humedad.....	27
4.2.1.2. pH.....	29
4.2.1.3. Acidez (°Dornic).....	29
4.2.1.4. Cloruros de sodio (%NaCl).....	29
4.2.2. Composición de las características fisicoquímicas del queso cheddar	

elaborado con fermento de origen autóctono (T1) y queso cheddar elaborado con fermento comercial (T2) durante el período de almacenamiento a 10°C....	30
4.2.2.1. Humedad.....	31
4.2.2.2. pH.....	32
4.2.2.3. Acidez (°Dornic).....	34
4.2.2.4. Cloruros de sodio (%NaCl).....	36
4.3.- CUANTIFICACIÓN LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS AUTÓCTONAS EN EL QUESO MADURADO CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMERCIALES DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO.....	38
4.4.- CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES SENSORIALES EN EL QUESO MADURADO CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AUTÓCTONAS A FIN DE COMPARARLOS CON LOS QUESOS ELABORADOS CON FERMENTOS LÁCTICOS COMERCIALES.....	40
4.4.1. Sabor.....	40
4.4.2. Acidez.....	41
4.4.3. Salinidad.....	41
4.4.4. Preferencia global.....	42
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cuantificación de las BAL de origen autóctono (ufc/ml) a partir del suero dulce y ácido.....	22
Cuadro 2. Resultados de las pruebas preliminares	24
Cuadro 3. Resultados de turbidez de las BAL autóctona.....	24
Cuadro 4. Características físico-químicas del queso cheddar elaborado con BAL autóctona y fermento comercial. Primer día de almacenamiento (Tiempo = 0 día).....	28
Cuadro 5. Características fisicoquímicas del queso cheddar elaborado con BAL de origen autóctono (T1) durante el tiempo de almacenamiento a 10 °C.....	31
Cuadro 6. Características fisicoquímicas del queso cheddar elaborado con fermento láctico comercial (T2) durante el tiempo de almacenamiento a 10 °C.....	31
Cuadro 7. Resultados obtenidos en función al atributo sensorial sabor evaluado en los quesos cheddar elaborado con BAL autóctona (T1) y comercial (T2).....	40
Cuadro 8. Respuestas de los consumidores en función al atributo sensorial acidez evaluada en los quesos cheddar elaborado con BAL autóctona (T1) y comercial (T2).....	41
Cuadro 9. Respuestas de los consumidores en función al atributo sensorial salinidad evaluada en los quesos cheddar elaborado con BAL autóctona (T1) y comercial (T2).....	42
Cuadro 10. Respuestas de los consumidores en función a la preferencia global evaluada en los quesos cheddar elaborado con BAL autóctona (T1) y comercial (T2).....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema tecnológico para el proceso de elaboración de queso cheddar.....	18
Figura 2. A. Colonias aisladas del suero.....	23
Figura 2. B. Técnica de picadura de BAL en agar M-17.....	23
Figura 3. Cinética de crecimiento de la BAL de origen autóctono género <i>Lactococcus</i>	25
Figura 4. Comportamiento con respecto a la acidez y pH de la BAL autóctona aislada género <i>Lactococcus</i>	26
Figura 5. Contenido de Humedad (%) en el T1 durante el período de maduración a 60 días	31
Figura 6. Contenido de Humedad (%) en el T2 durante el periodo de almacenamiento a 60 día.....	32
Figura 7. Comportamiento del pH en el T1 durante el almacenamiento a 60 días.....	33
Figura 8. Comportamiento del pH en el T2 durante el almacenamiento a 60 días.....	33
Figura 9. Comportamiento de la acidez (°Dornic) en el T1 durante la maduración a 60 días.....	34
Figura 10. Comportamiento de la acidez (°Dornic) en el T2 en el tiempo de almacenamiento 60 días.....	35
Figura 11. Comportamiento de %NaCl en el T1 durante el tiempo de maduración a 60 días.....	36
Figura 12. Comportamiento de %NaCl en el T2 durante el tiempo de maduración a 60 días.....	37
Figura 13. Cinética de crecimiento de la BAL autóctona inoculado en el queso cheddar (T1).....	38
Figura 14. Cinética de crecimiento de la BAL comercial inoculada en el queso cheddar (T2).....	39

I. INTRODUCCIÓN

El queso es un alimento rico en proteínas y calcio, aporta el 9% de las proteínas, 11% del fósforo y vitaminas A, D, B₁₂, B₂, que protegen de las infecciones, cuidan la piel, mejoran la cicatrización y favorecen el buen funcionamiento del sistema nervioso y cardiovascular. Una porción de 100 g de queso equivale a un aporte de 1000 mg de calcio, más que suficiente para el requerimiento diario de este mineral (Valdemar, 2012; Soto, 2013).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un importante grupo de microorganismos Gram positivos, en forma de cocos o bastones y anaerobios facultativos, generalmente inmóviles, no forman esporas, no pigmentados, no licúan la gelatina, no reducen los nitratos, carecen de catalasa y no producen indol ni ácido sulfhídrico a partir de aminoácidos, y se caracterizan por la producción de ácido láctico como resultado del metabolismo de los hidratos de carbono (Sánchez, 2005; Rodríguez, 2007; Flores, 2012).

Las BAL están incluidas dentro del grupo de microorganismos “seguros” o GRAS (generally recognized as safe), lo que implica que son utilizadas por su habilidad para acidificar y no solo para preservar alimentos, sino también su implicación en la textura, sabor, olor y desarrollo de aroma de alimentos fermentados (Parra, 2010).

En Venezuela es costosa la adquisición de fermentos lácticos, debido a que no se producen en el país. De la misma manera, no existen investigaciones actuales sobre el efecto que ejercen las BAL en las propiedades sensoriales de los quesos. La mayoría de los estudios, están vinculados al uso de la preservación, especialmente a la utilización de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas), producidas por las bacterias ácido lácticas, así como en la aplicación de las mismas en la biotecnología de alimentos.

Una forma de probar el desempeño de las BAL es incorporando en cualquier de los quesos madurados elaborados en Venezuela como el gouda o el amarillo. Sin embargo, existe un queso que a pesar de que se emplea en la elaboración de queso fundido como el queso cheddar madurado, en Venezuela no existe un esquema tecnológico estandarizado para este tipo de producto.

Esta investigación se basó en aislar las bacterias ácido lácticas de origen autóctono a las cuales se les realizó pruebas preliminares (tinción de Gram y prueba de catalasa) y se conservó sembradas en medio de cultivo semisólido a temperatura ambiente para luego utilizarlas en la fabricación de queso madurado.

La incorporación de las bacterias ácido lácticas en este tipo de queso permitió conocer el desempeño con respecto a parámetros físico-químicos y propiedades sensoriales originadas por la incorporación de las BAL autóctonas, sino que además permitió probarlas sobre un queso madurado el cual se desconoce su tecnología en Venezuela. Por lo que esta investigación es base para el conocimiento hacia las nuevas empresas que desconocen la fabricación de este tipo de producto en nuestro país.

La existencia de una propuesta para la elaboración de productos lácteos fermentados y madurados dentro de la industria venezolana es importante para ofrecer a los consumidores productos con características organolépticas desarrolladas por los cultivos iniciadores autóctonos aislados de la leche producida en el país.

OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar y caracterizar fermentos lácticos de origen autóctono para su uso en la fabricación de queso madurado.

Objetivos específicos

- Aislar, preseleccionar y purificar las BAL de origen autóctonas del género *Lactococcus* para su caracterización e inoculación en queso madurado.
- Comparar la composición fisicoquímica en el queso madurado por bacterias ácido lácticas autóctonas con el queso elaborado con cultivos lácticos comerciales durante el tiempo de almacenamiento.
- Cuantificar las bacterias ácido lácticas en el queso madurado con fermento obtenido de bacterias ácido lácticas autóctonas y comerciales durante el tiempo de almacenamiento.
- Caracterizar las propiedades sensoriales en el queso madurado con bacterias ácido lácticas autóctonas a fin de compararlos con los quesos elaborados con fermentos lácticos comerciales.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Definición de Leche.

La leche cruda, según la Norma COVENIN-903 (1993), es el producto integro, normal y fresco obtenido del ordeño higiénico e interrumpido de vacas sanas.

2.2. Definición de quesos.

Es el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína o no sea superior a la leche, obtenido mediante:

- a. Coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada / descremada, leche parcialmente desnatada / descremada, nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla / manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetado el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los lácteos.
- b. Técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas (Codex-standard 283, 1978).

2.3. Clasificación.

Según la Norma COVENIN-1813 (2000), los quesos se clasifican en:

a. Según su grado de maduración:

- Quesos madurados: Son aquellos quesos que no están listos para el consumo poco después de la fabricación, sino que debe mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en unas condiciones tales que se produzcan los cambios bioquímicos, físicos y sensoriales necesarios y característicos en el queso. Los quesos fabricados en esta investigación se encuentran en esta categoría de quesos.
- Quesos sin madurar: Son aquellos quesos que están listos para el consumo poco después de su fabricación.

b. Según su contenido en grasa extracto seco (GES):

- Queso extragrasso: Si el contenido de GES es superior o igual al 60%.
- Queso grasso: Si el contenido de GES es superior o igual al 45% e inferior al 60%.
- Semigrasso: Si el contenido de GES es superior o igual al 25% e inferior al 45%.
- Queso de bajo contenido en grasa: Si el contenido de GES es superior o igual al 10% e inferior al 45%.
- Magro: Si el contenido de GES es inferior al 10 %.

c. Según su contenido de humedad

- Queso Extraduro: Contiene < 50% HSMG
- Queso Duro: Contiene 50% > HSMG < 55%
- Queso Firme/Semiduro: Contiene 56% > HSMG < 68%
- Queso Blando: Contiene > 68% HSMG.

La HSMG equivale al porcentaje de humedad sin materia grasa:

$$HSMG = \frac{\%Humedad}{100 - \%Grasa \text{ (Base húmeda)}} \times 100$$

2.4. Características generales de queso madurado.

Según UNAD (2015), los quesos madurados presentan las siguientes características generales:

- Presenta textura suave, elástica y grasosa, es madurado por hongos en la superficie del queso. Ejemplo: Queso camembert.
- Posee la pasta semidura de apariencia externa color amarillo paja, formación de corteza lisa, la masa es lisa, no quebradiza y con presencia de ojos de forma regular. Ejemplo: Queso gouda.
- Presenta sabor intenso, cuya pasta es dura. La corteza externa es dura y lisa de color amarillo o naranja fuerte y la interna es firme, lisa y cerosa sin ojos. Ejemplo: Queso Cheddar.
- Posee textura lisa, su apariencia externa es de corteza seca y en su apariencia interna presenta la formación de ojos y de color amarillo claro. Ejemplo: Queso gruyere.

2.5. Agentes que participan en la maduración del queso.

Rodríguez (2007), señala que los agentes que participan en la maduración de los quesos son los siguientes:

- a. Aireación: El oxígeno condiciona el desarrollo de la flora microbiana aerobia o anaerobia facultativa en el queso. La aireación asegurara las necesidades de oxigeno de la flora superficial de los quesos madurados.
- b. Humedad: Favorece el desarrollo microbiano, participa en el proceso de maduración del queso, con alto contenido de humedad maduran rápidamente, mientras que con bajo contenido la maduración se prolonga considerablemente.
- c. Los valores del pH del queso oscilan entre 4,7 a 5,5 en la mayoría de los quesos. Las primeras fases de fabricación determinan la velocidad de producción de acidez hasta la adición de cloruro de sódico, que

junto a la pérdida de lactosa, determinan el pH más bajo del queso. Posteriormente, la actividad de bacterias y mohos determinan la degradación de los componentes de la cuajada a compuestos neutros o alcalinos que elevan el pH, cuyos niveles máximos se registran cuando la actividad proteolítica es muy fuerte.

2.6. Composición química del queso cheddar.

El queso cheddar es un queso duro madurado y se caracteriza porque su cuajada es salada antes del proceso de prensado. Tiene una textura firme, suave y cerosa. Carece de agujeros aunque se aceptan algunas aberturas y grietas. El objetivo de la incorporación de la sal es que retarda el crecimiento de las bacterias ácido lácticas, más aun cuando se conoce que la cuajada tiende a fusionarse muy débilmente si el pH es aún muy bajo y la fluidez de la misma es insuficiente (Walstra *et al.*, 1999).

El queso cheddar tipo americano se caracteriza por presentar la siguiente composición química: 39% de humedad, 25% de proteína, 30% de grasa y un pH de 5,5 (Mazzeo *et al.*, 2009).

En el caso del Cheddar listo para el consumo (Baby cheddar), la maduración es de 5 semanas a 7-15 °C. Según el nivel de madurez requerido. El cheddar destinado a posterior procesamiento no necesita mostrar el mismo nivel de maduración cuando se justifique debido a requerimientos de tipo comercial (Codex stan-263, 1966).

2.7. Bacterias ácido lácticas (BAL).

2.7.1. Características generales.

Son microorganismos Gram positivos, generalmente inmóviles, no esporulados, no pigmentados y no reductores de nitrato. Tampoco licúan la gelatina, no producen indol ni ácido sulfhídrico a partir de aminoácidos. En general, carecen de catalasa, pero poseen peroxidasas y superóxido dismutasas que destruyen el H₂O₂ y los O₂ que se forman en condiciones de aerobiosis. Debido a su limitada capacidad biosintética, son muy exigentes

nutricionalmente y requieren factores de crecimiento complejos que incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas y piridinas (Sánchez, 2005; Alegría, 2013).

2.7.2. Clasificación de las bacterias ácido lácticas

a. Según su tipo de fermentación

- Bacterias lácticas homofermentativas, producen como mínimo 1,8 moles de ácido láctico por mol de glucosa fermentada.
- Bacterias lácticas heterofermentativas, producen 50% de ácido láctico. Estas fermentan 1mol de glucosa para formar 1mol de ácido láctico, 1mol de etanol y 1mol de CO₂, 1 mol de ATP es generada por mol de glucosa (Parra, 2010).

b. Según su apariencia morfológica

- Bacilos: Pueden presentar aspectos cilíndricos, fusiformes y/o en forma de maza.
- Cocos: Presentan aspecto esféricas (Rodríguez, 2007).

c. Según su temperatura de crecimiento

- Mesófilas: Crecen en el rango de temperatura entre 25-30°C
- Termófilas: Temperatura óptima de crecimiento de 40-44°C (Olivera, 2011).

2.7.3. Características del Género *Lactococcus* spp.

Son células esféricas u ovoides de 0,5 a 1,0 µm por 0,5 a 1,5 µm. Gram positivos, mesófilas, no forman esporas, inmóviles, anaerobias facultativas, catalasa negativa, metabolismo homofermentativo. Tienen la capacidad de crecer entre 10 y 40 °C en pH óptimo 6,0-6,5. Aparecen individualmente, en pares o en cadenas, a menudo elongadas en la dirección de la cadena. Algunas cepas forman material gelatinoso que las rodea a manera de cápsula y son capaces de convertir rápidamente la lactosa en ácido láctico. Produce

colonias pequeñas traslucidas o blanquecinas, forma circular, lisas, enteras con 1-2 días de incubación. Produce cantidades significativas de exopolisacáridos. Contribuyen en el tratamiento tecnológico de quesos (Amarocho, 2011; Flores, 2012).

El género *Lactococcus* spp., posee entre 1 a 12 plásmidos con un peso molecular de 2 a 100 kb. Se les atribuye numerosas propiedades como la asimilación de carbohidratos, resistencia a bacteriófagos, producción de proteinasa y bacteriocinas. Los requerimientos nutricionales de estas bacterias son complejas y variables como carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, derivados de ácidos nucleicos y ácidos grasos principalmente (Amarocho, 2011).

2.8. Fermentos lácticos.

2.8.1. Definición.

Los fermentos, cultivos iniciadores o "starters" se definen como una o más cepas de una o más especies microbianas que se inoculan en una materia prima para iniciar y controlar su fermentación. Los constituyentes de los fermentos participan en los cambios más importantes que tiene lugar durante la elaboración y la maduración, modificando la textura, el aroma y el sabor de la materia prima para generar las características típicas del producto final (Alegría, 2013).

Los cultivos iniciadores, ejercen algunas funciones como, la producción de ácido, principalmente láctico, como consecuencia de su metabolismo. Sin embargo, la contribución de los cultivos iniciadores a las características finales del producto no se limita en el proceso de acidificación, sino que se completa con otras funciones como son la actividad proteolítica, la producción de compuestos aromáticos, la producción de CO₂, la síntesis de exopolisacáridos o la producción de compuestos inhibidores (Sánchez, 2005).

2.8.2. Tipos de fermentos lácticos

Existen diferentes cultivos lácticos, de acuerdo a algunos elementos:

a. Según la temperatura óptima de crecimiento de sus componentes.

- Fermentos mesófilos: Son aquellos, empleados en procesos fermentativos cuyas temperaturas óptimas se ubican entre 20-30°C.
- Fermentos termófilos: Se utilizan cuando el rango de temperatura se encuentra entre 30-50°C.
- Fermentos mixtos: Se emplea en procesos fermentativos que ocurren entre 30-40°C (Olivera, 2011).

b. Modo de presentación.

- Líquidos: Se presentan en forma líquida, el contenido aproximado de bacterias es del orden de 500 millones por ml. Deben mantenerse en refrigeración (2 – 4) °C. Este fue el tipo de fermento láctico obtenido.
- Liofilizados: Este cultivo se obtiene por deshidratación al vacío del cultivo líquido congelado. Tienen una humedad inferior al 2%. Son estables durante un tiempo corto a temperatura ambiente y por varios meses a temperatura de 3 a -5°C. El contenido de bacterias se encuentra entre los 2.000 a 3.0000 millones por gramo. Este es el cultivo láctico obtenido.
- Congelados: Son aquellos cultivos que son sometidos a un proceso rápido de congelación a temperatura de -40 a -45°C. Pueden ser no concentrados y concentrados. Los primeros, se pueden mantener de 3 a 8 meses a temperatura de congelación. Para su utilización es necesario descongelar y propagar el cultivo antes de su utilización (UNAD, 2015).

2.9. Definición de suero de la leche.

El suero, es el subproducto derivado de la fabricación de queso. Contiene gran cantidad de constituyentes nutricionales como lactosa, proteínas de alto

valor biológico como las albuminas (por su contenido de triptófano, lisina y aminoácidos azufrados), tienen una calidad igual a las del huevo y no son deficientes en ningún aminoácidos. Por otra parte, el suero presenta una cantidad rica de minerales donde sobresale el potasio, seguido del calcio, fósforo, sodio y magnesio. También contiene vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina) y ácido ascórbico (Maldonado, 2014).

2.9.1. Clasificación del suero en base a su acidez.

El suero se clasifica en general en dos grupos: Suero dulce y ácido (Recinos y Saz, 2006).

- a. Suero ácido: Es el producto lácteo líquido durante la elaboración del queso, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada tras la coagulación de la leche y/o productos derivados de la leche. La coagulación se produce, principalmente, por acidificación, además, el contenido de lactosa se reduce a causa de la fermentación láctica (ácido láctico) (Bon, 1990; Codex-standard 289, 1995).
- b. Suero dulce: Se obtiene de la coagulación no acida por la acción enzimática de la renina alcanzando un valor de pH 6,5 (Hernández, 2013).

2.10. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Morais (2004), desarrollo un estudio de aislamiento de cepas lácticas autóctonas de leche cruda de oveja para la elaboración de queso. Reporto que el valor de pH de los quesos es similar con la capacidad acidificante de *Lactococcus* utilizado en el fermento por lo que no se encontró otras diferencias en los valores de composición.

Rodríguez (2007), aisló e identifico bacterias ácido lácticas (BAL) de queso paipa elaborado semiindustrialmente y artesanal, en diferentes días de maduración (1, 5 y 10 días) y leche cruda. Las colonias seleccionadas para su identificación fueron caracterizadas mediante las pruebas de catalasa, oxidasa, coloración de Gram. Forma (cocos y bacilos) para seleccionar las colonias de las bacterias. Se utilizaron los medios de cultivo selectivos MRS (*Lactobacillus* spp.), M17 (*Streptococcus* spp.), ATP (*Leuconostoc*).

Ramos *et al.* (2009), realizaron el aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para elaborar queso crema, las cepas de BAL se inocularon en leche descremada para evaluar el poder acidificante (pH) en tiempos de incubación y temperatura de fermentación. Obtuvieron, entre 37°C y 42°C y el pH más bajo en 72 h de incubación.

Latorre (2011), aisló las bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda de oveja, seleccionó cepas con diferentes características morfológicas para su posterior inoculación en caldo de cultivo y en agar nutritivo para verificarlas como cultivo puro. Las cepas seleccionadas se identificaron empleando pruebas bioquímicas como, catalasa, KOH y tinción de gram. Evaluó las cepas aisladas, a través de la capacidad para acidificar, producir CO₂, actividad lipolítica y proteolítica.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- ZONA DE ESTUDIO

La investigación se realizó en la empresa Lactuario de Maracay, C.A, ubicada en Maracay, estado Aragua. La cual se llevó a cabo en tres fases. En la primera fase de este trabajo, se obtuvo un suero dulce a partir del esquema tecnológico general del proceso de elaboración del queso llanero. Para ello, se recolectó 50 litros de leche cruda a 10°C proveniente de rebaño de vacas del municipio José Tadeo Monagas en el estado Guárico. Posteriormente, se procedió a filtrar, agitar y calentar simultáneamente hasta que la leche cruda alcanzó 35°C, luego se añadió 1,5 g de cuajo (3g/100L) para iniciar el proceso de coagulación de la leche.

Luego de los 45 minutos y una vez formado el gel de paracaseinato fosfato cálcico se procedió al corte del mismo hasta que los trozos de cuajada obtenidos sean del tamaño de un grano de garbanzo. Finalmente, se agitó por un espacio de 5 minutos para facilitar la sinéresis del suero.

Una vez obtenido el suero, se recolectó 2 litros que constituyen el suero dulce. La forma de almacenar el suero se realizó para el aislamiento de las BAL siguientes BAL:

- Suero dulce: Se almacenó durante 6 h a temperatura de refrigeración, con pH entre 5,6-6,6. De esta manera se esperó obtener BAL del género *Lactococcus*.
- Suero ácido: Se incubó el suero dulce, obtenido del esquema del queso llanero, en estufa a 30°C, por 24 horas con pH en el rango 3,8-4,5. Aplicando esta técnica se esperó obtener BAL del género *Lactobacillus* (Maldonado, 2014).

3.2.- AISLAMIENTO, PRESELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) AUTÓCTONAS.

A continuación, se presenta el procedimiento propuesto por Maldonado (2014), para aislar las bacterias ácido lácticas presentes en dichos sueros:

3.2.1.- Aislamiento de las BAL

Las muestras de suero se manipularon según la Norma COVENIN 1126 (1989), para ello se pesó 10 g de la muestra y se homogenizó con 90 ml de agua peptonada estéril (APE) 0,1 %. Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas en APE 0,1% hasta 10^{-5} . Se sembraron las muestras del suero de las diluciones seriadas en placas contentivas de agar MRS y M-17 usando el método de extensión en superficie (0,1 ml) con una espátula Drigalsky por duplicado e incubado en estufa a 37°C por 48 horas.

3.2.2.- Pre-selección de las colonias.

Se seleccionaron placas contentivas entre 20-200 ufc/ml y con un asa de platino estéril se procedió a la resiembra empleando la técnica de picadura en los medios MRS y M-17, e incubación en estufa a 37°C por 48 horas. Posteriormente, se tomaron las colonias para realizar las pruebas preliminares (Tinción de Gram y prueba de catalasa con el peróxido de hidrógeno al 0,3%), para luego realizar la pre-selección de aquellas colonias de bacilos o cocos Gram positivo y catalasa negativa.

3.2.3.- Purificación de las colonias

Las cepas aisladas fueron purificadas por 2 sub-cultivos sucesivos y alternados en caldo (MRS y M-17). Para ello se utilizó un asa de platino estéril y se tomaron colonias de cocos y *bacillus* Gram (+), catalasa (-), para sembrarlas en placas por estriación en superficie en el medio M-17 para cocos y MRS para *Bacillus*. Las placas se incubaron en condiciones aeróbicas a 37°C por 72 horas. Antes de la segunda siembra por estriación en placas, se verificó que las colonias sean cocos o bacilos Gram positivo, catalasa negativa.

3.2.4.- Conservación

Las cepas pre-seleccionadas fueron reactivadas en caldo MRS o M-17 según sea el caso, a 37°C por 24 horas y se sembraron (3 ansadas) en agar semisólido (8 g agar nutritivo / L) + caldo de MRS o M-17 previamente esterilizado (121°C por 15 minutos) en los tubos ependdorf. El cultivo puro

estuvo sellado a temperatura de ambiente y constituye como el cultivo madre para las futuras fermentaciones ácido lácticas.

Para la preparación del fermento líquido, se pesó 120 g/l leche en polvo, se agitó hasta obtener leche reconstituida. Posteriormente, se calentó a 80°C/15'' y se enfrió con agua helada. Se transfirió a una fiola para añadir 5% caldo turbio ICC (50 mL caldo/1000mL leche) y se incubó a 30°C/12 h. Luego, se refrigeró a 10°C para ser utilizado en la fabricación de queso madurado.

3.3.- CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS BAL AUTÓCTONAS

3.3.1.- Preparación del suero como medio de crecimiento de BAL

El suero estéril utilizado como medio de crecimiento de las BAL, se obtuvo de la fabricación de queso ricotta (pH 5,6), se ajustó a pH 6,6 con NaOH 1N, se le aplicó un calentamiento a 60°C por 30 minutos y se filtró. Luego se esterilizó a 85°C por 30 minutos, se envasó en caliente en recipientes de vidrio de 500 mL. Finalmente, se calentó el frasco contentivo del suero a 100°C por 1 hora para asegurar la ausencia de BAL proveniente de la leche y garantizar que en la inoculación este solamente el microorganismo en estudio.

3.3.2.- Caracterización de las BAL

La caracterización se realizó empleando como sustrato de crecimiento, el suero clarificado y esterilizado obtenido de acuerdo a lo señalado en el apartado 3.3.1. Las curvas de crecimiento de BAL, pH y acidez se llevó a cabo de manera simultánea. Para ello se utilizó 1000 mL del sustrato de crecimiento y en condiciones de esterilidad se inoculó 1% de las BAL previamente reactivadas en sus caldos de crecimiento. La población de microorganismos, pH y acidez se midió a los 0, 4, 8, 24 y 48 horas de incubación y a temperatura de incubación 37°C.

3.3.2.1.- Obtención de las curvas de crecimiento de las BAL

Los recuentos de células viables del género *Lactococcus*, se llevaron a cabo en agar M-17, y *Lactobacillus* en MRS, por previa dilución seriada en agua peptonada (APE 0,1%). Para cada tiempo de incubación, se seleccionaron placas contentivas entre 20-200 ufc/ml para la cuantificación

microbiológica. La población enumerada se multiplicó por el inverso de la dilución y se transformaron en logaritmos para representarlos en las gráficas de curva de crecimiento.

3.3.2.2.- Obtención de las curva de pH y acidez de las BAL

Se tomaron 10 mL del sustrato de crecimiento para cada BAL en estudio y se midió la acidez (COVENIN-658, 1997) y pH (COVENIN 1315-79, 1979) en los tiempos señalados en el punto 3.3.2. Con los datos obtenidos se construyó los perfiles de pH y acidez.

3.4.- COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FISICOQUÍMICA DEL QUESO MADURADO CON FERMENTOS LÁCTICOS OBTENIDOS POR BAL AUTÓCTONAS CON EL QUESO ELABORADO CON EL FERMENTO LÁCTICO COMERCIAL DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

3.4.1.- Hipótesis planteadas y tratamientos experimentales propuestos

El propósito de esta investigación, fue determinar si el fermento elaborado con las BAL autóctonas inoculadas en el queso madurado tiene el mismo efecto (Hipótesis nula) que el fermento elaborado con cultivo láctico comercial en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales en el queso Cheddar fabricado (Hipótesis alternativa).

En este sentido, se llevó a cabo 4 fabricaciones de queso madurado, que consistieron en dos tratamientos, empleando los cultivos puro aislados y seleccionados (T1), y cultivo láctico comercial (T2).

3.4.2.- Elaboración de queso madurado, empleando cultivos iniciadores previamente seleccionados

Fueron probadas las BAL seleccionadas sobre un sustrato real, caseína coagulada, obtenida del proceso de fabricación de quesos y el esquema tecnológico empleado fue de un queso con 60 días de maduración (queso baby Cheddar tipo americano). Se escogió el esquema tecnológico del queso Cheddar, porque es un queso que en Venezuela se emplea para la elaboración del queso fundido. Sin embargo su esquema de elaboración no es muy bien conocido, por lo que es muy importante estandarizar el esquema de producción

a partir de los fermentos obtenidos de las BAL autóctona de Venezuela y comparar su desempeño con los fermentos de cultivos comerciales normalmente empleados para su fabricación.

Los quesos fueron fabricados en la planta piloto de la empresa Lactuario de Maracay ubicada en Maracay Edo. Aragua y el esquema tecnológico del proceso de elaboración del queso cheddar tipo americano empleado fue propuesto por dicha empresa según lo señalado en la Figura 1.

Por cada lote de leche a procesar, se pasteurizó usando el sistema HTST (73 °C/15 seg) para la eliminación de patógenos. Se disminuyó la temperatura a 35°C en el intercambiador de placas. Después, la leche fue transferida a una tina de coagulación y se acondicionó restituyendo el tamaño de la miscela de caseína con la incorporación de 10 g CaCl₂ /100 L leche. De esta manera se obtuvo un gel mecánicamente resistente. Inmediatamente luego de haber agregado el cloruro de calcio, se incorporó 1,5% de fermento comercial y los obtenidos previamente en esta investigación a partir de cultivos madres de BAL autóctona. Luego del acondicionamiento con el cloruro y el fermento, se agitó continuamente por un tiempo de 45 min a 32°C para reactivar los fermentos lácticos incorporados. Lo anterior constituirá la primera fase del proceso.

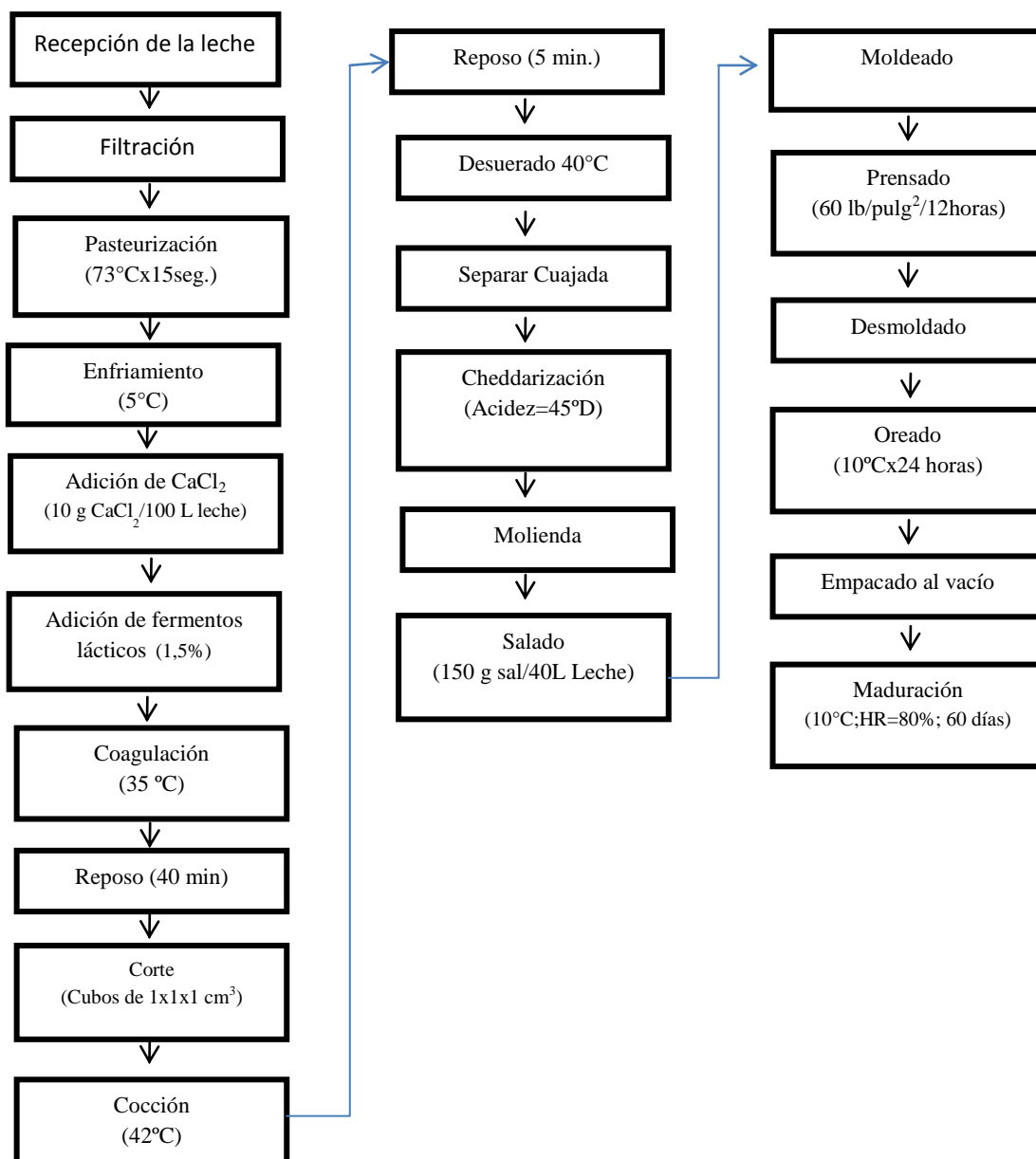


Figura 1. Esquema tecnológico para el proceso de elaboración de queso cheddar.

Fuente: Lactuario de Maracay C.A, 2015.

La segunda fase del proceso es la coagulación enzimática de la leche y se inició con la incorporación de la enzima renina (3 g/100 L leche). Por un tiempo de 30 segundos se agitó la leche para permitir que la renina se mezcle y luego el asentamiento o la coagulación por 40 minutos. Una vez alcanzado el tiempo y verificado que el gel este mecánicamente resistente, se cortó en cubos de $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$ utilizando para ello una lira de acero inoxidable con posterior agitación.

Finalizado el corte de la cuajada, el próximo paso fue incrementar la temperatura de la cuajada a 42°C con agitación continua para favorecer la transferencia de calor y que la tasa de incremento sea de $0,5^\circ\text{C}$ por min. Una vez alcanzada la temperatura deseada, esta se dejó en reposo por 5 minutos o hasta que la cuajada haya precipitado completamente, luego el suero fue drenado de la tina.

La tercera fase del proceso fue la cheddarización de la cuajada o fermentación ácido láctica. La cuajada desuerada se mantuvo a 39°C y se cortó en pliegues grueso para facilitar el desuerado y el volteado cada 15 min para uniformizar la sinéresis.

El proceso finalizó cuando la acidez titulable del suero fue 45° dornic. El proceso de molienda fue realizada con cuchillos para alcanzar una reducción del tamaño de la cuajada en cubos de $2,5 \times 2,5 \times 2,5 \text{ cm}^3$. La incorporación de la sal, fue directa a nivel de tina en un porcentaje del 3% (p/p).

La cuarta fase del proceso involucra las etapas del moldeado, prensado y oreado de los bloques de queso cheddarizado. La cuajada fermentada se colocó en moldes rectangulares de plástico y se procedió al prensado a 60 Lb/pulg^2 por un tiempo de 12 horas a la temperatura de 30°C . Este último fue con la finalidad de darle forma al queso y terminar de desuerar la cuajada. Una vez terminado el prensado se retiró los bloques de queso de los moldes y los bloques fueron colocados en la cavas de refrigeración a 10°C para su oreado por 24 horas. El oreado contribuye a tener una superficie seca, lo que facilita la labor de empaclado. Los bloques de queso oreado fueron empacados al vacío

empleando bolsas Cryovac. Finalmente, los quesos empacados fueron colocados en la cava de maduración a 10°C para iniciar la última fase del proceso que es la maduración a nivel de cava. El tiempo de maduración fue de 2 meses, y las condiciones de la cava de maduración fueron a 10°C y humedad relativa del 80%.

3.4.3.- Caracterización físico-química

Las muestras de queso madurado, fueron analizadas mensualmente durante la etapa de maduración para medir pH, acidez, %humedad, cloruros de sodio con la finalidad de realizar comparaciones en función a estas variables con el queso elaborado con el fermento tradicional. Para ellos se realizaron las siguientes determinaciones: humedad norma COVENIN–1077 (1997); cloruros COVENIN–369 (1982); acidez COVENIN–658 (1997) y pH COVENIN 1315–79 (1979).

3.5.- CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS AUTÓCTONAS EN EL QUESO MADURADO CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMERCIALES DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

3.5.1.- Preparación de las muestras

La identificación y preparación de las muestras para el análisis microbiológico se realizó según lo descrito en la norma venezolana COVENIN 1126–89 (1989), Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Para ello se pesó 10 g de la muestra y se homogenizó con 90 ml de citrato de sodio (CNa). Seguidamente, se realizó diluciones seriadas en (CNa) hasta 10^{-5} .

3.5.2.- Cuantificación microbiológica

Se sembraron las muestras de queso en las diluciones seriadas en placas contentivas de agar M-17 y MRS al emplear el método de extensión en superficie (0,1 ml) con una espátula Drigalsky e incubación en estufa a 37°C por 48 horas.

Obtenidas las diluciones seriadas, se procedió a la cuantificación del total BAL en ambos tratamientos, seleccionando placas entre 20-200 ufc/ml, para

comparar la población en ufc/g entre queso elaborado con el fermento de BAL autóctona en relación al queso fabricado con el cultivo comercial.

3.6.- CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES SENSORIALES EN EL QUESO MADURADO CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AUTÓCTONAS A FIN DE COMPARARLOS CON LOS QUESOS ELABORADOS CON FERMENTOS LÁCTICOS COMERCIALES

El propósito de este ciclo de la investigación, fue determinar si los fermentos obtenidos por BAL autóctonas inoculadas en el queso madurado producen el mismo efecto que el cultivo comercial en las propiedades sensoriales del queso cheddar elaborado.

Se utilizó la prueba de comparación pareada por preferencia (Stone y Sidel, 1993), y para ello se les presentó a los panelistas un set de dos muestras (T1 y T2) y se les solicitó que escogieran la muestra de su preferencia. La evaluación se hizo en base a los atributos sensoriales, sabor, acidez, salinidad y preferencia global del producto.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de los análisis físico-químicos se llevaron a cabo aplicando una prueba de T´Student para diferencia de medias entre las mediciones de Humedad, pH, acidez y cloruros en ambos tratamientos para cada tiempo de evaluación (0, 30 y 60 días de maduración). Los resultados fueron mostrados graficados en una curva de dispersión. A los resultados del tiempo de almacenamiento se les aplicó la prueba de Kruskal y Wallis a un nivel de significancia $\alpha=0,05$. Tomando en cuenta los tiempos de almacenamiento como tratamientos (Canavos, 1988).

A los resultados de los análisis microbiológicos se transformaron en logaritmo base 10 y sobre ellos se aplicó el mismo tratamiento realizado en los análisis físico-químicos.

Para el análisis de los datos obtenidos de la prueba sensorial, se empleó la prueba de distribución binomial de dos cola y $\alpha=0,05$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- AISLAMIENTO, PRESELECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) AUTÓCTONAS PARA SU CARACTERIZACIÓN E INOCULACIÓN EN QUESO MADURADO

4.1.1.- Aislamiento de las BAL de origen autóctono de los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus* para su caracterización e inoculación en queso madurado

Los resultados de la cuantificación de las BAL utilizando como sustrato de crecimiento suero dulce y suero ácido (Cuadro 1), indican la existencia de un mayor crecimiento en el medio M-17 tanto en el suero dulce como en el suero ácido. Sin embargo, en el caso del suero ácido empleado como sustrato en ambos medios, el crecimiento poblacional fue comparable. Esto significa que es muy probable que el porcentaje de *Lactococcus* presentes en la muestra sea más elevado que *Lactobacillus*.

Cuadro 1. Cuantificación de las BAL de origen autóctono (ufc/ml) a partir del suero dulce y ácido.

Medio de crecimiento	Suero dulce (ufc/mL)	Suero ácido (ufc/mL)
MRS	$6,5 \times 10^4$	$9,3 \times 10^5$
M-17	$4,3 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$

De lo anterior, se puede señalar que es recomendable utilizar el medio M-17 en suero dulce para la recuperación de *Lactococcus*, mientras que en el suero ácido se puede emplear independientemente ambos medios de crecimiento.

En base a los resultados presentados, se obtuvo un valor mayor de población en el medio M-17 en la muestra de suero dulce, debido a que este presentó un valor de pH (6,61) siendo un valor próximo al de la leche cruda.

Por otra parte, en la muestra de suero dulce, hubo mayor cantidad de BAL en el medio de cultivo M-17. La población desarrollada en agar M-17 es menor a 5,01 log (ufc/g) valor obtenido por (Alegría *et al.*, 2009). Mientras en el suero ácido el mayor crecimiento de BAL se obtuvo en el agar MRS cuyo valor es menor a 6,15 log (ufc/g) valor reportado por (Rodríguez, 2007).

4.1.2.- Pre-selección de las colonias de BAL de origen autóctono de los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus* para su caracterización e inoculación en queso madurado

Se seleccionaron placas contentivas de agar M-17 con crecimiento de BAL entre 20-200 ufc/ml (Figura 2A). En la Figura 2B, se puede observar la siembra en el medio de cultivo M-17 al aplicar la técnica de picadura. Tal como se muestra en esta figura se puede notar que hubo crecimiento, siendo suficiente material para realizar las pruebas preliminares (catalasa y Gram).

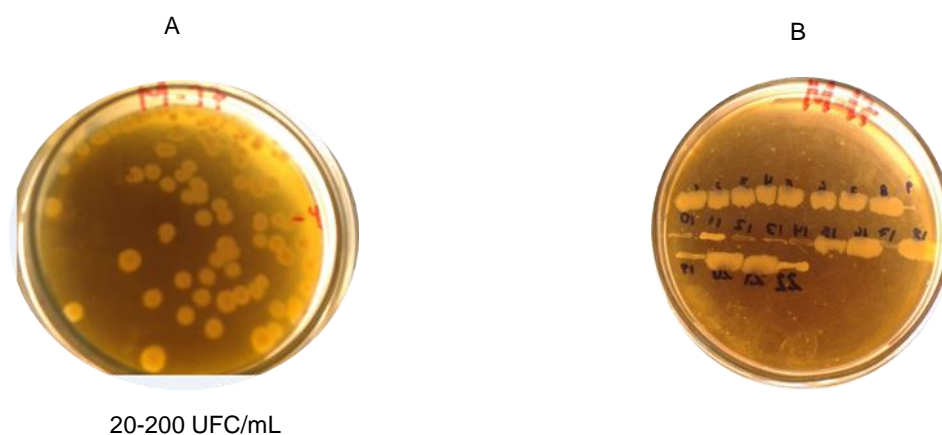


Figura 2. A.- Colonias aisladas del suero-----**B.-** Técnica de picadura de BAL en agar M-17.

En el Cuadro 2, se muestran los resultados obtenidos en la prueba de catalasa y tinción de gram realizados a las BAL seleccionadas al azar.

Cuadro 2. Resultados de las pruebas preliminares.

Colonias	MRS			M-17		
	Catalasa	Gram	Morfología	Catalasa	Gram	Morfología
1	+	-	Cocos	+	-	Cocos
2	-	+	Cocos	+	-	Cocos
3	-	+	Cocos	-	+	Cocos
4	+	-	Cocos	-	+	Cocos
5	+	-	Cocos	-	+	Cocos
%Total	40%	40%	Cocos	60%	60%	Cocos

A partir de la aplicación de técnica de picadura y con el material suficiente se pudo conocer que de las 20 colonias seleccionadas de forma aleatoria, 40% fueron catalasa negativa y cocos Gram positivo en el medio MRS. Por su parte, en el medio M-17 se obtuvo que el 60% fueran catalasa negativa y cocos Gram positivo.

Lo anterior indica que, la recuperación de *Lactococcus* en el medio M-17, fue mucho mayor que en el MRS. Esto se debió a que el medio M-17 es específico para cocos, debido a que es preparado a un pH más básico y eso favorece el crecimiento de cocos.

No hubo recuperación de *lactobacillus* en MRS ni en el suero dulce ni en el suero acidificado.

4.1.3.- Purificación de las colonias de BAL de origen autóctono del genero *Lactococcus* para su caracterización e inoculación en queso madurado

En el Cuadro 3, se muestran los resultados en la fase de purificación de las bacterias ácido lácticas de origen autóctono tanto en caldo infusión cerebro corazón (ICC) como en caldo MRS.

Cuadro 3. Resultados de turbidez de las BAL autóctona

Colonias	Turbidez	
	Caldo ICC*	Caldo MRS
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
%Total	100%	100%

*Caldo ICC: Infusión cerebro corazón

Se observa que un 100% de los tubos, tanto para caldo ICC como caldo MRS hubo la presencia de turbidez, por lo tanto, se pudieron reactivar todas las BAL obtenidas. El alto porcentaje de reactivación indica que el caldo MRS puede ser empleado como caldo de cultivo para recuperar las BAL al igual que el caldo infusión cerebro corazón.

4.1.4.- Caracterización y selección de las BAL autóctonas

a) Curva de crecimiento

La curva de crecimiento de la BAL autóctona aisladas en suero dulce es presentada en la Figura 3.

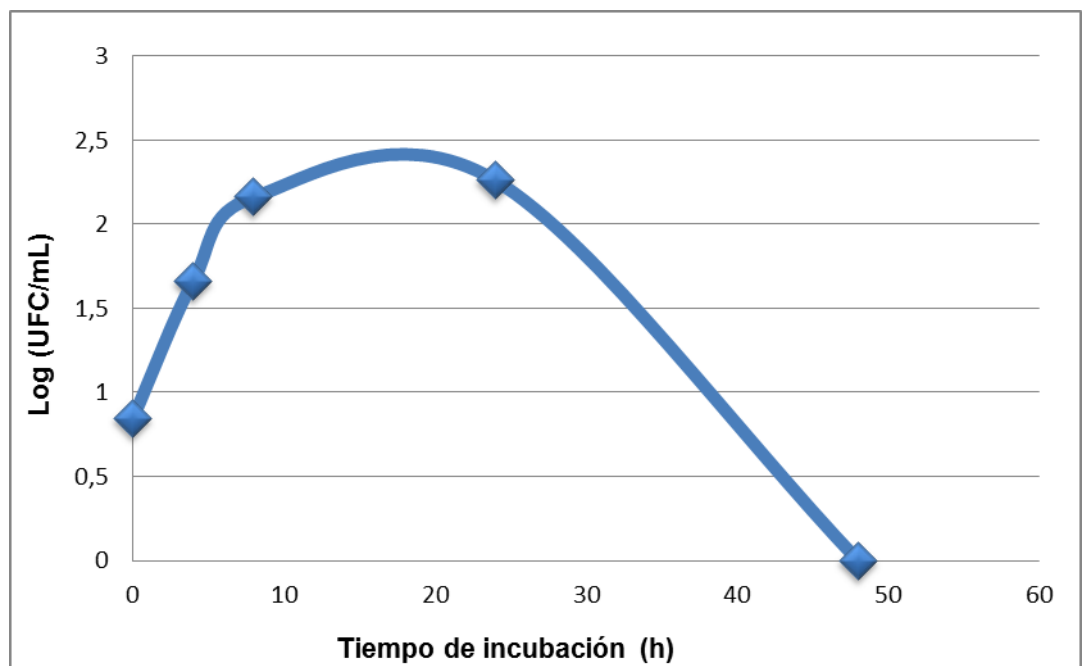


Figura 3. Cinética de crecimiento de la BAL de origen autóctono género *Lactococcus*.

Se puede observar que, las bacteria ácido láctica en estudio presentó un máximo de crecimiento de 2,5 Log ufc/mL a las 20 h de incubación. Este resultado concuerda a lo reportado por Montero *et al* (2009). Por otra parte, la fase decrecimiento se inicia a partir de las 22 horas de incubación. Lo anterior probablemente se deba al agotamiento metabólico ocasionado por la falta de

lactosa en el sustrato de crecimiento, ya que no fue incorporado el 5% de la lactosa que normalmente se agrega para estimular el crecimiento de dichas bacterias.

El comportamiento del pH y la acidez de las BAL de origen autóctono del género *Lactococcus* son presentadas en la Figura 4. Se puede notar que, a medida que incrementa el tiempo de incubación de 0 a 48 horas hay una producción de ácido láctico que va desde 0,20 hasta 0,40%. El incremento de la acidez ocasionó una reducción en el pH de 5,6 a 4,8. Ramos *et al.* (2009), reportaron reducciones del pH de 5,2 a las 24 horas de incubación. Resultados similares fueron encontrados en esta investigación.

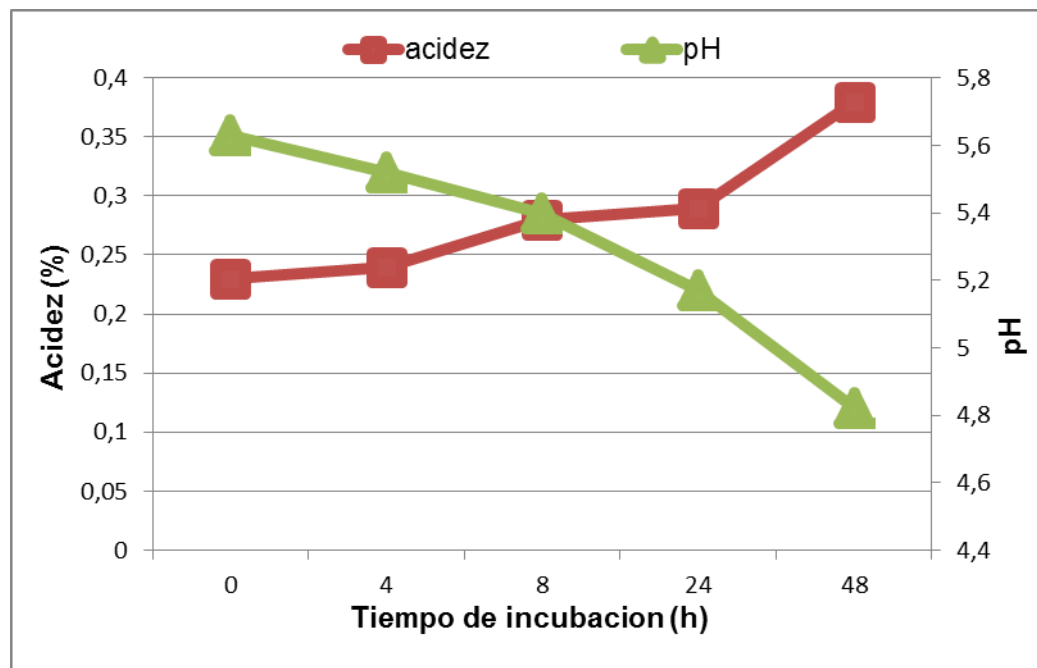


Figura 4. Comportamiento con respecto a la acidez y pH de la BAL autóctona aislada género *Lactococcus*.

En relación a los valores de pH, las BAL autóctona y comercial ocasionaron una reducción del pH a las 48 horas de 4,8 y 3, respectivamente. Esta diferencia podría ser debido a que el fermento comercial presentó una mayor capacidad de producción de ácido láctico, probablemente a que la lactosa no fue en esos casos un sustrato limitante, lo que ocasionó mayor el descenso del pH.

4.2.- COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FISICOQUÍMICA DEL QUESO MADURADO CON FERMENTOS LÁCTICOS OBTENIDOS POR BAL AUTÓCTONAS CON EL QUESO ELABORADO CON EL FERMENTO LÁCTICO COMERCIAL DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

4.2.1. Composición fisicoquímica de queso cheddar elaborado con cultivo láctico autóctono (T1) y queso cheddar fabricado con cultivo láctico liofilizado (T2)

En el Cuadro 4, se presenta los resultados de los componentes fisicoquímicos de ambos tratamientos del queso cheddar elaborado con BAL autóctona y fermento comercial, al primer día de almacenamiento.

4.2.1.1.- Humedad

El resultado del porcentaje de humedad, en el queso cheddar fabricado con fermento de BAL autóctonas (T1) presentó un rango de 36,26 a 36,45%, mientras que el queso elaborado con el fermento comercial (T2) tuvo un valor mínimo 37,34 y un valor máximo de 37,65%. En el análisis estadístico, se evidencia que no se encontró diferencia significativa entre los valores del contenido de humedad en ambos tratamientos, a un nivel de significancia $\alpha=0,05$. Por lo tanto el promedio en ambos tratamientos son comparables.

La clasificación de los quesos en función de humedad mostraron los quesos fabricados (T1 y T2) se ubican como queso duro, debido a que los valores de humedad sin materia grasa (HSMG) obtenidos en los tratamientos evaluados se encuentran en el rango entre 50 a 55% HSMG establecido por la (Norma Covenin 1813, 2000). El queso cheddar se caracteriza por tener un porcentaje máximo de humedad del 39% en base húmeda (Ortakci *et al.*, 2015). Al comparar el valor característico de humedad con el obtenido en esta investigación, se puede notar que está 2 y 3% por debajo de la humedad máxima para queso cheddar. En este sentido es necesario ajustar el control de sinéresis y la presión y tiempo de prensado para lograr el valor máximo sugerido por Codex stand.

Cuadro 4. Características físico-químicas del queso cheddar elaborado con BAL autóctona y fermento comercial. Primer día de almacenamiento (Tiempo = 0 día).

Tratamientos ¹	Humedad		pH	Acidez (Dornic) ⁴	NaCl	
	%Humedad ²	HSMG ³ (%)			bh ⁵	bs ⁶
T1	36,36 ± 0,1037 ^a	50,89 ± 0,77	5,44 ± 9,574E-03 ^a	21,30 ± 0,8124 ^a	1,57 ± 0,11 ^a	2,24 ± 0,50
T2	37,45 ± 0,1440 ^a	54,19 ± 0,53	5,56 ± 0,0465 ^a	20,83 ± 1,0243 ^b	1,38 ± 0,065 ^a	2,21 ± 0,97

1= Queso elaborado con fermento de BAL autóctonas (T1), queso elaborado con fermento liofilizado (T2); 2= %Humedad expresado en base húmeda (bh); 3= %HSMG: % Humedad sin materia grasa; 4= °Dornic: 1mg ácido láctico / 10 mL leche; 5= Base húmeda (bh); 6=Base seca (bs); a-b= Letras en la misma columna significa que hay diferencia significativas ($\alpha=0,05$)

4.2.1.2. pH

El potencial de hidrogeno (pH), para el queso cheddar elaborado con fermento de BAL de origen autóctono (T1) varía entre 5,43 a 5,45. Por su parte el queso cheddar elaborado con el fermento de BAL liofilizado (T2), varía entre 5,51 a 5,62.

Entre los tratamientos evaluados no existe diferencia significativa ($\alpha=0,05$). Los valores promediales obtenidos en ambos tratamientos se encuentran por encima de lo obtenido por McMahon *et al.* (2014), los cuales obtuvieron entre 5,01 a 5,16 a los 7 días de almacenamiento en la investigación sobre queso cheddar inoculado con cultivo láctico de *Lactococcus lactis ssp. Cremoris*.

La diferencia de los valores encontrados de pH entre las muestras de quesos cheddar se debe probablemente al tipo de cultivo láctico utilizado en las fabricaciones.

4.2.1.3. Acidez (°Dornic)

En relación a los valores obtenidos de la acidez expresada en °Dornic, el queso cheddar elaborado con fermento de BAL de origen autóctono (T1) obtuvo un valor mínimo de 20,50°D y un valor máximo de 22,30°D, sin embargo en el queso cheddar elaborado con el fermento de BAL liofilizado (T2) el rango fue de 19,90 a 22,10°D.

Desde el punto de vista estadístico, existe diferencia entre los tratamientos evaluados, al nivel de significancia $\alpha=0,05$. El valor promedio obtenido en el T1 fue de 21,30°D siendo superior a 20,83°D (T2). Esto significa que al inicio del proceso las BAL autóctonas tuvieron mayor actividad que las BAL del fermento comercial.

4.2.1.4. Cloruros de sodio (%NaCl)

En cuanto a la concentración de cloruros de sodio encontrado en el queso cheddar elaborado con fermento de BAL de origen autóctono (T1) mostró un valor mínimo de 1,41 y máximo de 1,67%; pero en el queso cheddar elaborado con el fermento de BAL liofilizado (T2) presentó un rango entre 1,38 y 1,60%.

En los tratamientos evaluados no se encontró diferencias significativas ($p > 0,05$). El promedio obtenido en el T1 fue de 1,57% siendo mayor a 1,38% (T2).

El promedio obtenido en (T1 y T2) de cloruros de sodio en base húmeda se encuentran en el rango (1,21 a 1,69%) obtenidos por Broadbent *et al.* (2013) en queso Cheddar, fabricado con diferentes contenidos de grasa, utilizando *Lactococcus lactis* como cepa iniciadora.

Entre los parámetros fisicoquímicos del queso cheddar, según Codex-263 (1966) establece la humedad máxima (39%) y grasa láctea (48% - 60%). En base a al contenido de humedad obtenido en las muestras, puede inferirse que el queso cheddar fabricado tanto con el fermento de origen autóctono como con el fermento comercial cumple con lo señalado por el Codex Stand.

4.2.2. Características fisicoquímicas del queso cheddar elaborado con fermento de origen autóctono (T1) y queso cheddar elaborado con fermento comercial (T2) durante el período de almacenamiento a 10°C

En los Cuadros 5 y 6, se muestran los resultados de algunas de las características fisicoquímicas obtenidas en los quesos cheddar fabricados con el fermento autóctono (T1) y comercial (T2) durante el tiempo de almacenamiento (60 días).

Cuadro 5. Características fisicoquímicas del queso cheddar elaborado con BAL de origen autóctono (T1) durante el tiempo de almacenamiento a 10 °C

Tiempo (días)	Humedad ¹ (%)	pH	Acidez ² (Dornic)	NaCl ³ (%)
0	36,36 ± 0,10 ^a	5,44 ± 9,574E-03 ^a	21,30 ± 0,81 ^a	1,57 ± 0,11 ^a
30	36,35 ± 0,05 ^a	5,37 ± 0,06 ^a	31,85 ± 1,21 ^a	1,67 ± 0,07 ^a
60	36,28 ± 0,12 ^a	5,25 ± 0,05 ^a	55,05 ± 1,23 ^a	1,62 ± 0,13 ^a

1= % Humedad en base húmeda (bh); 2= Acidez expresada en °Dornic: 1mg ácido láctico / 10 mL leche; 3= %NaCl en base húmeda (bh); a= Letras iguales en una misma columna, significa que no hay diferencia significativa ($\alpha = 0,05$).

Cuadro 6. Características fisicoquímicas del queso cheddar elaborado con fermento láctico comercial (T2) durante el tiempo de almacenamiento a 10 °C

Tiempo (días)	Humedad ¹ (%)	pH	Acidez ² (Dornic)	NaCl ³ (%)
0	37,450 ± 0,1440 ^a	5,5575 ± 0,0465 ^a	20,825 ± 1,0243 ^a	1,3775 ± 0,0645 ^a
30	37,570 ± 0,1122 ^a	5,2650 ± 0,0545 ^a	32,700 ± 1,3491 ^a	1,5700 ± 0,2915 ^a
60	37,425 ± 0,1580 ^a	5,2350 ± 1,000E-02 ^a	43,100 ± 2,0445 ^a	1,6500 ± 0,3163 ^a

1= % Humedad en base húmeda (bh); 2= Acidez expresada en °Dornic: 1mg ácido láctico / 10 mL leche; 3= %NaCl en base húmeda (bh); a= Letras iguales en una misma columna, significa que no hay diferencia significativa ($\alpha=0,05$).

4.2.2.1. Humedad

El comportamiento del contenido de humedad durante el tiempo de almacenamiento (60 días) tanto para el T1 como para T2 es presentado en las Figuras 5 y 6.

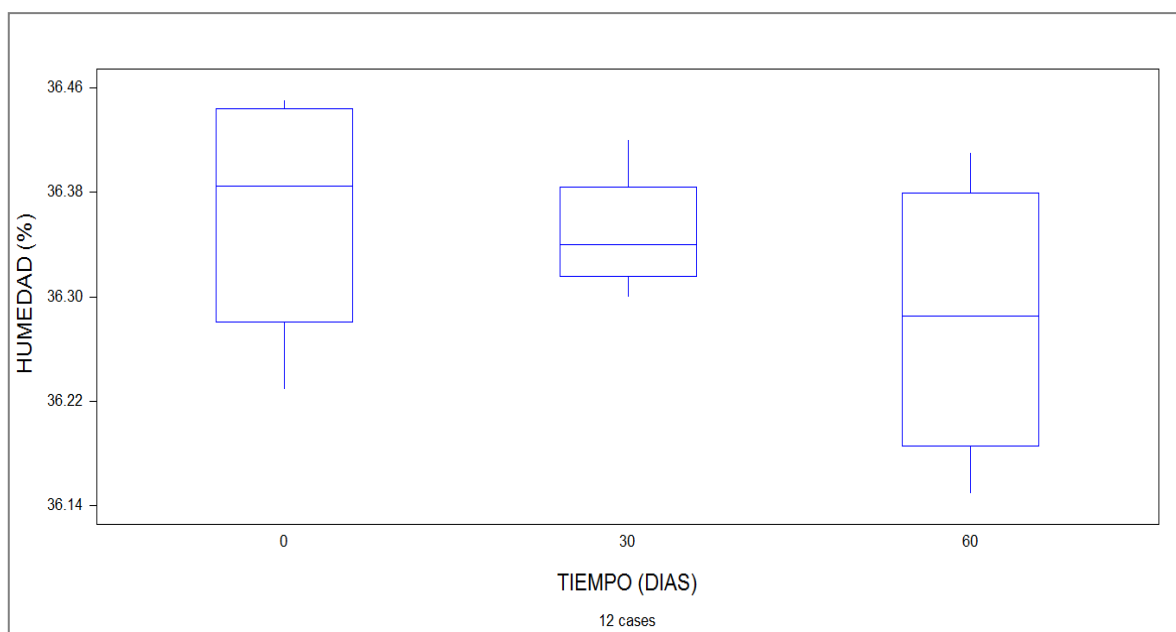


Figura 5. Contenido de Humedad (%) en el T1 durante el período de maduración a 60 días.

Para el tiempo de almacenamiento 60 días en quesos elaborados con fermento autóctono (T1), se puede notar que los valores en el 2^{do} cuartil, son variables y se estabiliza a partir de los 60 días de almacenamiento.

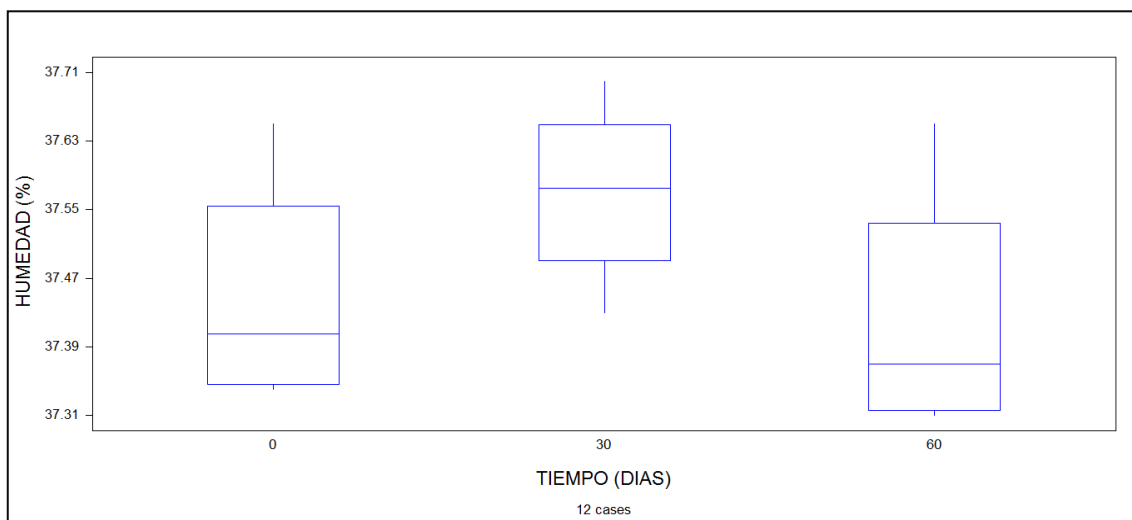


Figura 6. Contenido de Humedad (%) en el T2 durante el periodo de almacenamiento a 60 días.

El contenido de humedad a lo largo del tiempo de maduración del queso elaborado con el fermento comercial (T2), se incrementó a los 30 días de almacenamiento y luego tiende a reducirse a los 60 días, esta oscilación en la mediana no fue significativa desde el punto de vista estadístico a un $\alpha=0,05$.

La humedad adquirida en ambos quesos durante el tiempo de almacenamiento en la cava de maduración, fue constante debido a que las muestras de quesos en ambos tratamientos se empacaron al vacío el cual es la etapa previa a la maduración. El empaque permite que no haya la pérdida de humedad ni transferencia de masa.

4.2.2.2. pH

En las Figuras 7 y 8, se observa el comportamiento del pH durante el tiempo de almacenamiento (60 días) tanto para el T1 como para T2, respectivamente.

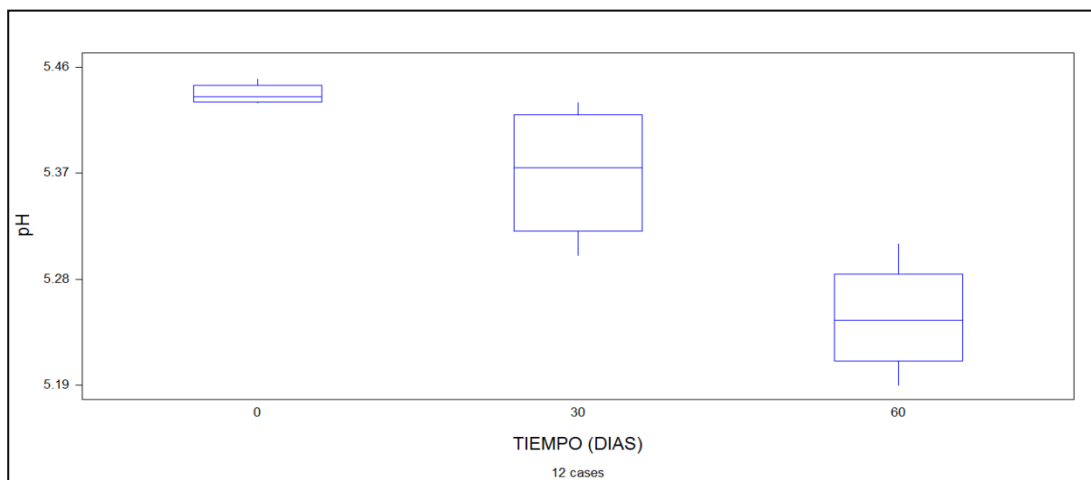


Figura 7. Comportamiento del pH en el T1 durante el almacenamiento a 60 días

El queso elaborado con el fermento autóctono (T1) presentó el valor de 5,44 al inicio de la maduración, disminuyendo paulatinamente durante los 60 días de almacenamiento a pH 5,25. Esta reducción fue significativa desde el punto de vista estadístico ($p < 0,05$).

Este descenso de pH durante el tiempo de maduración del queso cheddar, se explica consecuencia de la fermentación de lactosa en ácido láctico (Ramos *et al.*, 2009).

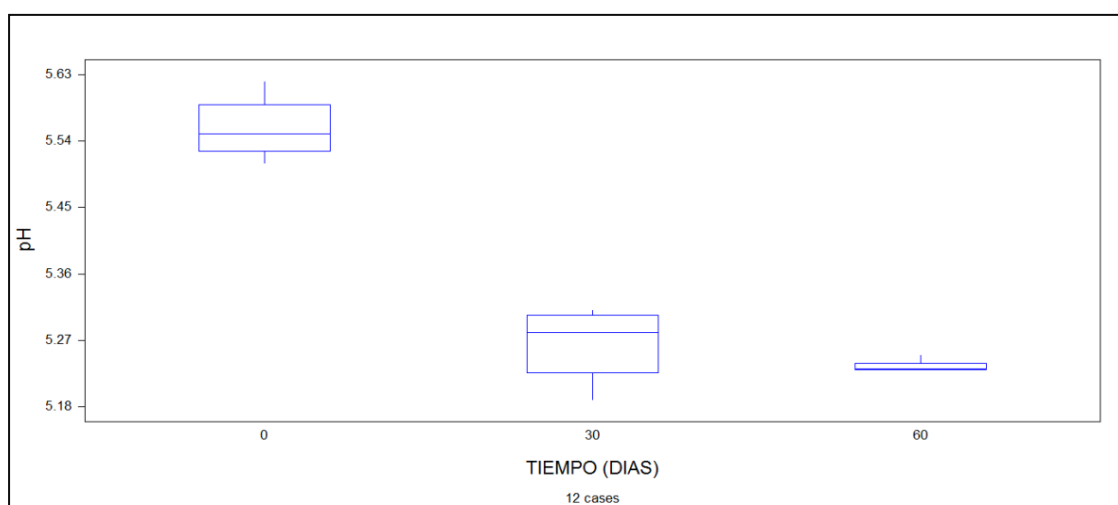


Figura 8. Comportamiento del pH en el T2 durante el almacenamiento a 60 días.

El queso elaborado con el fermento comercial (T2) presentó una reducción rápida del pH en los primeros 30 días de almacenamiento y luego se estabilizó a los 60 días.

Desde el punto de vista del análisis estadístico se encontró diferencia significativa ($P < 0,05$) debido a que la disminución de pH se atribuye a la actividad desarrollada por la cepa añadida convirtiendo la lactosa en ácido láctico, proceso que tiene lugar desde el momento de la inoculación, durante la maduración y posterior almacenamiento de los quesos.

4.2.2.3. Acidez (°Dornic)

En las Figuras 9 y 10, se puede observar el comportamiento de la acidez expresada en °Dornic durante el tiempo de almacenamiento (60 días) tanto para el queso elaborado con el fermento autóctono (T1) como para el queso elaborado con el fermento comercial (T2).

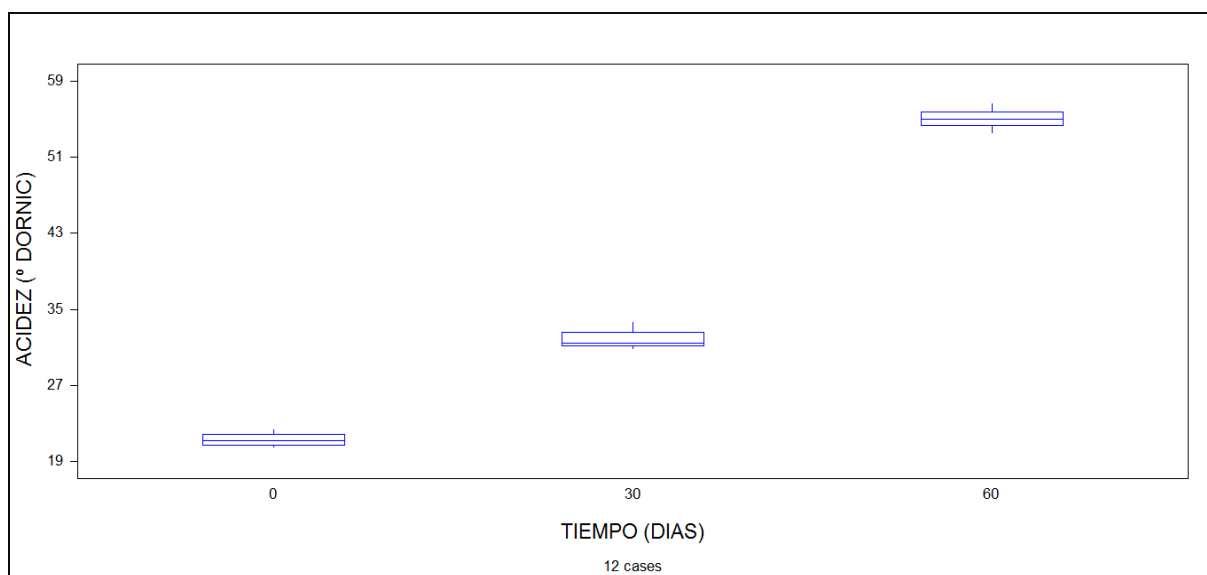


Figura 9. Comportamiento de la acidez (°Dornic) en el T1 durante la maduración a 60 días.

La acidez se incrementó con respecto al tiempo de maduración del queso cheddar elaborado con el fermento autóctono (T1), por lo que se encontró diferencia significativa a un $\alpha=0,05$. Este comportamiento presentado en el T1 se debe a la actividad del cultivo generando el incremento en la acidez (Angulo, 2005).

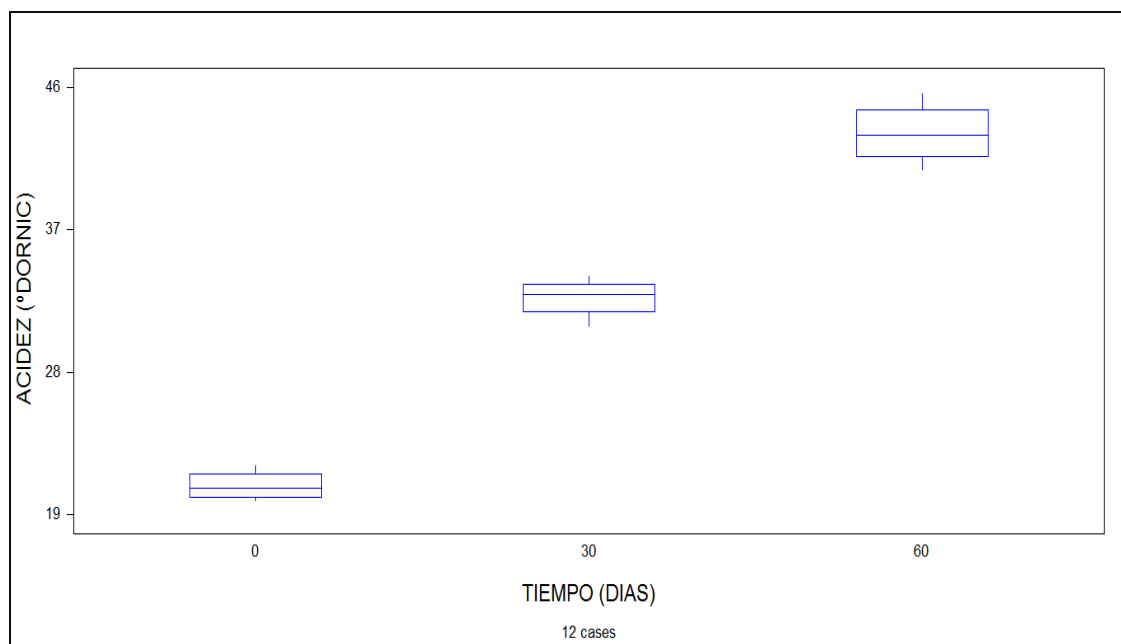


Figura 10. Comportamiento de la acidez (°Dornic) en el T2 en el tiempo de almacenamiento 60 días.

En la Figura 10 se puede observar el comportamiento de la acidez en T2, expresada en °Dornic, la cual aumentó proporcionalmente durante el periodo de almacenamiento del queso cheddar, este incremento fue significativo ($p<0,05$).

El aumento equitativo de la acidez durante el tiempo de maduración del queso, se debe a lo inferido por Piña (2012), en donde señala que la acidez se acrecienta con la adición del inóculo en la materia prima.

4.2.2.4. Cloruros de sodio (%NaCl)

En las Figuras 11 y 12 se muestra el comportamiento de la concentración de cloruros de sodio (NaCl) expresados en porcentaje tanto para el queso elaborado con BAL autóctonas (T1) y como para el queso elaborado con BAL comercial (T2).

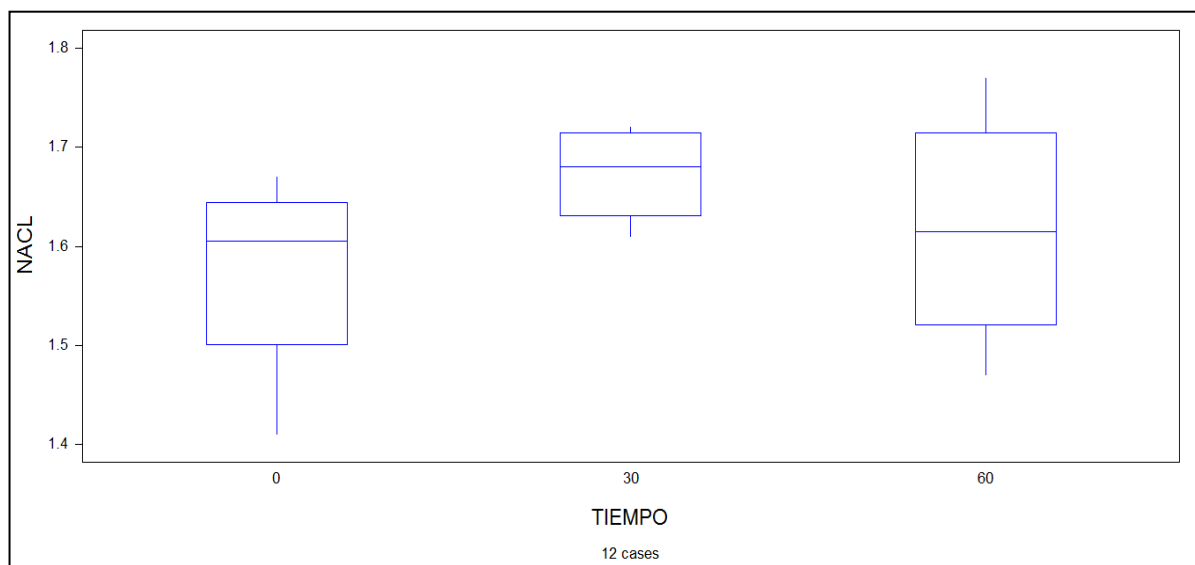


Figura 11. Comportamiento de %NaCl en el T1 durante el tiempo de maduración a 60 días

En la Figura 11, puede observarse que la cantidad de cloruros de sodio fue constante mientras el queso permanecía en la cava de maduración en 60 días. Los resultados oscilan entre 1,57 a 1,62% encontrándose fuera del rango de 1,10 a 1,48% obtenidos por Broadbent *et al.* (2013) en queso cheddar inoculado con *Lactococcus lactis* y con un tiempo de maduración de 9 meses.

El comportamiento del %NaCl presentado para el T1 durante el tiempo de maduración no fue significativo ($P > 0,05$), debido a que existe relación directa entre la presencia de cloruros y la humedad del queso permanece constante, también los sólidos son constantes.

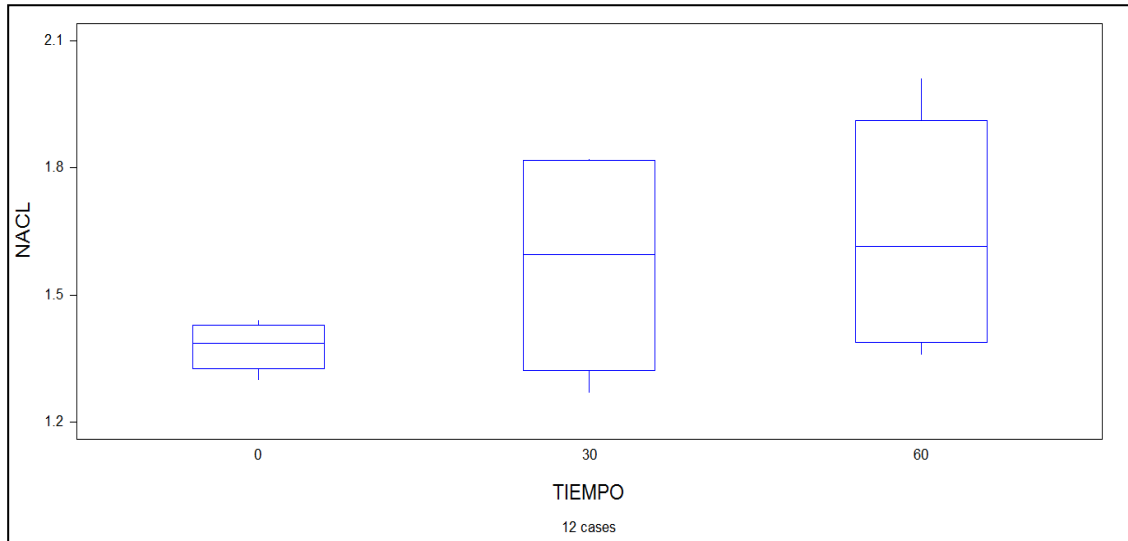


Figura 12. Comportamiento de %NaCl en el T2 durante el tiempo de maduración a 60 días

En la Figura 12, se puede observar que la cantidad de cloruros de sodio (%NaCl) fue constante durante el período de maduración, cuyos valores oscilan entre 1,38 a 1,65% siendo valores inferiores al rango de 1,78 a 1,93% siendo estos mayoría a los encontrados en este trabajo de investigación por Ortakci *et al.* (2015) de queso cheddar inoculado con *Streptococcus thermophilus* y período de maduración de 6 meses.

Este comportamiento de %NaCl encontrado en el queso elaborado con fermento comercial fue constante por lo que no es significativo ($P > 0,05$) Angulo (2005), la sal interviene en la etapa de contracción del coágulo.

El contenido de sal controla la actividad de los cultivos iniciadores o starters, que continua después de la salazón. En el caso del queso Cheddar, los niveles de sal son entre 4 – 6%, dado que más de 6% de sal en humedad inhibe la actividad de la mayoría de las bacterias iniciadoras, por lo que se recomienda ajustar el porcentaje en la fase de salado a nivel de tina e incrementar su concentración.

Se infiere que los quesos cheddar inoculado con los fermentos autóctono y comercial presentan solo comportamiento diferente en los parámetros de pH y acidez.

4.3.- CUANTIFICACIÓN LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS AUTÓCTONAS EN EL QUESO MADURADO CON BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS COMERCIALES DURANTE EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

A continuación se muestra en las Figuras 13 y 14 la cinética del comportamiento representado tanto por el fermento constituido por BAL autóctonas (T1) como por el fermento comercial (T2).

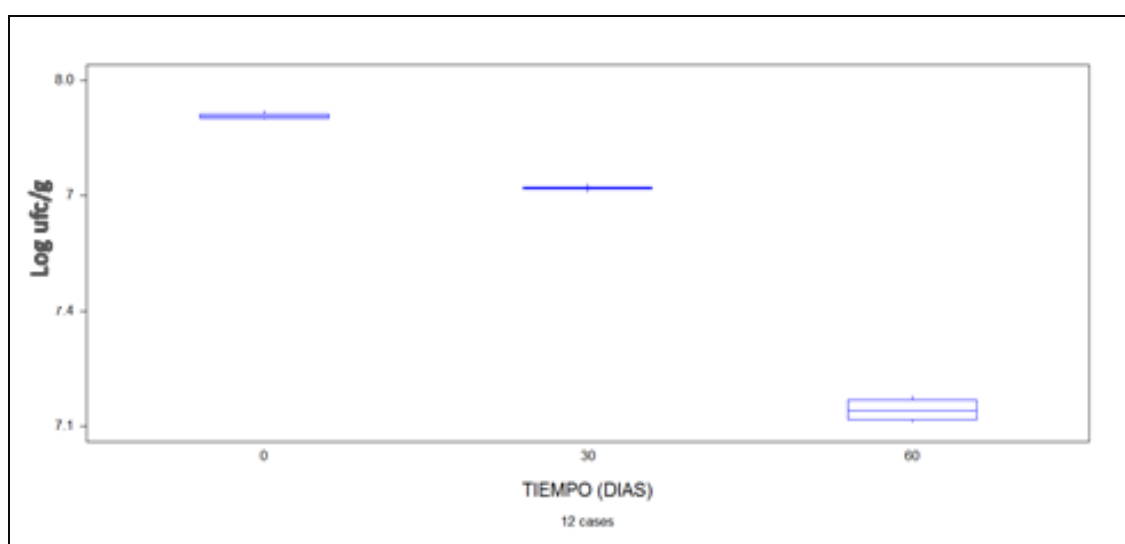


Figura 13. Cinética de crecimiento de la BAL autóctona inoculado en el queso cheddar (T1)

En la Figura 13, se observa el crecimiento de la población de las BAL (T1) obtenidas cuyo valor inicial fue 7,9 expresado en forma de log (ufc/g) luego disminuyó hasta alcanzar el valor de 7,1 expresado en log (ucf/g) al finalizar la maduración del queso cheddar. Es decir, durante el tiempo de almacenamiento la población de BAL de origen autóctonas fue disminuyendo probablemente por la ausencia de la lactosa y de otros nutrientes necesarios para su crecimiento.

A los 60 días de almacenamiento la población de BAL fue de 7,1 log (ucf/g) siendo mayor a 3 log (ucf/g) valor reportado por McMahon *et al.* (2014) en su investigación acerca del queso elaborado con el cultivo iniciador *Lactococcus lactis ssp. cremoris*.

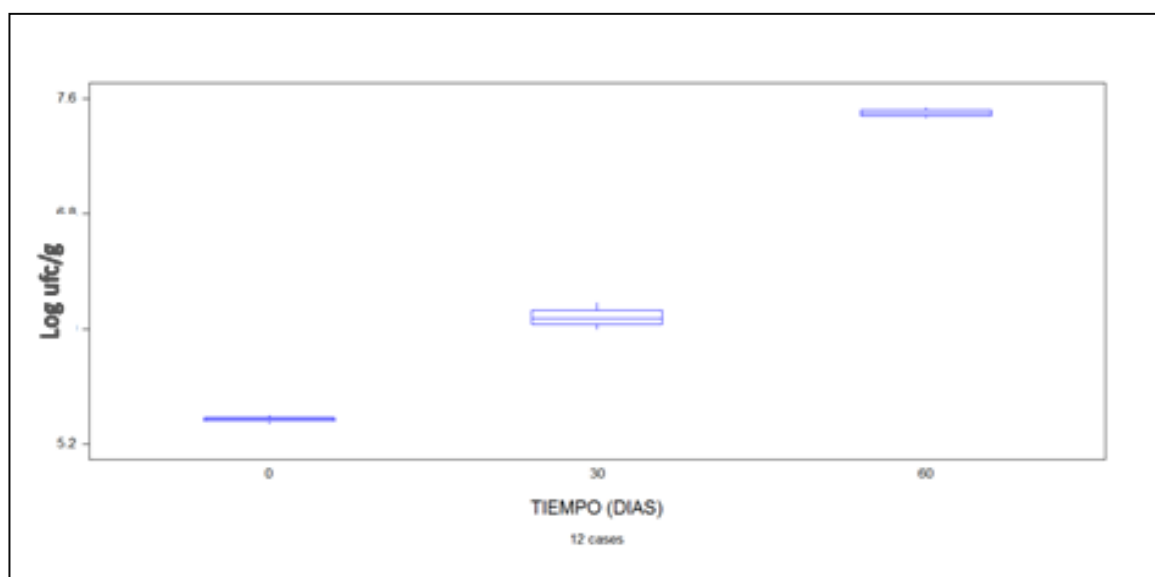


Figura 14. Cinética de crecimiento de la BAL comercial inoculada en el queso cheddar (T2)

En la Figura 14, se muestra el desempeño de la BAL durante el tiempo de almacenamiento. La población cuantificada en el primer día de almacenamiento fue de 5,4 expresada en forma de log (ucf/g) incrementándose la población hasta el valor de 7,5 expresado en log (ucf/g) al culminar el período de maduración del queso cheddar. Es probable que el incremento de la población de BAL comercial se deba a la existencia de cantidades suficientes de nutrimentos requeridos para su crecimiento.

La población obtenida del fermento comercial a los 60 días de maduración fue 7,5 log (ucf/g) siendo mayor a 7,3 log (ucf/g) valor encontrado por (Broadbent *et al.*, 2013).

Este comportamiento exponencial de BAL liofilizada es similar al mostrado por Piña (2012), en su estudio sobre queso inoculado por *Lactococcus lactis* como cultivo protector.

La diferencia encontrada en la cinética de crecimiento representado por la bacteria ácido láctica autóctona y comercial es probable al tipo de fermento del que proviene además de la cantidad de nutrientes existente en las muestras de quesos cheddar.

4.4.- CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES SENSORIALES EN EL QUESO MADURADO CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AUTÓCTONAS A FIN DE COMPARARLOS CON LOS QUESOS ELABORADOS CON FERMENTOS LÁCTICOS COMERCIALES

4.4.1. Sabor

Es uno de los atributos organolépticos más importantes en el queso (Angulo, 2005), por esto se consideró como parte de la evaluación sensorial para ambos tratamientos.

En el cuadro 7 se presentan los resultados obtenidos del atributo sensorial sabor.

Cuadro 7. Respuestas concordantes obtenidas en función al atributo sensorial sabor evaluado en los quesos cheddar elaborado con BAL autóctona (T1) y comercial (T2)

Muestras	Respuestas concordantes	Respuestas rechazadas
T1	38 ^a	42 ^a
T2	42 ^a	38 ^a

T1= Muestra de queso elaborado con el fermento de BAL autóctonas; T2= Muestra de queso elaborado con el fermento de BAL comercial; a= letras en una misma columna, significa que no existe diferencia significativa ($\alpha=0,05$).

Se observa que de acuerdo al número de respuestas concordantes, el queso elaborado con el fermento de BAL comercial (T2) tuvo mayor grado de preferencia que el queso elaborado con el fermento comercial (T1). Sin

embargo, la prueba de chi-cuadrado demuestra que no hubo diferencias significativas ($p>0,05$).

Se infiere que los panelistas tipo consumidor no detectaron diferencias en el sabor entre los tratamientos. Por lo tanto ambos son igualmente preferidos en cuanto a este atributo sensorial evaluado.

4.4.2. Acidez

En el cuadro 8 se presentan los resultados obtenidos del atributo sensorial acidez.

Cuadro 8. Respuestas de los consumidores en función al atributo sensorial acidez evaluada en los quesos cheddar elaborado con BAL autóctona (T1) y comercial (T2)

Muestras	Respuestas concordantes	Respuestas rechazadas
T1	40 ^a	40 ^a
T2	40 ^a	40 ^a

T1= Muestra de queso elaborado con el fermento de BAL autóctonas; T2= Muestra de queso elaborado con el fermento de BAL comercial; a= letras en una misma columna, significa que no existe diferencia significativa ($\alpha=0,05$).

En el cuadro 8 puede observarse que el número de respuestas concordantes en ambos tratamientos fueron iguales. Este resultado es corroborado por el análisis estadístico, el cual indica que no existen diferencias ($p>0,05$) entre los tratamientos evaluados.

Se infiere que los panelistas tipo consumidor no detectaron diferencias en cuanto a la acidez entre los tratamientos. Por lo tanto ambos son igualmente preferidos en cuanto a este atributo sensorial evaluado.

4.4.3. Salinidad

En el cuadro 9 se muestran los resultados conseguidos en el atributo sensorial salinidad.

Cuadro 9. Respuestas de los consumidores en función al atributo sensorial salinidad evaluada en los quesos cheddar elaborado con BAL autóctona (T1) y comercial (T2)

Muestras	Respuestas concordantes	Respuestas rechazadas
T1	40 ^a	40 ^a
T2	40 ^a	40 ^a

T1= Muestra de queso elaborado con el fermento de BAL autóctonas; T2= Muestra de queso elaborado con el fermento de BAL comercial; a= letras en una misma columna, significa que no existe diferencia significativa ($\alpha=0,05$)

4.4.4. Preferencia global

En el cuadro 10, se muestran los resultados conseguidos en la preferencia global en las muestras de queso cheddar madurado.

Cuadro 10. Respuestas de los consumidores en función a la preferencia global evaluada en los quesos cheddar elaborado con BAL autóctona (T1) y comercial (T2)

Muestras	Respuestas concordantes	Respuestas rechazadas
T1	38 ^a	42 ^a
T2	42 ^a	38 ^a

T1= Muestra de queso elaborado con el fermento de BAL autóctonas; T2= Muestra de queso elaborado con el fermento de BAL comercial; a= letras en una misma columna, significa que no existe diferencia significativa ($\alpha=0,05$).

En el cuadro 10 se observa que la muestra de queso elaborado con el fermento de BAL autóctona presentó menor número de respuestas concordantes Sin embargo, la prueba estadística señala que no hubo diferencia significativa ($p>0,05$).

Se infiere que los panelistas tipo consumidor no detectaron diferencias entre los atributos sensoriales característicos en las muestras de quesos presentadas. Por lo tanto, los panelistas prefirieron a ambos tratamientos.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ❖ Las bacterias ácido lácticas (BAL) autóctonas provenientes del suero de quesería fueron en un 100% del género *Lactococcus*. Las BAL obtenidas presentaron una curva de crecimiento de 48 horas, con una cinética de crecimiento máxima las primeras 22 horas de incubación.

- ❖ La incubación de fermento láctico proveniente de BAL autóctonas no alteró la composición química del queso cheddar obteniéndose quesos con humedades por debajo del 39% y de consistencia dura. El fermento láctico de BAL autóctonas redujeron el pH e incrementaron la acidez a niveles comparables con respecto al fermento láctico comercial, logrando de manera exitosa el proceso de cheddarización de la cuajada.

- ❖ Los atributos sensoriales sabor, acidez, salinidad y preferencia global en el queso cheddar elaborado con fermentos lácticos autóctonos fueron comparables en cuanto al grado de preferencia en una población de panelista tipo consumidor, con respecto al queso cheddar fabricado con cultivos iniciadores comerciales.

RECOMENDACIONES

- ❖ Se sugiere incluir el cultivo láctico de origen autóctono en el esquema tecnológico para el proceso de elaboración de queso madurado, con un tiempo de maduración mayor a 60 días.
- ❖ Se propone estudiar el efecto sensorial de las BAL autóctonas en otros tipos de quesos madurados.
- ❖ Se sugiere describir las BAL presentes en el fermento láctico tipo líquido.
- ❖ Se alude la evaluación del método de conservación adecuado para cultivo láctico líquido.
- ❖ Se apunta determinar el tiempo óptimo de maduración en queso madurado inoculado con bacteria ácido láctica de origen autóctono.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alegría. A.; P. Álvarez.; N. Sacristán.; E. Fernández.; S. Delgado.; B. Mayo. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*. 136:44-51.

Alegría, A. 2013. Caracterización microbiológica de productos lácteos tradicionales para el diseño de cultivos iniciadores. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. Oviedo, España. 223p.

Angulo, C. 2005. Factibilidad de producción y estudio de rendimiento de queso chanco con incorporación de suero en polvo. Tesis de postgrado. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 162p.

Amorocho, C. 2011. Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja guirra. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València. Valencia, España. 267p.

Bon, F. 1990. Conservación de suero de leche. Desarrollo de un proceso de factores combinados. *Revista Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 1(1):13-15.

Broadbent, J.; C. Brighton.; D. McMahon.; N. Farkye.; M. Johnson.; J. Steele. 2013. Microbiology of Cheddar cheese made with different fat contents using a *Lactococcus lactis* single-strain starter. *Journal of Dairy Science* 96 (7): 4212–4222

Canavos, G. 1988. Probabilidad y estadística; Aplicaciones y métodos. 1era edición. Naucalpan de Juárez, México, McGraw-Hill. 377p.

CODEX-STANDARD 283. 1978. Norma general del codex para quesos. 2ª ed. 5 p.

CODEX-STANDARD 289. 1995. Norma del codex para sueros en polvo. 2ª ed. 4 p.

CODEX-STANDARD 263. 1966. Norma del codex para el cheddar. 1^{er} ed. 5 p.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1979. Norma venezolana COVENIN: 1315-79. Alimentos. Determinación del pH (acidez iónica). Fondonorma, Caracas, Venezuela. 7 p.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1982. Norma venezolana COVENIN: 369-82. Leche y sus derivados. Determinación de cloruros. Fondonorma, Caracas, Venezuela. 17 p.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1989. Norma venezolana COVENIN: 1126-89. Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Fondonorma, Caracas, Venezuela. 11p.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1993. Norma venezolana COVENIN: 903-93. Leche cruda. Fondonorma, Caracas, Venezuela. 5 p.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1997. Norma venezolana COVENIN: 658- 97. Leche y sus derivados. Determinación de la acidez titulable. Fondonorma, Caracas, Venezuela. 5 p.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1997. Norma venezolana COVENIN: 1077. Leche y sus derivados. Determinación de humedad. Fondonorma, Caracas, Venezuela. 5 p.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 2000. Norma venezolana COVENIN: 1813-2000. Quesos. Fondonorma, Caracas, Venezuela. 8 p.

Flores, R. 2012. Caracterización de la microbiota asociada al queso Cotija. Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional. Reynosa, México. 153 p.

Hernández, R. 2013. Caracterización fisicoquímica de un producto tipo cajeta elaborado a partir del suero dulce de quesería. Trabajo de pregrado. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana. Xalapa, México. 94 p.

Latorre, I. 2011. Caracterización bioquímica y tecnológica de cepas ácido lácticas aisladas de leche cruda de oveja en el proceso de elaboración de queso artesano de Teruel. Trabajo de maestría. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Aragón, España. 66 p.

Maldonado, R. 2014. Tecnología, calidad y dinámica de crecimiento y control de patógenos *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* Mediante el uso de cultivos iniciadores en los quesos de pasta hilada tipo telita. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 176p.

Mazzeo, M.; F. Díaz.; L. Pérez.; L. León.; A. Castaño.; A. Jaramillo. 2009. Desarrollo de procesos productivos de quesos madurados en tres municipios del departamento de Caldas. *Revista Ingeniería e Investigación* 29(3):42-47.

McMahon, D.; C. Oberg.; M. Drake.; N. Farkye.; L. Moyes.; M. Arnold.; B. Ganesan.; J. Steele.; J. Broadbent. 2014. Effect of sodium, potassium, magnesium, and calcium salt cations on pH, proteolysis, organic acids, and microbial populations during storage of full-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 97 (8): 4780-4798.

Montero. M.; F. Juárez.; H. García. 2009. Suero de leche fermentado con lactobacilos para la alimentación de becerros en el trópico. *Agrociencia*. 43(6): 585-593.

Morais, J. 2004. Estudio de adecuación de cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja guirra para la elaboración de queso. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España. 134p.

Olivera, J. 2011. Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche. Trabajo de pregrado. Facultad de Agronomía, Universidad de la República Uruguay. Montevideo, Uruguay. 45p.

Ortakci, F.; J. Broadbent.; C. Oberg.; D. McMahon. 2015. Growth and gas formation by *Lactobacillus wasatchensis*, a novel obligatory heterofermentative nonstarter lactic acid bacterium, in Cheddar-style cheese made using a *Streptococcus thermophilus* starter. *Journal of Dairy Science*. (98):7473–7482.

Parra, R. 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 8(1):93-105.

Piña. M. 2012. Producción de compuestos volátiles y evaluación sensorial de queso tipo panela incorporado con *Lactococcus lactis* UQ2 rif L* como cultivo protector. Tesis de maestría. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. 103p.

Ramos, B.; A. Bucio.; C. Bautista.; E. Aranda.; F. Izquierdo. 2009. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Revista Universidad y Ciencia*. 25 (2):159-171.

Recinos y Saz, 2006. Caracterización del suero lácteo y diagnóstico de alternativas de sus usos potenciales en el Salvador. Trabajo de pregrado. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador. 188p.

Rodríguez, G. 2007. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá). Trabajo de pregrado. Facultad de Zootecnia, Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia. 80 p.

Sánchez, J. 2005. Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: Actividad metabólica y producción de exopolisacáridos. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. Villaviciosa, España. 139 p.

Soto, A. 2013. Determinación de factores que influyen en la absorción de sal en la elaboración de queso gauda en planta procesadora de alimentos watt`s alimentos. Trabajo de pregrado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 70 p.

Stone, H.; J. Sidel. 1993. Sensory Evaluation Practices. 2nd ed. Academic Press. San Diego, CA. 338p.

Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). 2015. Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería Programa de Ingeniería de Alimentos. Disponible en: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/211613/Modulo_zip/index.html. [Consultado: 4 Octubre 2015]

Valdemar, M. 2012. Tipos de quesos que se consumen en el centro del país. Trabajo de pregrado. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro“. Coahuila, México. 66 p.

Walstra, P.; T. Geurts.; A. Noomen.; A. Jellema.; M. van Boekel. 1999. Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes. Marcel Dekker, Inc. New York, NY. 727pp