

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DOS CULTIVOS CON *LACTOCOCCUS LACTIS* subsp. *LACTIS* SOBRE CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE QUESO DE CABRA

por

Alejandra BORGES DUARTE^o
Sandra VERA CABRERA^o



TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección, Control y Tecnología de los Alimentos de origen animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2012



Tesis de grado aprobada por:

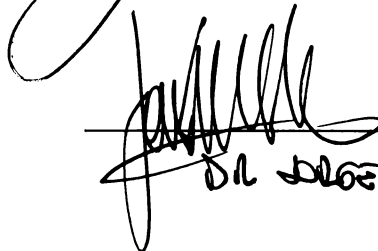
Presidente de mesa:


CRISTINA LOPEZ

Segundo miembro (Tutor):


Dra. Silvana Carro

Tercer miembro:


Dr. Jorge Fernandez

Cuarto miembro (Co-tutor):

Dr. Ariel Aldrovandi

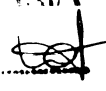
Fecha:

28/03/2012

Autores:


Alejandra Borges Duarte

Sandra Vera Cabrera

FA
Aprobada por 12 (doce) 
V. RIA

AGRADECIMIENTOS

Integrantes del Panel de Evaluación Sensorial de la Facultad de Veterinaria por el tiempo cedido para este trabajo.

Empresa Imporex S.A. y Establecimiento "La Chacra" por el aporte de los cultivos. Al Dr. Pablo Zunino y a los Lic. Karen Perelmutter y Martín Fraga del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), donde se realizó el estudio de inhibición *in vitro* frente a *E.coli*.

Al Laboratorio Beltrán-Zunino por el aporte de la cepa de *Listeria innocua* de origen alimentario.

Al Dr. Ricardo Méndez Algorta quien contribuyó con la leche de cabra para elaboración de los quesos.

A la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEC), Facultad de Veterinaria Universidad de la República quien financió este proyecto.

A los Departamentos: de Ciencia y Tecnología de la Leche y de Calidad Agroalimentaria, donde se desarrolló este ensayo experimental.

A nuestras familias, amigos y compañeros de Facultad, por su apoyo constante en todo momento, a lo largo de la carrera.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8
Bacterias ácido lácticas (BAL).....	8
Productos de leche de cabra.....	10
Caracterización de queso de cabra.....	11
Técnicas sensoriales descriptivas.....	11
OBJETIVOS	13
Objetivo General	13
Objetivos Específicos	13
HIPÓTESIS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Localización	14
Determinación de la dosis de cultivos a aplicar.....	14
Actividad anti <i>E.coli in vitro</i> de los cultivos	14
Elaboración de queso a escala laboratorio	14
Diseño experimental	16
Control de inocuidad de los quesos	16
Actividad antilisterial.....	16
Comparación de los cultivos sobre las características sensoriales de queso de cabra	16
Análisis Estadístico	18
Datos microbiológicos.....	18
Datos sensoriales	18
RESULTADOS	19
Actividad anti <i>E.coli in vitro</i> de los cultivos	19
Control de pasteurización	19
Control de actividad de los cultivos durante la elaboración.....	19
Control de inocuidad de los quesos	20
Actividad antilisterial.....	20
Comparación de los cultivos sobre las características sensoriales de queso de cabra	21
DISCUSIÓN	25
Actividad anti <i>E.coli in vitro</i> de los cultivos	25
Control de inocuidad de los quesos	25
Actividad antilisterial.....	26
Comparación de los cultivos sobre las características sensoriales de queso de cabra	26
CONCLUSIONES.....	27
REFLEXIONES FINALES	27
BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXOS	32
Anexo A. Requisitos microbiológicos para quesos de muy alta humedad con muy numerosas bacterias lácticas en forma viable.....	32
Anexo B. Instructivo para Evaluación Sensorial.....	33

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro I: Valores de pH y Acidez (°D) de T0, T1 y T2 a lo largo de la elaboración de los quesos.	19
Cuadro II: Número Más Probable (NMP) de Coliformes totales (37°C) y Coliformes termotolerantes ($44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$).	20
Cuadro III: Registro de acidez Dörníc y recuento de BAL en agar MRS.	20
Cuadro IV: Valores medios de las variables analizadas.	22
Figura 1: Flujograma de elaboración del queso de muy alta humedad	15
Figura 2: Formulario de evaluación sensorial para queso de cabra de muy alta humedad.....	17
Figura 3: Actividad antimicrobiana frente a <i>E. coli</i>	19
Figura 4: Representación en tela araña de las características sensoriales evaluadas en los quesos de los diferentes tratamientos (T1 y T2).	21
Figura 5: Análisis de componentes principales (PCA) de las once variables estudiadas.....	23

RESUMEN

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), contribuyen a extender la vida útil microbiológica y sensorial de los productos fermentados inhibiendo microorganismos alterantes y patógenos, debido, entre otros factores, a la producción de bacteriocinas, sustancias con actividad antimicrobiana. El objetivo de este trabajo fue comparar la eficacia de dos cultivos con capacidad bacteriocinogénica en la elaboración de queso de cabra de muy alta humedad. Para esto se utilizó un diseño experimental con dos tratamientos experimentales: T1 (agregado de cultivo FD-DVS R-708®: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), T2 (agregado de cultivo biopreservador CGM-3-BC®: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) y un tercer tratamiento como control (sin agregado de cultivo). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado siguiendo el mismo proceso de elaboración. Se evaluaron la capacidad antimicrobiana (*in vitro* y en queso de cabra) frente a potenciales patógenos (*E. coli* y *Listeria innocua*) y los efectos sobre las características sensoriales de los quesos. Ambos tratamientos mostraron un poder inhibitorio semejante y sin embargo presentaron diferencias en sus características sensoriales.

SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) contribute to extending the microbiological and sensory shelf life of fermented products inhibit spoilage and pathogenic microorganisms, due inter alia to the production of bacteriocins, antimicrobial active substances. The main purpose is to compare the efficiency in the elaborating process of goat cheese using. For this we use an experimental design with two treatments: T1 (added culture FD-DVS R-708 ®: *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), T2 (added culture biopreservador CGM-3-BC ®: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) and a third treatment as a control (no added culture), all tests were performed in duplicate following the same process.

Antimicrobial capacity was evaluated (*in vitro* and goat cheese) against potential pathogens (*E. coli* and *Listeria innocua*) and the effects on the sensory characteristics of cheeses. Both treatments showed a similar inhibitory power and yet differed in their sensory characteristics.

INTRODUCCIÓN

Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL y los productos de su metabolismo han estado presentes en la alimentación del hombre desde hace siglos, ya que se encuentran en productos de leches fermentadas como yogurt, quesos madurados, productos cárnicos y hasta en algunas hortalizas. Metchnikoff hace más de un siglo comprobó el efecto benéfico en la salud por el consumo de leches fermentadas (Mateos, 2002).

En contraposición con los aditivos químicos, el empleo de las bacterias lácticas en la conservación de los alimentos tiene gran aceptabilidad entre los consumidores. La conservación de los alimentos por el efecto antagonista microbiano (antibiosis) resulta una alternativa atractiva al uso de los mismos. En este sentido, la "bioconservación" se define como la prolongación de la vida útil e incremento de la seguridad sanitaria de los alimentos mediante la microflora natural o sus metabolitos (Holzapfel y col., 1995; Aymerich y Hugas, 1998; Hammes y Hertel, 1998; Devlieghere y col., 2004). Muchos investigadores consideran que las bacterias lácticas son candidatos idóneos para formar parte de cultivos bioprotectores e, incluso, algunos han llegado a definir la bioconservación como "el empleo de bacterias lácticas, sus productos metabólicos o ambos para mejorar la calidad de los alimentos" (Cintas y col., 1997; Aymerich y Hugas, 1998; Devlieghere y col., 2004; Rodríguez y col., 2005).

Además de que las BAL proporcionan sabor y textura e incrementan el valor nutricional de los alimentos, desde hace décadas se utilizan como bioconservadores debido a la producción de bacteriocinas y otras sustancias, que ejercen acción antibacteriana, contribuyendo a la inocuidad y extender la vida útil de los mismos (Campos, 2002).

La tendencia actual en la industria alimentaria es la reducción del uso de aditivos químicos y la producción de alimentos mínimamente procesados, asociados a metabolitos naturales de bacterias específicas que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (O'Sullivan y col., 2002). Esto se debe entre otros factores, a la producción de sustancias con actividad antimicrobiana, particularmente las bacteriocinas. A su vez la producción de ácidos orgánicos (fundamentalmente ácido láctico), derivada de la fermentación de carbohidratos presentes en alimentos y la consecuente disminución del pH, es el principal factor en el que se basa la actividad antimicrobiana de las BAL, las que además tienen capacidad de producir sustancias inhibitorias tales como: peróxido de hidrógeno, diacetil, metabolitos de oxígeno e inclusive bacteriocinas (Rodríguez y col., 2000; Carr y col., 2002; Carro y col., 2005).

Las BAL contribuyen a la adecuada calidad higiénica de los alimentos fermentados mediante diversos mecanismos de antagonismo microbiano, como la competencia por los nutrientes presentes en el sustrato y la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana, entre los que se encuentran las bacteriocinas, que son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal. El espectro de acción antimicrobiana de algunas bacteriocinas de las bacterias lácticas es amplio e incluye microorganismos patógenos y/o alterantes de los alimentos, tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum* (Cleveland y col., 2001; Guirra y Buys, 2005).

La inocuidad de las bacteriocinas de las bacterias lácticas que, seguramente, han sido y son consumidas (junto con las bacterias productoras) a través de los



alimentos fermentados, unida a su actividad antimicrobiana, permitiría el empleo de estas moléculas como bioconservantes alimentarios. El interés de la industria alimentaria por satisfacer la demanda de los consumidores de productos más "naturales" y con menos aditivos químicos sugiere que muchas bacteriocinas podrían emplearse en el futuro como bioconservantes, particularmente debido a su potente espectro antimicrobiano, que en la mayoría de los casos, incluye *Listeria monocytogenes*, un patógeno emergente que constituye un serio peligro para la Salud Pública (Benech y col., 2002; Chen y Hoover, 2003).

Las bacteriocinas son proteínas o complejos de proteínas con actividad antibacteriana producidas por BAL. La Nisina, descrita en 1928, fue la primera bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos. Es la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe). Se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la producción de alimentos como un aditivo en productos lácteos para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* (Moreno, 1995; González y col., 2003).

Las bacteriocinas de las BAL son generalmente inactivas contra bacterias Gram negativas, debido a la resistencia conferida por su membrana externa (Rodríguez y col., 2005). Sin embargo, se han demostrado efectos inhibitorios de nisina y algunas enterocinas en Gram negativas (Cutter y Siragusa, 1995; Helander y col., 1997; Bozianis y Adams, 1999). Además, se ha observado que la utilización de cepas de *Lactococcus lactis in vitro*, inhiben levemente el crecimiento de gérmenes Gram negativos entre ellos: *Escherichia coli* (Spelhaug y Harlander, 1989).

La aplicación de cepas bacteriocinogénicas ha mostrado una significativa disminución de coliformes totales y de *E.coli* (Barboza y col., 2002; Vignolo y col., 2005).

Existen trabajos con cultivos productores de bacteriocinas (nisina) que demostraron su efecto inhibitorio frente a *L. monocytogenes* y *L. innocua* en quesos semi-duros (Maisnier-Patin y col., 1992); así como también *Lactococcus lactis* y diversas cepas de *Enterococcus* productoras de este metabolito (Giraffa y Carminatti, 1997; McAuliffe y col., 1999; Rodríguez y col., 2000). Menos conocida es la eficacia de bacteriocinas en el control de *Staphylococcus aureus* en queso, aunque existen referencias en quesos semi-duros y blancos con cultivos productores de nisina (Rodríguez y col., 2000; Castro y col., 2009) y *Lactobacillus paracasei* en quesos frescos cremosos (Buriti, 2005).

Se ha reportado que aproximadamente un 20% de la cantidad de BAL disminuye durante el proceso de elaboración de los quesos y el almacenamiento en frío de los mismos (Davies y col., 1997).

Según Johnson y Law, citado por Buriti (2005), las perspectivas en el aumento de las ventas de queso mundialmente son promisorias, particularmente en lo que se refiere a su valor agregado. Este incremento surge como resultado de una mayor demanda de este producto en el mercado, ya sea como ingrediente alimentario y/o por el desarrollo de quesos "más saludables", a través de la adición de cultivos lácteos con probadas propiedades probióticas.

Productos de leche de cabra

En este contexto y, dado que el queso de cabra ha incrementado su comercialización y consumo; en nuestro país en la última década se ha acentuado la producción de leche caprina, sin aún estar delimitadas "cuencas" propiamente dichas de distribución de los tambos caprinos. Varios de ellos se ubican en los departamentos de Montevideo, Canelones, San José y Colonia, tratándose de predios pequeños, que funcionan con rebaños con bajo número de animales empleando en muchos casos, mano de obra familiar. Desde tiempos remotos, la leche de cabra tiene la imagen de alimento saludable, siendo muy recomendado su consumo por niños alérgicos a la leche de vaca, ancianos o pacientes inmunodeprimidos.

Actualmente con la leche de cabra se elaboran artesanalmente en 6 tambos productos lácteos de cabras (De Lima, 2005).

Mayormente se emplea un sistema de cría semiextensivo, con pastoreo de praderas implantadas y una estabulación nocturna donde los animales reciben una suplementación de ración al igual que durante los ordeños (en total entre 200 y 300 g/día/animal). La principal función de los caprinos es la producción de leche, ésta se emplea en su mayoría para la fabricación de yogures (natural, con frutas y descremados) y varios tipos de quesos (puros o mezclados con leche de vaca, ahumados, duros para rallar, en aceite de oliva, madurados en vino, crema de untar, etc.) (Ciappesoni, 2006).

La producción de quesos en Uruguay es incipiente dedicándose a la misma actualmente sólo pequeñas plantas en forma artesanal, siendo el queso de cuajada ácida el más elaborado en sus distintas versiones. Se elaboran quesos de cabra en aceite de oliva, condimentados, quesos madurados (tipo español duro) o con hongo blanco (imitando el St. Mauré) que tienen su espacio asegurado entre los paladares más conocedores. Existen proyectos de carácter social que buscan convertir a pequeños productores de leche bovina (menos de 20 vacas) en productores de leche caprina. Las razas de cabras de alta producción lechera explotadas en Uruguay son principalmente cuatro: Pardo Alpina, Anglo Nubian, Saanen y Toggenburg. Se trata de animales dóciles, que se han adaptado bien a las condiciones locales, sexualmente precoces, de buena fertilidad y prolificidad (De Lima, 2005).

En el mercado podemos encontrar una variedad importante de productos: quesos puros de cabra, quesos mezclas con vaca y algunos mezclas de cabra, vaca y oveja, también yogures, dulce de leche y leche pura de cabra pasteurizada.

Su elevado valor, la demanda en aumento, su alto rendimiento (comparado con la especie vacuna) y sus propiedades sensoriales, lo hacen el principal rubro en la producción caprina (Sacchi, 2004).

Caracterización de queso de cabra

Definición

“Con el nombre genérico de queso se entiende el producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de leche o de leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario” (Uruguay, 2005).

Clasificación

De acuerdo al contenido de humedad, el queso de cabra en estudio, se ubica dentro de la categoría: “quesos de muy alta humedad, o de pasta muy blanda o mole, con una humedad mínima de 55%; comprende queso Blanco, Requesón y otros” (Uruguay, 2005).

En la elaboración de quesos de cabra en Uruguay algunas bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas han sido utilizadas, pero no ha sido reportada la evaluación del efecto antimicrobiano de las mismas en este tipo de producto. Se propone en este estudio evaluar la aplicación de este tipo de BAL en un queso de cabra de muy alta humedad, la que influye en el desarrollo microbiano y por tanto puede constituir un riesgo para la salud humana, afectando además la vida útil. La utilización de cultivos de *L. lactis* subsp. *lactis* productores de bacteriocinas introduciría un factor de seguridad en la inocuidad de este tipo de queso y consecuentemente en su calidad.

Técnicas sensoriales descriptivas

El análisis sensorial descriptivo se distingue de los otros métodos de análisis sensorial, en que buscan el perfil de un producto en todas sus características de percepción sensorial (Murray y col., 2001). Las pruebas sensoriales descriptivas son las más completas herramientas de la ciencia sensorial e involucra a la detección, la discriminación y la descripción tanto de los componentes sensoriales cualitativos y cuantitativos de un producto de consumo por evaluadores entrenados (Lawless y Heymann, 1999). Permite medir las características relevantes del producto, es decir, aquellas que definen al mismo, porque son críticas y aquellas cuya variabilidad permite clasificar y diferenciar los productos entre sí (Muñoz y col., 1992).

Uno de los principales usos del análisis descriptivo es que permite estudiar las relaciones entre las medidas descriptivas, medidas instrumentales y medidas de aceptabilidad y preferencia sensorial. También se utiliza para el control de calidad, para rastrear cambios en el producto a través del tiempo con respecto a la comprensión de los efectos de la vida útil y envasado, para investigar los efectos de ingredientes o variables de procesamiento sobre la calidad final sensorial de un producto (Muñoz y col. 1992; Johnsen y col., 1998).

En los últimos tiempos se han venido usando las pruebas sensoriales descriptivas en forma creciente, sin percibirse que aún hayan alcanzado su límite.

El conocimiento de la "composición deseada" permite la optimización de productos y modelos validados entre aquellas variables definidas y medidas con estos métodos y las correspondientes instrumentales y / o variables afectivas relacionadas (Murray y col., 2001).

Hay varios métodos de análisis descriptivo: Perfil de sabor, Perfil de textura, Análisis cuantitativo descriptivoTM, Método SpectrumTM, Perfil cuantitativo de sabor, Perfil libre de elección y Análisis descriptivo de genéricos (Meilgaard y col., 1999; Murray y col., 2001; Stone y Sidel, 2004).

Casi todos los métodos descriptivos requieren un panel con un cierto grado de capacitación u orientación.

En este trabajo, el proceso de implementación de un método sensorial descriptivo se caracterizó por usar lista de referencias, formación especializada y los procedimientos del panel escala. El mismo evalúa de forma completa los atributos del producto.

Los panelistas pueden ser seleccionados y entrenados para evaluar sólo una, o una variedad de productos.

Las escalas utilizadas por el método, se basan en el uso extensivo de puntos de referencia a lo largo de su área de distribución, que corresponden a muestras de referencia de los alimentos. El uso de estos puntos puede reducir en gran medida la variabilidad del panel permitiendo mejores correlaciones con otros datos, por ejemplo, los instrumentales.

Los panelistas se entrenan con los principios técnicos de cada modalidad que se describen (por ejemplo, el aspecto, olor, sabor y aroma) y se espera que tengan un conocimiento básico de la fisiología y la psicología de la percepción sensorial.

Este grupo de técnicas se ha venido usando exitosamente en varios alimentos y para diversas finalidades como se puede apreciar en los trabajos publicados entre los que se destacan:

- Drake y col. (2001) aplicaron un análisis descriptivo para caracterizar el queso Cheddar, para esto utilizaron un panel entrenado con un lenguaje descriptivo básico.
- Técnicas de análisis descriptivo se puede utilizar para caracterizar las diferencias sensoriales de los vinos a través de múltiples atributos, sin juzgar los efectos positivos o impacto negativo de las diferencias (Chapman y col., 2004).
- Para la caracterización sensorial de leche ultrapasteurizada, Chapman y col. (2001), utilizaron un análisis descriptivo, con una escala no estructurada y un panel entrenado, similar al implementado en este ensayo.
- Prinsloo (2007) implementó un método similar, al usado en este trabajo, para determinar el impacto de la temperatura de servicio en la percepción de los atributos de sabor al queso Cheddar.

OBJETIVOS

Objetivo General

Comparar la eficacia de dos cultivos con capacidad bacteriocinogénica en la elaboración de queso de cabra de muy alta humedad.

Objetivos Específicos

- Verificar la actividad anti *Escherichia coli* (*E. coli*) *in vitro* de dos cultivos con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.
- Evaluar la actividad antilisterial de los cultivos.
- Comparar los efectos de los dos cultivos sobre las características sensoriales de queso de cabra.

HIPÓTESIS

El cultivo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (biopreservador CGM-3-BC®), tiene mayor efecto antimicrobiano que el habitualmente utilizado, en la elaboración de quesos de muy alta humedad de cabra, manteniendo sus características sensoriales.

Localización

Este trabajo se desarrolló en la Facultad de Veterinaria en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de Origen Animal en el laboratorio del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche y la Unidad de Evaluación Sensorial (Departamento de Calidad Agroalimentaria).

Determinación de la dosis de cultivos a aplicar

Previo a la elaboración de los quesos se realizó el ajuste de dosis de los cultivos a utilizar, incubando en leche pasteurizada y realizando la medición de pH y acidez Dörníc, verificándose el crecimiento de los mismos (Pinto y col., 1998).

Así mismo se realizó la siembra del cultivo FD-DVS R-708^{®1}: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; así como del cultivo biopreservador CGM-3-BC[®]: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en agar Man Rogosa y Sharpe (MRS)³ (De Man y col., 1960). El ajuste de la dosis del cultivo FD-DVS R-708[®] se realizó basado en la información aportada por una empresa quesera de leche caprina. La determinación de dosis de ambos cultivos fue efectuada a través de varios ensayos a escala laboratorio evaluando diferentes cantidades.

Se determinó que la dosis a utilizar del cultivo FD-DVS R-708[®] (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) fue de 0,03g para uso directo en tina. En cambio, la dosis de 0,1g/10mL del cultivo biopreservador CGM-3-BC[®] (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) se utilizó como cultivo intermedio (adaptación al medio: leche en polvo descremada reconstituida esterilizada, incubado a 37°C/20hs) y luego su utilización en tina.

Actividad anti *E.coli* in vitro de los cultivos

Se utilizó la técnica de gotas o puntos ("spots") descrita por Lewus y Montville (1991).

Se utilizaron suspensiones a partir de cultivos frescos en caldo MRS³, de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (FD-DVS R-708[®] y biopreservador CGM-3-BC[®]). Se sembraron 2,5 µL de estos cultivos en forma de "spots" sobre agar MRS incubándose a 30°C/24h en microaerobiosis. Luego se cubrieron estos "spots" con una suspensión de *E. coli* en BHI (0,8% de agar). Posteriormente, se incubó a 37°C/24h en aerobiosis, para observar la aparición de halos de inhibición del crecimiento.

Elaboración de queso a escala laboratorio

El tipo de queso elaborado es clasificado como de muy alta humedad según el Reglamento Bromatológico Nacional (Uruguay, 2005).

Para la elaboración de los diferentes tratamientos se utilizó un total de 6 litros de leche de cabra de la raza Saanen. Esta leche fue estandarizada a 3,3% de materia grasa. La pasteurización fue realizada a 63°C/30 minutos.

La elaboración de queso se realizó de acuerdo a la Figura 1.

¹ Chr. Hansen S.A.

³ Acumedia

Una vez pasteurizada la leche, se fraccionó en tres recipientes con 2 litros cada uno y se procedió a inocular los cultivos correspondientes en dos de los lotes, siendo el restante el Control.

Además se efectuaron análisis de recuento de aerobios mesófilos en Plate Count Agar (PCA) (Oxoid) y determinación del Número Más Probable (NMP)-de coliformes totales en muestras de leche pasteurizada (APHA, 2002).

Durante el proceso de elaboración se realizó la determinación de pH y acidez Dörmic con la finalidad de comprobar la actividad de los cultivos (Pinto y col., 1998).

Todos los tratamientos se incubaron a 37°C/40 minutos, y luego se les agregó a cada uno 0,4g de cuajo bovino en polvo (Dispert®).

A continuación, se incubaron a 37°C por 30 minutos, para luego permanecer a temperatura ambiente por 18 horas permitiendo así la formación del gel. Posteriormente, se procedió a retirar la cuajada (pesca), colocándose en paños para lograr el desuerado por 24 horas. Se realizó el salado con sal común (1%), moldeo y envasado en recipientes estériles.

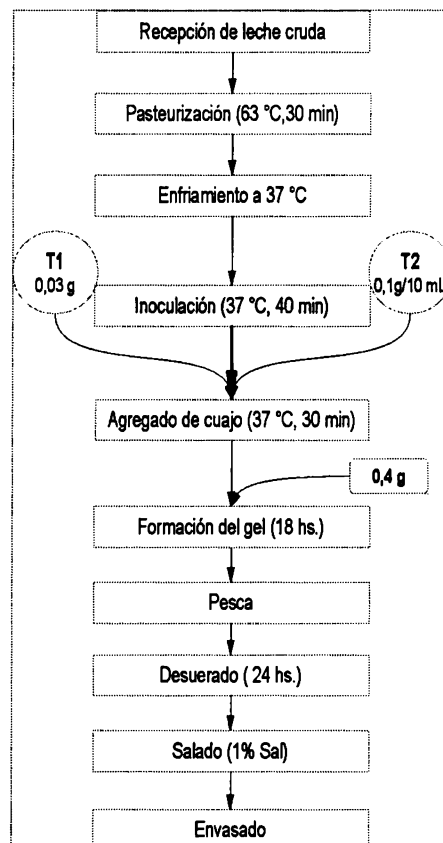


Figura 1: Flujograma de elaboración del queso de muy alta humedad.

Diseño experimental

Se utilizaron dos tratamientos para comparar la eficacia de ambos cultivos en la elaboración de queso de cabra: T1 = agregado de cultivo FD-DVS R-708[®]: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, y T2 = agregado de cultivo biopreservador CGM-3-BC[®]: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Se agregó un tercer tratamiento como control, sin agregado de cultivo (T0). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado siguiendo el mismo proceso de elaboración (Figura 1).

Control de inocuidad de los quesos

De acuerdo a los requisitos microbiológicos del Reglamento Bromatológico Nacional (ANEXO A), y a los efectos de verificar las condiciones de elaboración y las posibles fuentes de contaminación microbiológica, se analizaron muestras de los quesos envasados de cada tratamiento para la determinación de: coliformes totales por la técnica del Número Más Probable (NMP) a 37°C/24-48hs, coliformes termotolerantes a 44 ± 0,5°C/24-48hs, *Staphylococcus coagulasa* positiva, *Listeria* spp. y *Salmonella* spp. (APHA, 2002; Uruguay, 2005).

También se cuantificaron las siguientes características: acidez Dörmic (Pinto y col., 1998) y recuento de BAL en agar MRS (De Man y col., 1960).

Actividad antilisterial

Se contaminaron muestras de quesos de los tres tratamientos por duplicado con un inóculo de 10² ufc/g de *Listeria innocua*, la cual fue utilizada por compartir el mismo hábitat y características de crecimiento que *Listeria monocytogenes*, incubándose a temperatura ambiente durante dos horas.

Luego se cuantificó este microorganismo utilizando la técnica del Número Más Probable, en tres tiempos a partir de su inoculación: 0, 2 y 4 días (Carro, 2005).

Comparación de los cultivos sobre las características sensoriales de queso de cabra

Se trabajó sólo con los quesos con cultivo (T1 y T2) ya que el tratamiento control resultó no apto para el consumo.

Se utilizó un panel de evaluadores entrenados, integrado por 21 personas de ambos sexos con edades comprendidas entre 25 y 55 años, reclutados entre docentes, funcionarios y estudiantes de la Facultad de Veterinaria.

Fueron seleccionados con procedimientos estándar (Chambers y Baker, 1996; IRAM 20005-1) y su entrenamiento fue dirigido a la evaluación de quesos y al uso de escalas no estructuradas de 100 mm (Piggott, 1984; Lawless y col., 1999; Meilgaard y col., 1999). El mismo se realizó en sesiones semanales con una duración de aproximadamente un año.

Paralelamente se identificó una serie de variables que describía este tipo de queso. Las mismas fueron definidas exactamente, se describió una manera precisa de evaluación para cada una de ellas y se identificaron y describieron muestras que correspondieron a esos valores. Con dicha información se elaboró un instructivo. Se depuró el exceso de variables, seleccionando aquellas que se consideraron más descriptivas del producto "queso de cabra de muy alta humedad".

El instructivo logrado se utilizó para caracterizar sensorialmente los quesos (ANEXO B), incluyendo las siguientes variables: apariencia, sinéresis superficial, olor a cabra,

olor a manteca, borde de corte, adhesividad en la cuchara, untabilidad, aspereza, aroma a cabra, acidez y amargor.

Cada evaluador recibió una muestra de cada tratamiento. Las mismas fueron retiradas de la heladera y se dejaron a temperatura ambiente para maximizar la sensibilidad de los panelistas. El formulario utilizado para la recolección de datos se muestra en la figura 2.

Nombre		Fecha		Características manuales (textura)	
<p>Instrucciones: Hoy evaluaremos varias muestras de queso. Por favor, pruebe las muestras en el orden que se le ofrecen, siguiendo las instrucciones que se les indicarán para cada parámetro. Agregue los comentarios que crea pertinentes, en cada caso.</p>					
Características visuales					
Apariencia					
Lisa		Granulosa			
Sinéresis superficial					
Mínimo		Máximo			
Características olfativas					
Olor a cabra					
Mínimo		Máximo			
Olor a manteca					
Mínimo		Máximo			
Otros olores presentes					
Establo	Fecal	Rancio	Pintura	Cartón	
Otros (especifique):					
Borde de corte					
Mínimo		Máximo			
Adhesividad en la cuchara					
Mínimo		Máximo			
Untabilidad					
Mínimo		Máximo			
Características bucales u orales					
<i>Al masticar el alimento a la boca</i>					
Aspereza					
Mínimo		Máximo			
Aroma a cabra					
Mínimo		Máximo			
<i>Al masticar el alimento dentro de la boca</i>					
Acidez					
Mínimo		Máximo			
Amargor					
Mínimo		Máximo			

Figura 2: Formulario de evaluación sensorial para queso de cabra de muy alta humedad.

Análisis Estadístico

Datos microbiológicos

Para evaluar la actividad antilisterial de los cultivos se utilizó el método de *Kruskal-Wallis, con el programa PAST* (Hammer y col., 2001).

Datos sensoriales

Para comparar los efectos de los cultivos sobre las características sensoriales de queso, los datos obtenidos se analizaron por el método de ANOVA de dos vías (O'Mahony, 1986) considerando como fuentes de variación: los tratamientos y los evaluadores (verificación de la concordancia interna del panel).

Se planteó el siguiente procedimiento (test de hipótesis):

1. H_0 : $T1 = T2$ para cada variable estudiada.; $Ev_{01} = Ev_{02} = \dots = Ev_{21}$ para cada variable estudiada.
 H_A : $T1 \neq T2$; $Ev_i \neq Ev_j$ para cualquier "i" y "j" de los 21 posibles.
2. Nivel de significación elegido: 0,05
3. Estadístico seleccionado: Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías considerando como fuentes de variación los tratamientos y los evaluadores.
Comprobación de los supuestos necesarios (para cada fuente de variación):
 - ▲ Aleatoriedad: se verificó con la preparación de las muestras y el diseño de la prueba.
 - ▲ Independencia: se verificó con la preparación de las muestras y el diseño de la prueba.
 - ▲ Comprobación de la normalidad del conjunto de datos (para cada variable). Se utilizó el Test de Shapiro-Wilk.
 - ▲ Comprobación de homocedasticidad (para cada muestra). Se utilizó el test de Levene.
4. Criterio de decisión: En cada caso,
 - a) Para los tratamientos:
 - si $F_{calc} < F_{(0,05; 1; 40)}$ o si $p_{calc} > 0,05$ entonces no es posible rechazar la H_0
 - si $F_{calc} \geq F_{(0,05; 1; 40)}$ o si $p_{calc} \leq 0,05$ se debe rechazar la H_0 y por lo tanto se establece que hay diferencias significativas entre los tratamientos.
 - b) Para los evaluadores:
 - si $F_{calc} < F_{(0,05; 20; 40)}$ o si $p_{calc} > 0,05$ entonces no es posible rechazar la H_0
 - si $F_{calc} \geq F_{(0,05; 20; 40)}$ o si $p_{calc} \leq 0,05$ se debe rechazar la H_0 y por lo tanto se establece que hay diferencias significativas entre los evaluadores.

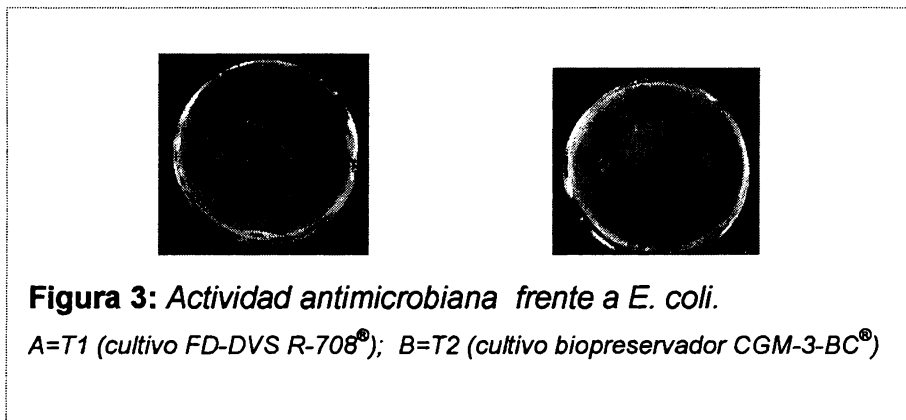
Para aplicar el estadístico mencionado se utilizó el programa GNUMERIC 1.10.16.

Para estudiar la relación entre las variables y entre ellas y los tratamientos experimentales, se realizó el Análisis de Componentes Principales (técnica multivariada) utilizando el programa PAST (Hammer y col., 2001).

RESULTADOS

Actividad anti *E.coli* in vitro de los cultivos

Se comprobó, en forma cualitativa, que ambos cultivos presentaron halo de inhibición frente a *E. coli* (Figura 3), indicando actividad antimicrobiana frente a dicho patógeno.



Control de pasteurización

En el análisis microbiológico de la leche pasteurizada se obtuvieron resultados inferiores a 10 ufc/mL para recuento de mesófilos aerobios, y < 3ufc/mL para coliformes totales, lo que permitió comprobar la efectividad del proceso de pasteurización.

Control de actividad de los cultivos durante la elaboración

Los registros de pH y acidez Dörníc de los tres tratamientos, durante las etapas de elaboración de queso, se muestran en el Cuadro I.

Cuadro I: Valores de pH y Acidez (°D) de T0, T1 y T2 a lo largo de la elaboración de los quesos.

Etapas	T0		T1		T2	
	pH	Acidez(°D)	pH	Acidez(°D)	pH	Acidez(°D)
Recepción leche cruda	7	15	7	15	7	15
Pasteurización	7	17	7	17	7	17
Inoculación	7	17	6,3	18	6,1	18
Agregado de cuajo	6,5	17	6,1	18	6,3	18
Pesca	6,1	23	4,0	80	5,0	35

T0: control; T1: cultivo FD-DVS R-708®; T2: cultivo biopreservador CGM-3-BC®

Control de inocuidad de los quesos

En el Cuadro II se presentan los resultados obtenidos para coliformes totales y termotolerantes de las muestras de quesos de los tres tratamientos.

Cuadro II: Número Más Probable (NMP) de Coliformes totales (37°C) y Coliformes termotolerantes (44±0,5°C).

Tratamientos	NMP Coliformes totales/g	NMP Coliformes termotolerantes/g
T0	> 1100	> 1100
T1	<3	<3
T2	90	<3

Los resultados obtenidos para *Listeria* spp y *Salmonella* spp. indicaron ausencia en 25g, en los tres tratamientos. Con respecto a *Staphylococcus* coagulasa positiva demostraron resultados negativos los tres tratamientos.

En el Cuadro III se detalla los resultados de las características, acidez Dörníc y recuento de BAL en agar MRS, de las muestras de quesos envasados de los tres tratamientos.

Cuadro III: Registro de acidez Dörníc y recuento de BAL en agar MRS.

Tratamientos	Acidez (°D)	BAL
T0	35	1,5x10 ⁶ ufc/g
T1	60	1,2x10 ¹⁰ ufc/g
T2	45	1,3x10 ⁸ ufc/g

Actividad antilisterial

No se encontraron diferencias en los tres tratamientos frente al microorganismo inoculado ($p>0,05$).

Comparación de los cultivos sobre las características sensoriales de queso de cabra

Los resultados del análisis descriptivo realizado a las muestras correspondientes a los tratamientos experimentales se pueden ver en la Figura 4.

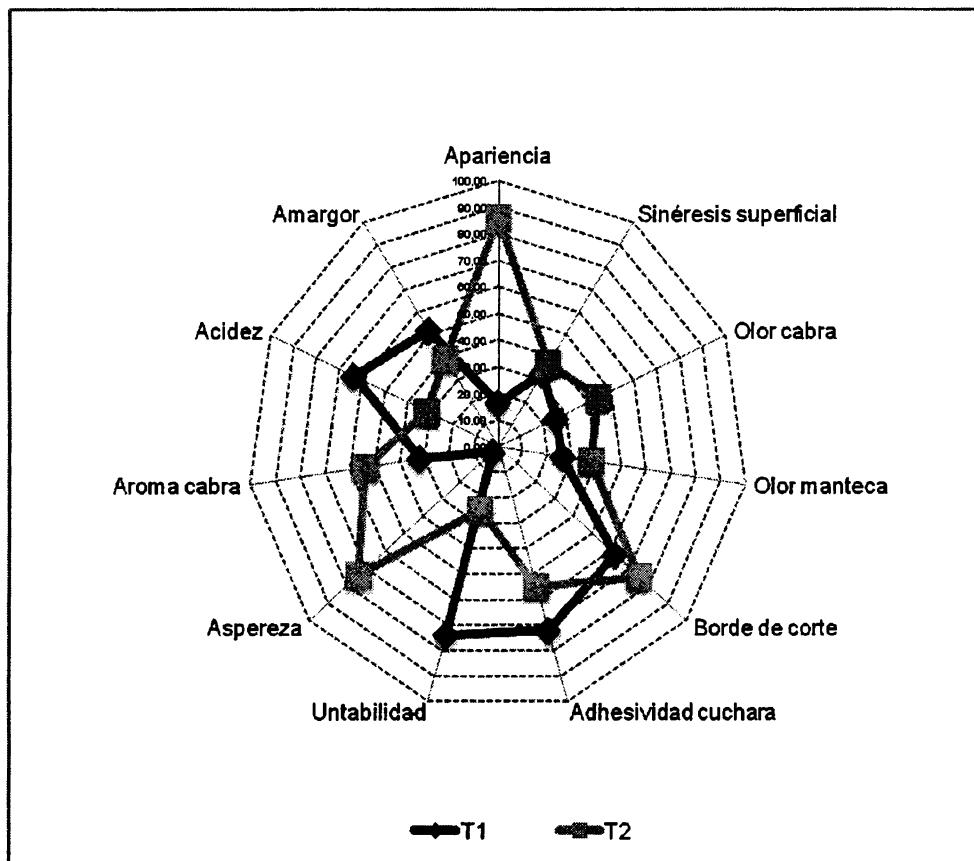


Figura 4: Representación en tela araña de las características sensoriales evaluadas en los quesos de los diferentes tratamientos (T1 y T2).

En ella, se muestra de manera simplificada el comportamiento de ambos cultivos frente a las características evaluadas.

Cuadro IV: Valores medios de las variables analizadas.

Variable	T1 (Media)	T2 (Media)	EEM
Apariencia	16,52 ^a	85,86 ^b	5,765
Sinéresis superficial	32,81 ^a	37,24 ^a	4,282
Olor cabra	25,52 ^a	44,19 ^a	3,120
Olor manteca	26,19 ^a	37,67 ^b	4,233
Borde de corte	62,10 ^a	74,95 ^a	5,328
Adhesividad cuchara	72,00 ^a	54,76 ^a	5,875
Untabilidad	73,90 ^a	24,86 ^b	5,054
Aspereza	2,86 ^a	73,95 ^b	5,868
Aroma cabra	31,86 ^a	54,00 ^b	4,696
Acidez	63,57 ^a	31,48 ^b	3,944
Amargor	51,71 ^a	39,24 ^a	4,986

Letras diferentes (entre pares de datos), indican diferencias significativas con $p < 0,05$
EEM: error estándar de la media

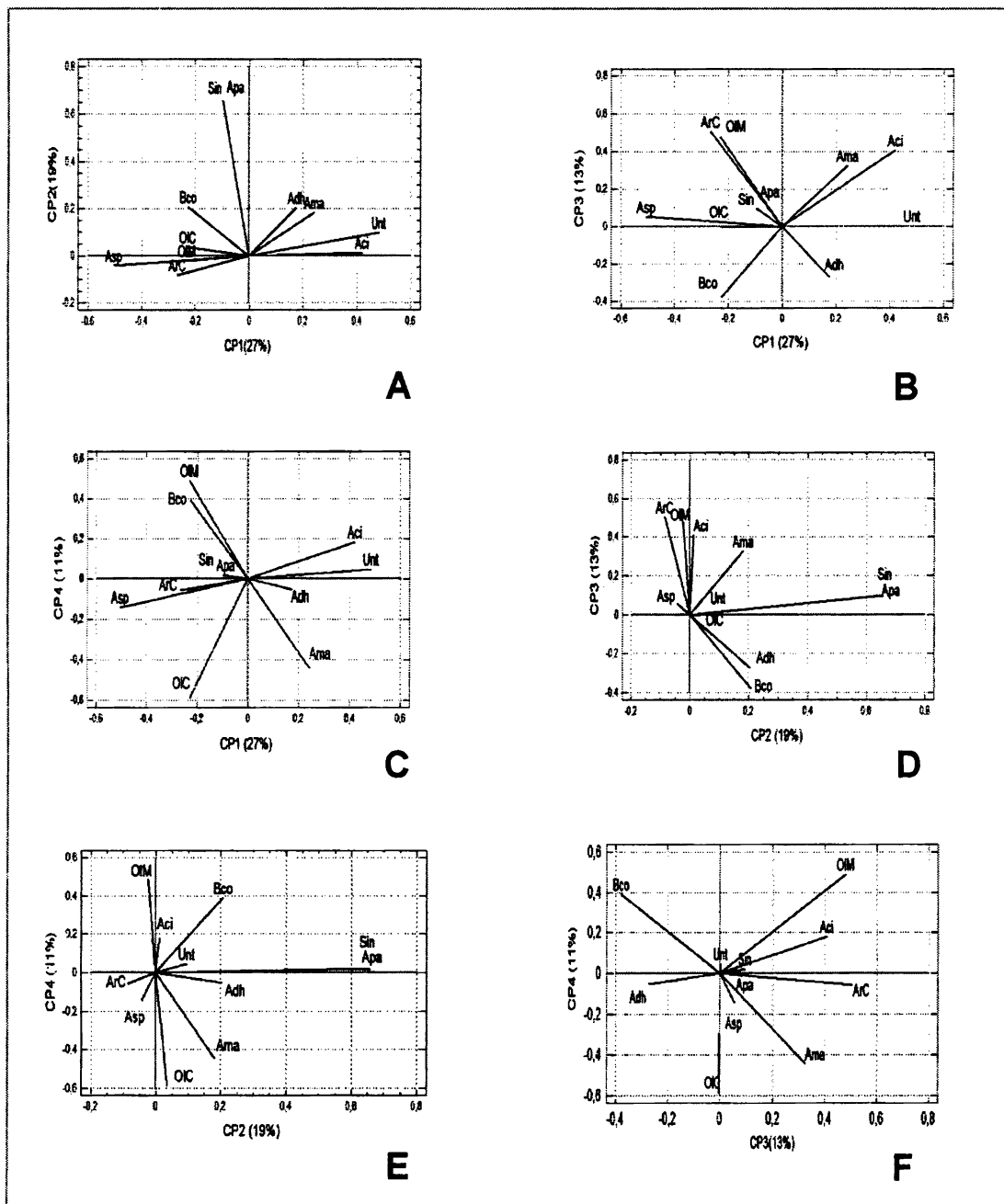


Figura 5: Análisis de componentes principales (PCA) de las once variables estudiadas.

Notas: En los ejes de cada gráfico se indica el componente principal que está representado y la cantidad (%) de varianza explicada.

Apa:Apariencia; **Sin:**Sinéresis superficial; **OIC:**Olor a cabra; **OLM:**Olor a manteca; **Bco:**Borde de corte; **Adh:**Adhesividad en la cuchara; **Unt:**Untabilidad; **Asp:**Aspereza; **ArC:**Aroma a cabra; **Aci:**Acidez y **Ama:**amargor.

Gráfico 5-A:CP1 y CP2, Gráfico B:CP1 y CP3, Gráfico C:CP1 y CP4, Gráfico D:CP2 y CP3, Gráfico E:CP2 y CP4 y Gráfico F:CP3 y CP4.

En este caso, se seleccionaron 4 componentes, los cuales tuvieron eigenvalores mayores o iguales que 1,0. Dichos componentes explicaron el 71,5% de la varianza acumulada.

DISCUSIÓN

Actividad anti *E.coli* in vitro de los cultivos

La actividad antimicrobiana de las BAL estudiadas, es semejante a la reportada por Spelhaug y Harlander (1989), quienes emplearon una cepa de *Lactococcus lactis* también *in vitro*. Estos autores encontraron inhibición leve del crecimiento de gérmenes Gram negativos entre ellos: *Escherichia coli*.

Otros autores también encontraron un efecto antagonista de *Lactococcus lactis* frente a *Escherichia coli* bajo ciertas condiciones (Rodríguez y col., 2005; Bozianis y Adams, 1999).

A su vez en el presente trabajo la actividad antimicrobiana (Figura 3), es coincidente con los resultados obtenidos en la determinación de indicadores (coliformes) en las muestras de queso analizadas (Cuadro II).

Control de inocuidad de los quesos

En función de los resultados obtenidos, los quesos de los tratamientos T1 y T2 cumplen con los requisitos microbiológicos para coliformes totales y termotolerantes exigidos por el Reglamento Bromatológico Nacional.

Esto estaría relacionado con los valores de acidez y de recuento de BAL encontrados en dichos tratamientos.

No obstante, se pudo observar en el tratamiento T0 valores por encima de lo establecido legalmente, probablemente porque al no haber un cultivo iniciador, los contaminantes se desarrollaron sin interferencia.

La combinación de los efectos provocados por la acción de los cultivos: competición de nutrientes, producción de ácidos orgánicos, y otros metabolitos, en el período de evaluación efectuado puede explicar estos resultados. El efecto antimicrobiano puede deberse a la producción de ácidos orgánicos (fundamentalmente ácido láctico), y la consecuente disminución del pH, sumado a la capacidad de producir sustancias inhibitorias tales como: peróxido de hidrógeno, diacetil, metabolitos de oxígeno y bacteriocinas entre otras (Rodríguez y col., 2000; Carr y col., 2002; Carro y col., 2005).

Castro y col. (2009), encontraron en quesos blancos elaborados con cultivos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bajos recuentos de coliformes totales al compararlos con los quesos controles, lo que se debió al efecto de la acidez generada por el metabolismo fermentativo de los cultivos.

Estos resultados concuerdan con los encontrados por Cutter y Siragusa (1995), quienes reportaron actividad inhibitoria de nisina frente a bacterias Gram negativas.

Por otra parte, los resultados en los tres tratamientos con respecto a *Staphylococcus* coagulasa positiva, *Listeria* spp y *Salmonella* spp. cumplieron con los requisitos legales (ANEXO A).

Existen trabajos que demuestran el efecto inhibitorio frente a *E.coli* y *Staphylococcus aureus* en quesos tipo Minas Frescal (Moreno, 1995) del *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Por otra parte, similares resultados han sido reportados frente a coliformes totales y *E.coli* en medias reses y cortes vacunos (Barboza y col., 2002; Vignolo y col., 2005).

Actividad antilisterial

Los resultados de este estudio indican que no hay diferencias en cuanto al efecto antilisterial entre los tratamientos. Por lo que es posible que en la matriz alimenticia no exista cantidad suficiente de metabolitos y ácidos orgánicos producidos por BAL capaces de ejercer ese efecto.

No obstante, existen trabajos reportados por McAuliffe y col. (1999) que indican el efecto inhibitorio del *Lactococcus lactis* en queso cottage frente a *Listeria monocytogenes*. También el estudio realizado por Benech y col. (2002); en queso Cheddar mostró el efecto inhibitorio frente a *Listeria innocua* a través del agregado de nisina y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

Davies y col. (1997) demostraron la eficacia de la nisina (producida por cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) para el control de *L. monocytogenes* en quesos tipo ricotta en condiciones de laboratorio.

Los resultados del presente trabajo son similares a los de Carro y col. (2005), en que las BAL presentaron acción antilisterial debido a la producción de ácidos orgánicos.

Comparación de los cultivos sobre las características sensoriales de queso de cabra

Las variables elegidas permiten ver diferencias en los productos, observándose diferencias significativas en las características: apariencia, olor a manteca, untabilidad, aspereza, aroma a cabra y acidez. Con respecto a las otras características evaluadas ambas muestras se comportaron de manera similar.

El análisis de componentes principales (CPA) mostró la relación entre las variables, de las que se destacan: apariencia, untabilidad, aspereza y acidez.

Para los CP1 y CP 2, que explicaron un 46% de la varianza acumulada, las variables acidez y untabilidad se relacionan positivamente, a su vez, éstas se relacionan con la variable aspereza, pero negativamente (Figura 5a).

Teniendo en cuenta que es un producto fresco, de breve periodo de consumo, una mayor acidez determinaría una mayor untabilidad y menor aspereza (menor tamaño de partícula).

Las características olfativas, olor a cabra y olor a manteca, tuvieron un comportamiento moderado para los componentes principales 1,2 y 3, lo que indica que son variables secundarias para este producto.

Los CP1 y CP2 son los que más diferencias mostraron para este tipo de queso en este estudio.

Prinsloo (2007) implementó un método similar al usado en este trabajo para determinar el impacto de la temperatura de servicio en la percepción de los atributos de sabor al queso Cheddar.

Fanatico y col. (2007) utilizaron una técnica descriptiva similar a este ensayo para evaluar el impacto del sistema en genotipos de pollo y la producción en los atributos sensoriales.



CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que:

Ambos cultivos presentaron actividad anti *E. coli in vitro*.

Los tres tratamientos no presentaron diferencias significativas frente a *Listeria innocua*.

Los quesos realizados con los dos tipos de cultivos presentaron importantes diferencias en algunas de sus características sensoriales más relevantes: apariencia, olor a manteca, untabilidad, aspereza, aroma a cabra y acidez. Esto, hace que se deba considerar que se trata de productos diferentes.

REFLEXIONES FINALES

Se podría inferir, que la matriz alimentaria podría estar afectando el desempeño de ambos cultivos por algún tipo de interferencia con las BAL utilizadas y/o con sus metabolitos (bacteriocinas).

El cultivo de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (biopreservador CGM-3-BC[®]), en las condiciones realizadas en este ensayo experimental, no es recomendable para su utilización en la elaboración de quesos de muy alta humedad de leche de cabra.

Para evaluar su eficacia en la industria quesera, se propone el uso de este cultivo en una dosis mayor y/o en quesos de menor humedad. Asimismo se propone explorar su uso como coadyuvante de los cultivos iniciadores, habitualmente aplicados en quesería.

BIBLIOGRAFÍA

1. APHA. (2002) Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. 4ª ed., Washington. American Public Health Association, 676p.
2. Aymerich, M.T y Hugas, M. (1998) Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. Eurocarne, 72:39-49.
3. Barboza, Y.; Ferrer, K.; Marquez, E. (2002) Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses. J. Food Prot., 65:1780-1783.
4. Benech, R.; Kheadr, E.; Laridi, R.; Lacroix, C.; Fliss, I. (2002) Inhibition of *Listeria innocua* in Cheddar Cheese by Addition of Nisin Z in Liposomes or by In Situ Production in Mixed Culture. Appl. Environ. Microbiol. , 68:3683-3690.
5. Boziaris, I.; Adams, M. (1999) Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. Int. J. Food Microbiol., 53:105-113.
6. Burity, F. (2005) Desenvolvimento de queijo cremoso simbiótico. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Farmacéuticas. Universidade De São Paulo. 75p.
7. Campos, J.A. (2002) Cultivos probióticos y protectores, propiedades funcionales (Nutraceúticas) de valor agregado en los derivados lácteos. Lácteos y Cárnicos Mexicanos. Jun/Jul: 26-37.
8. Carr, F.; Chill, D.; Maida, N. (2002) The latic acid bacteria: A literature survey. crit. Rev. Microbiol. , 28:281-370.
9. Carro, S. (2005) *Listeria monocytogenes* em queijos tipo minas frescal produzidos artesanalmente: controle por bactérias lácteas. Tesis de Doctorado. Facultad de Agronomía. Universidade Federal De Pelotas. 85p.
10. Carro, S.; Zocche, F.; Jantzen, M.; Silveira, A.; Rosa, L.; Soares, J.D.; Da Silva, W. (2005) Actividad anti *Listeria monocytogenes* de bacterias ácido lácticas aisladas de quesos artesanales producidos en la región de Pelotas, Brasil. Alimentaria, 361:73-76.
11. Castro, G.; Valbuena, E.; Bríñez, W.; Sánchez, E.; Vera, H.; Tovar, A. (2009) Comparación del empleo de Nisina y cultivos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* para la Biopreservación de queso blanco. Rev. Científ. FCV-LUZ. 19(2):201-209.
12. Chambers, E.; Baker Wolf, M. (1996) Sensory testing methods. 2ª ed. American Society for Testing and Materials, Philadelphia. ASTM International. 115p.
13. Chapman, K. W.; Lawless, H. T.; Boor. K. J. (2001) Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of ultrapasteurized milk. J. Dairy Sci., 84:12-20.
14. Chapman, D.M; Matthews, M.A.; Guinard, J.X. (2004) Sensory attributes of Cabernet sauvignon wines made from vines with different crop yields. Am. J. Enol. Vitic, 55: 425-334.
15. Chen, H.; Hoover, D.G. (2003) Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2:82-100.
16. Ciappesoni, C.G. (2006) La producción caprina en Uruguay y Latinoamericana. Department of Tropical and Subtropical Animal Production. Disponible en: <http://www.capraispana.com/mundo/uruguay/uruguay.htm>. Fecha de consulta: 29/11/2011.

17. Cintas, L.M.; Casaus, P.; Havarstein, L.S.; Hernández, P.E.; Nes, I.F. (1997) Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:2643-2648.
18. Cleveland, J.; Montville, T.; Nes, I.; Chikindas, M. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Review article. *Int. J. Food Microbiol.*, 71:1-20.
19. Cutter, C.; Siragusa, G.P. (1995) Population reductions of Gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *J. Food Prot.* , 58:977-983.
20. Davies, E.; Bevis, H.; Delves-Broughton, J. (1997) The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 24: 343-346.
21. De Lima, D. (2005) Uruguay Une filiere laitiere caprine en plein développement. *La Chevre*, 267:40-42.
22. De Man, J.; Rogosa, M.; Sharpe, M. (1960) A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.*, 23:130-135.
23. Devlieghere, F.; Vermeiren, L.; Debevere, J. (2004) New preservation technologies and limitations. *Int. Dairy J.*, 14:73-285.
24. Drake, M.A.; Mcingvale, S.C.; Cadwallader, K.R.; Civille, G.V. (2001) Development of a descriptive sensory language for Cheddar cheese. *J. Food Sci.* , 66:1422-1427.
25. Fanatico, A.C.; Pillai, P.B.; Emmert, J. L.; Gbur, E. E.; Meullenet, J. F.; Owens, C. M. (2007) Sensory Attributes of Slow- and Fast-Growing Chicken Genotypes Raised Indoors or with Outdoor Access. *Poult. Sci.* , 86: 2441-2449.
26. Giraffa, G.; Carminati, D. (1997) Control of *Listeria monocytogenes* in the rind of Taleggio, a surface-smear cheese, by a bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 7C5. *Science des Aliments*, 17:383-391.
27. González, B.E.; Gómez, M.; Jiménez, Z. (2003) Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 4(2).
28. Gurira, O.; Buys, E.M. (2005) Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiol.* , 22:159-168.
29. Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 1-9.
30. Hammes, W.P.; Hertel, C. (1998) New developments in meat starter cultures. *Meat Sci.* , 49:125-138.
31. Helander, I.M.; Von Wright, A.; Mattila-Sandholm, T. (1997) Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.*, 8:146-150.
32. Holzapfel, W.H., Geisen, R. y Schillinger, U. (1995) Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.*, 24:343-362.
33. IRAM. (1996) Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de los evaluadores. Parte 1: Evaluadores seleccionados. IRAM 20005-1. Buenos Aires. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales.

34. Johnsen, P.B.; Civille, G.V.; Vercellotti, J.R.; Sanders, T.H.; Dus, C.A. (1998) Development of a lexicon for the description of peanut flavour. *Journal of Sensory Studies*, 3:9-17.
35. Lawless, H.T.; Heymann, H. (1999) *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland. 827p.
36. Lewus, B.C.; Montville, T.J. (1991) Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Meth.*, 13:145-150.
37. McAuliffe, O.; Hill, C.; Ross, P. (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufacture with a lactacin 3147-producing starter culture. *J. Appl. Microbiol.*, 86:251-256.
38. Maisnier-Patin, S.; Deschamps, S.; Tatini, S.; Richard. (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in camembert cheese made with a nisine producing starter. *Le Lait*, 72:249-263.
39. Mateos, J.A. (2002) Aspectos básicos de la tecnología de las leches fermentadas. Madrid. Médica Panamericana, 217p.
40. Meilgaard, M.; Civille, G.V.; Carr, B.T. (1999) *Sensory Evaluation Techniques*. 3ª ed., Florida. CRC Press, 281p.
41. Moreno, I. (1995) Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de Lactococos e sua utilização no procesamiento de queijo minas frescal. Tesis de Maestria. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade De São Paulo. 173p.
42. Muñoz, A.M.; Civille, G.V.; Carr, B.T. (1992) Sensory evaluation in quality control. New York. Van Nostrand Reinhold, 240p.
43. Murray, J.M.; Delahunty, C.M.; Baxter, I.A. (2001) Descriptive analysis: past, present and future. *Food Research International*, 34: 461-471.
44. O'Mahony, M. (1986) *Sensory evaluation of food. Statistical methods and procedures*. New York. Marcel Dekker, Inc.
45. O'Sullivan, L.; Ross, R.; Hill, C. (2002) Potential of bacteriocin-producing lactic bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84:593-604.
46. Piggott, J.R. (1984) *Sensory Análisis of Foods*. 2ª ed. New York. Elsevier Applied, 426p.
47. Pinto, M.; Vega y León, M.; Pérez, N. (1998) *Métodos de análisis de la leche y derivados*. Santiago de Chile. Ediciones Universidad Austral de Chile. 489 p.
48. Prinsloo, A. (2007) The relationship between consumer acceptability and descriptive sensory attributes of cheddar cheese, with special reference to free choice profiling. Tesis de Maestria. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of the Free State. Bloemfontein, South Africa. 150p.
49. Rodríguez, E.; Arqués, J.; Gaya, P.; Núñez, M.; Medina, M. (2000) Behaviour of *Staphylococcus aureus* in semi-hard cheese made from raw milk with nisin-producing starter cultures. *Milchwissenschaft*, 55:633-635.
50. Rodríguez, E.; Calzada, J.; Arqués, J.L.; Rodríguez, J.M.; Nuñez M.; Medina, M. (2005) Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *Int. Dairy J.*, 15:51-57.
51. Rodríguez, M.; Suárez, A.M.; Herranz Sorribes, C.; Martínez Corbacho, J.M.; Martínez Magro, M.I. (2000) Las bacteriocinas de las bacterias lácticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. *Alimentaria*, 314:59-66.
52. Sacchi, I. (2004) Influencia de la composición de la leche sobre el rendimiento quesero en diferentes razas caprinas. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. 21p.

53. Spelhaug, S.R.; Harlander, S.K. (1989) Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* y *Pedococcus pentosaceus*. J. Food Prot. 52(12): 856-862.
54. Stone, H.; Sidel, J.L. (2004) Sensory Evaluation Practices. 3^{era} ed. New York, USA, Elsevier Science & Technology, 377p.
55. Uruguay (2005) Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto N° 315/994 2^a ed., Montevideo, IMPO, CD ROM.
56. Vignolo, G.; Castellano, P.; Gentile, F. (2005) Aplicación de cultivos bioprotectores en medias reses, recortes vacunos y porcinos. La Industria Cárnica Latinoamericana, 25:47-51.

ANEXOS

Anexo A. Requisitos microbiológicos para quesos de muy alta humedad con muy numerosas bacterias lácticas en forma viable

Microorganismos	Límites establecido
Coliformes totales	n=5 c=3 m=100 ufc/g M=1000 ufc/g
Coliformes a 45°C	n=5 c=2 m=10 ufc/g M=100 ufc/g
<i>Staphylococcus coag. posit.</i>	n=5 c=2 m=10 ufc/g M=100 ufc/g
Hongos y levaduras	n=5 c=2 m=500 ufc/g M=5000 ufc/g
Salmonella spp	n=5 c=0 m= ausencia en 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	n=5 c=0 m= ausencia en 25g

Fuente: Reglamento Bromatológico Nacional (Uruguay, 2005).

*n: número de unidades de muestra de un lote que se analizan según el programa de muestreo establecido; c: número de muestras (máximo) que pueden exceder el límite m; m: límite microbiológico que únicamente c de las n muestras puede sobrepasar (límite que separa la calidad aceptable de la rechazable); M: nivel límite de aceptabilidad, valores superiores a M no son aceptables.

Anexo B. Instructivo para Evaluación Sensorial

Apariencia

Descripción:

Es el estado de la superficie de la muestra.

Manipulación:

Observar la superficie de la muestra bajo la luz incidente haciendo variar el ángulo de incidencia de ésta mediante la manipulación de la muestra.

Objetivo:

Percibir el grado de lisura/granulosidad del producto.

Valores de referencia:

Intensidad	Descripción
10,0	Completamente granulosa, superficie totalmente áspera
7,5	Superficie con abundante rugosidad
5,0	Se observa una superficie con cierta granulación distribuida uniformemente
2,5	Superficie lisa que ocasionalmente presenta alguna aspereza superficial
0	Completamente lisa, sin gránulos

Sinéresis superficial

Descripción:

Es el líquido que aparece en la superficie del producto.

Manipulación:

Observar la superficie de la muestra bajo la luz incidente haciendo variar el ángulo de incidencia de ésta mediante la manipulación de la muestra.

Objetivo:

Cuantificar el líquido presente en la superficie del producto.

Valores de referencia:

Intensidad	Descripción
10	Superficie cubierta de líquido y que al mover se desplaza claramente
7.5	Superficie de aspecto húmedo con desplazamiento de escaso líquido
5	Superficie de aspecto húmedo sin desplazamiento de líquido
2.5	Superficie con algo de brillo sin llegar a ser húmedo
0	Nada de líquido en la superficie; superficie opaca, seca

Olor a cabra

Descripción:

Es la sensación olfatoria asociada con la especie caprina percibida al oler la muestra en forma directa. Es detectado cuando sus componentes volátiles entran a la cavidad nasal y llegan a la mucosa olfatoria.

Manipulación:

Colocar la muestra cerca de la nariz e inspirar.

Objetivo:

Determinar la intensidad del olor a cabra.

Valores de referencia:

Intensidad	Descripción
10,00	Franco olor a cabra. Muy fuerte, extremadamente intenso.
8,75	Olor a cabra fuerte.
7,50	Olor intenso a cabra.
6,25	Olor a cabra moderado a intenso.
5,00	Olor a cabra moderado, es notorio sin ser extremadamente fuerte.
3,75	Olor a cabra leve a moderado.
2,50	Olor a cabra levemente perceptible.
1,25	Olor apenas perceptible.
0	Ausencia de olor a cabra, olor neutro.

Olor a manteca

Descripción:

Es la sensación olfatoria que recuerda a la manteca. Se percibe al oler la muestra en forma directa. Sensación a crema fresca de elevado tenor graso o manteca fresca.

Manipulación:

Colocar la muestra cerca de la nariz e inspirar.

Objetivo:

Detectar y cuantificar la intensidad de olor a manteca de las muestras.

Valores de referencia:

Intensidad	Descripción
10	Fuerte a intenso olor a manteca
7.5	Marcado olor a manteca
5	Moderado olor a manteca
2.5	Leve, suave olor a manteca
0	No se percibe olor a manteca, olor neutro



Otros olores presentes

Establo(1) Fecal(2) Rancio(3) Pintura(4) Cartón(5)

Otros (especifique)

- 1) Es la mezcla de olores de materia fecal y orina de bovinos, mezclado con olor a heno, paja, fardo.
- 2) Es el olor a heces de bovinos.
- 3) Olor fuerte que se adquiere con el tiempo, asociado con aceite oxidado, también descrito como olor a pescado.
- 4) Es el olor a esmalte sintético, especialmente a los solventes.
- 5) Es el olor a hojas guardadas por cierto tiempo en un lugar cerrado.

Borde de Corte

Descripción:

Estado del borde de corte, luego de introducir y sacar una cuchara con movimiento de corte en la muestra.

Manipulación:

Introducir la cuchara en forma vertical en la muestra y retirar en la misma forma. Observar los bordes del corte en cuanto a su superficie y su tendencia a cerrar el corte

Objetivo:

Determinar el estado del borde que queda luego de realizar un corte con una cuchara en la superficie de la muestra. Se evalúa cuanto fluye el producto para "borrar el corte". Tiene un componente de elasticidad/plasticidad.

Valores de referencia:

Intensidad	Descripción
10	Al retirar la cuchara quedan los bordes totalmente separados uno del otro, queda con estructura.
7.5	Al retirar la cuchara, los bordes tienden a quedar separados, aunque hacen algún movimiento para unirse.
5	Al retirar la cuchara los bordes no se unen inmediatamente aunque muestran tendencia a acercarse. Luego de un breve tiempo se unen aunque pueden persistir deformaciones o la unión ser incompleta.
2.5	Al retirar la cuchara los bordes se unen luego de un breve tiempo
0	Apenas retirada la cuchara los bordes se unen totalmente no quedando separación.

Adhesividad en la cuchara

Descripción:

Es la capacidad que tiene el alimento de adherirse a la superficie de un objeto cuando se introduce en ella.

Manipulación:

Introducir la cuchara en forma vertical en la muestra y retirar en la misma forma.

Objetivo:

Determinar la intensidad de adhesividad de las muestras.

Valores de referencia:

Intensidad	Descripción
10	Al retirar la cuchara el queso queda totalmente pegado a ésta
7.5	Al retirar la cuchara queda una capa de la muestra que tiende a desprenderse lentamente
5	Al retirar la cuchara queda una capa de queso que luego comienza a desprenderse
2.5	Al retirar la cuchara queda una fina capa que se desprende inmediatamente de retirar la cuchara.
0	Al retirar la cuchara no se observa ninguna partícula de queso unida a ésta

Untabilidad

Descripción:

Es la capacidad que tiene un alimento de distribuirse uniformemente en una superficie lisa al ejercer una fuerza tangencial a ella. Facilidad con que se esparce el producto sobre la superficie.

Manipulación:

Tomar una cucharada de producto y deslizar sobre una superficie lisa.

Objetivo:

Cuantificar la capacidad de extenderse de la muestra. Se valorará la homogeneidad del producto durante su extensión.

Valores de referencia:

Intensidad	Descripción
10	La muestra es extremadamente untuosa, se desliza de manera uniforme por toda la superficie
7.5	La muestra es muy untuosa y al deslizarse casi todo uniforme.
5	Bastante untuosa y relativamente uniforme la superficie
2.5	Dificultad para deslizarse y con cierta aspereza o granulosidad.
0	Al correr la cuchara, la muestra no se desliza en la superficie, se desgrana

Aspereza

Descripción:

Es el grado de aspereza/lisura que se siente en la mucosa bucal, principalmente en la lengua y paladar al colocar el alimento en la boca y deslizarlo en ella. Cantidad de irregularidades y gránulos que se siente en la mucosa bucal.

Manipulación:

Colocar el alimento en la boca y comprimir contra el paladar.

Objetivo:

Cuantificar el grado de aspereza/lisura de las muestras.

Valores de referencia:

Intensidad	Descripción
10	Extremadamente áspero, muy rasposo, totalmente granuloso
7.5	Es áspera y bastante granulosa
5	Liso y moderada cantidad de gránulos distribuidos uniformemente
2.5	Lisa y levemente granuloso
0	Se percibe totalmente liso la lengua y paladar (ausencia de partículas en la superficie)

Aroma a cabra

Descripción:

Es la sensación percibida por la mucosa olfatoria cuando el alimento se encuentra dentro de la boca.

Manipulación:

Al ingresar la muestra en la boca, cerrar los ojos y detectar (percibir) la sensación por vía retronasal.

Objetivo:

Determinar la intensidad del aroma a cabra.

Valores de referencia:

Intensidad	Descripción
10	Aroma a cabra muy fuerte, extremadamente intenso.
7.5	Aroma intenso a cabra.
5	Aroma a cabra moderado.
2.5	Apenas perceptible a cabra.
0	Ausencia al aroma de cabra, neutro.

Acidez

Descripción:

Es la sensación percibida por los receptores de acidez ubicados en la región posterior hacia lateral de la cavidad bucal. Estimulada por ácidos, como por ejemplo: cítrico, acético, fosfórico, etc.

Manipulación:

Colocar la muestra en la boca y desplazarla hacia los laterales (costados) de la lengua.

Objetivo:

Determinar el grado de acidez de la muestra.

Valores de referencia:

Intensidad	Descripción
10	La acidez aparece inmediatamente al ingresar el alimento a la boca y en forma extremadamente intensa y no desaparece hasta enjuagarse la boca.
7.5	Aparece inmediatamente al ingresar a la boca y es fuertemente ácida.
5	Aparece al mover la muestra en la boca percibiendo moderadamente ácido y desaparece luego de la deglución.
2.5	Se percibe una leve sensación que luego desaparece al deglutir el alimento.
0	A lo largo del desplazamiento del alimento dentro de la boca no se percibe sabor ácido.

Amargor

Descripción:

Es la sensación percibida por los receptores de gusto amargo ubicados en la parte posterior de la cavidad bucal, especialmente en la lengua. Es estimulado por sustancias tales como quinina y cafeína.

Manipulación:

Colocar la muestra en la boca y desplazarla hacia la parte posterior de la lengua y de la cavidad bucal.

Objetivo:

Determinar el grado de amargor de la muestra.

Valores de referencia:

Intensidad	Descripción
10	Inmediatamente de colocar el alimento en la boca y hasta luego de su deglución persiste una fuerte sensación de amargor que no desaparece hasta enjuagarse la boca.
7.5	Persiste un intenso amargo aún luego de enjuagarse la boca.
5	Moderado amargor al permanecer el alimento en la boca y desapareciendo al enjuagarse la boca.
2.5	Levemente amargo.
0	No se presenta nada de sabor amargo.