

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**“LACTOCOCCUS LACTIS AUTÓCTONO: EFECTO ANTILISTERIAL E  
INFLUENCIAS SOBRE LAS PROPIEDADES SENSORIALES EN QUESOS TIPO  
CUARTIROLO”**

por

**Álvaro GONZÁLEZ REVELLO<sup>1</sup>**



**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**



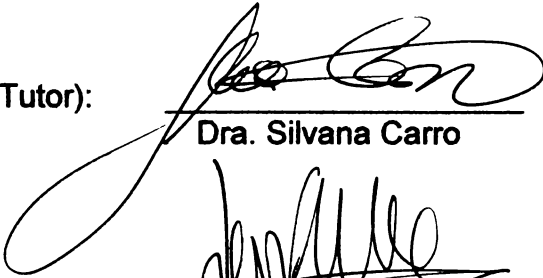
FV-29487

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

Presidente de Mesa:

  
Dr. Pablo Zunino

Segundo Miembro (Tutor):

  
Dra. Silvana Carro

Tercer Miembro:

  
Dr. Jorge Fernández

Co-tutor:

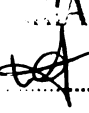
  
Dr. Ariel Aldrovandi

Autor:

  
Br. Álvaro González

Fecha:

19 de abril de 2012

TAQUENIA  
Aprobado: (doce) 12 

29487

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por su apoyo e incentivo continuo.

A Silvana y Ariel por haberme dado la oportunidad de hacer mi trabajo final y su paciencia en todo este tiempo.

A mis amigas del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche: Lucía, Sheila y Karina por su apoyo en diferentes etapas del trabajo.

A mis amigas, amigos, compañeras y compañeros de facultad por los momentos vividos en todos estos años. Especialmente a Nicolle compañera de exámenes durante toda la carrera.

Al Técnico en Lechería Pablo Bouchard por su continua disposición y asesoramiento.

A la Prof. Adjunta Silvia Gallo, Departamento Educación Veterinaria, Área Inglés, por la traducción del Resumen.

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	8
SUMMARY .....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	10
Importancia de la quesería artesanal en Uruguay .....	10
Enfermedades transmitidas por los alimentos .....	10
Características generales del género <i>Listeria</i> .....	11
Características de crecimiento .....	13
Presencia de <i>L. monocytogenes</i> en productos lácteos .....	14
Listeriosis transmitida por alimentos .....	14
Alimentos asociados a Listeriosis.....	15
Población de riesgo .....	15
Manifestaciones clínicas.....	16
Brotos de Listeriosis .....	16
Bioconservación.....	18
Bacterias ácido lácticas.....	18
Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas.....	20
Ácidos orgánicos .....	21
Peróxido de Hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	21
Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ).....	22
Etanol .....	22
Diacetil y acetaldehído .....	22
Bacteriocinas .....	23
Definición y clasificación.....	23
Espectro de acción.....	25
Aplicación tecnológica .....	26
BAL: características sensoriales de quesos .....	27
HIPÓTESIS .....	28
OBJETIVOS .....	28
Objetivo general .....	28
Objetivos específicos .....	28
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
Diseño experimental .....	29
Determinaciones y técnicas analíticas .....	30
Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento .....	30
Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	30
Curva de crecimiento, capacidad de fermentación y efecto inhibitorio de <i>Lactococcus lactis</i> en leche.....	32
Producción del cultivo adjunto de <i>Lactococcus lactis</i> para su aplicación en la elaboración de quesos .....	33
Determinación de dosis de los cultivos a aplicar .....	33
Elaboración de queso tipo Cuartirolo.....	34
Determinación de calidad composicional, fisicoquímica y microbiológica de leche y quesos elaborados .....	34
Contaminación de quesos tipo Cuartirolo con <i>Listeria innocua</i> .....	35
Cuantificación de <i>L. innocua</i> en quesos tipo Cuartirolo.....	36

Determinación de pH y actividad bacteriocinogénica en quesos.....	36
Comparación de características sensoriales de los quesos elaborados .....	37
Análisis estadístico.....	37
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de las cepas utilizadas en la elaboración de quesos .....	38
Curva de crecimiento, capacidad de fermentación y efecto inhibitorio de <i>Lactococcus lactis</i> en leche .....	39
Producción del cultivo starter de <i>Lactococcus lactis</i> para su aplicación en la elaboración de queso.....	41
Determinación del inóculo de los cultivos a aplicar.....	41
Controles durante el proceso de elaboración de queso tipo cuartirolo .....	41
Determinación de calidad de la leche utilizada y de quesos elaborados .....	42
Cuantificación de <i>Listeria innocua</i> durante la maduración de los quesos.....	44
Determinación de pH y actividad bacteriocinogénica en quesos .....	46
Comparación de características sensoriales de los quesos elaborados.....	47
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
Curva de crecimiento en leche: capacidad de fermentación y efecto inhibitorio de <i>Lactococcus lactis</i> .....	49
Calidad de leche y de quesos elaborados.....	50
Efecto antilisterial durante la maduración del queso tipo cuartirolo .....	50
Actividad bacteriocinogénica de <i>Lactococcus lactis</i> en quesos .....	50
Evaluación sensorial de quesos tipo cuartirolo .....	51
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Cuadro I.</b> Clasificación de microorganismos patógenos.....	11
<b>Cuadro II.</b> Algunas Características diferenciales de <i>Listeria</i> spp. ....	12
<b>Cuadro III.</b> Prevalencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en diferentes tipos de productos lácteos en países europeos.....	16
<b>Cuadro IV.</b> Bacterias ácido lácticas presentes en leche y productos lácteos..	19
<b>Cuadro V.</b> Principales bacteriocinas y microorganismos productores utilizados en la industria.....	25
<b>Cuadro VI.</b> Algunas de las principales bacteriocinas y su espectro de actividad antimicrobiana.....	26
<b>Cuadro VII.</b> Tratamientos en la elaboración de queso tipo Cuartirolo.....	29
<b>Cuadro VIII.</b> Evaluación de actividad antagonista de cultivos frente a <i>Listeria innocua</i> y <i>monocytogenes</i> .....	38
<b>Cuadro IX.</b> Efecto antilisterial in vitro de los sobrenadantes de <i>Lactococcus lactis</i> sometidos a diferentes tratamientos.....	39
<b>Cuadro X.</b> Efecto inhibitorio de <i>Lactococcus lactis</i> sobre <i>Listeria innocua</i> en leche.....	41
<b>Cuadro XI.</b> Controles del proceso de elaboración del queso tipo Cuartirolo....	42
<b>Cuadro XII.</b> Análisis de composición de la leche destinada a la elaboración de queso tipo Cuartirolo.....	42
<b>Cuadro XIII.</b> Análisis de calidad de la leche destinada a la elaboración de queso tipo Cuartirolo.....	43
<b>Cuadro XIV.</b> Análisis microbiológicos de la leche destinada a la elaboración de queso tipo Cuartirolo.....	43
<b>Cuadro XV.</b> Análisis fisicoquímicos y microbiológicos de quesos tipo Cuartirolo.....	44
<b>Cuadro XVI.</b> Cuantificación de <i>Listeria innocua</i> durante la maduración de los quesos mediante la técnica del NMP.....	44
<b>Cuadro XVII.</b> Resultado del recuento de <i>L. innocua</i> (Log ufc/g) durante la maduración del queso tipo Cuartirolo (efecto tiempo).....	45
<b>Cuadro XVIII.</b> Análisis de pH durante la maduración de los quesos T1 y T2...	46

<b>Cuadro XIX. Detección de actividad bacteriocinogénica <i>in vitro</i> en quesos (T1 y T2) durante la maduración.....</b>	<b>46</b>
<b>Cuadro XX. Evaluación sensorial de quesos tipo Cuartirolo.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 1. Actividad antimicrobiana de las BAL: diversos factores.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 2. Diseño experimental: tratamientos y división de lotes de queso tipo Cuartirolo para sus posteriores evaluaciones.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 3. Ensayo de detección de actividad antimicrobiana por la técnica “agar well difusión”.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 4. Flujograma general de elaboración de quesos tipo Cuartirolo.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 5. Actividad antagônista de <i>Lactococcus lactis</i> frente a los indicadores <i>Listeria innocua</i> y <i>monocytogenes</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 6 (a). Curva de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> en leche a 35° C.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 6 (b). Capacidad de fermentación a 35° C de <i>L. lactis</i> en leche: pH y acidez titulable.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 7. Cuantificación de <i>Listeria innocua</i> durante la maduración del queso tipo Cuartirolo.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 8. Detección de actividad antimicrobiana en los sobrenadantes neutralizados obtenidos a partir de: cultivo adjunto de <i>L. lactis</i> en leche (Escalado); Quesos durante la maduración (tiempo 0, tiempo 1 y tiempo 2). Controles positivo (+) y negativo (-).....</b>	<b>47</b>

## RESUMEN



Las bacterias ácido lácticas (BAL) forman parte de la microbiota natural de la leche y son componentes fundamentales de muchos cultivos iniciadores (*starters*) utilizados en la elaboración de quesos. La tendencia actual en la industria alimentaria es la bioconservación, la que tiene gran aceptabilidad entre los consumidores dado que resulta una alternativa atractiva para reemplazar la utilización de conservantes químicos. Las BAL con frecuencia presentan actividad antimicrobiana por lo que son consideradas para formar parte de cultivos bioprotectores. Dicha actividad se basa en la producción de diferentes sustancias entre ellas, las bacteriocinas (péptidos con actividad antimicrobiana), las cuales pueden ser producidas *in situ* en el proceso de elaboración quesera. El espectro de acción de algunas bacteriocinas de las BAL incluye microorganismos como *Listeria monocytogenes*, patógeno emergente asociado a los alimentos, el que representa un serio peligro para la salud pública. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antilisterial de una BAL autóctona en quesos tipo Cuartirolo, así como determinar si su aplicación modificaba las propiedades sensoriales en el mismo. Se utilizó un diseño experimental con dos tratamientos: el primero utilizando como cultivo adjunto *Lactococcus lactis* autóctono GU967439 con comprobada actividad antilisterial (T1) y el segundo que no lo incluía (T2) el que fue Control. Los quesos elaborados de ambos tratamientos se dividieron en dos lotes, uno para comprobar el efecto antilisterial y el otro para la evaluación de las propiedades sensoriales. Se inoculó con *Listeria innocua* quesos de cada uno de los tratamientos y se procedió a su cuantificación a las 2 h (t0), 7 días (t1) y 14 días (t2). En relación a la evaluación sensorial se utilizó una técnica sensorial descriptiva. Los resultados obtenidos permitieron comprobar que *Lactococcus lactis* GU967439 tiene actividad antagonista *in vitro* frente a *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*. Con respecto a la cuantificación de *Listeria innocua* durante la maduración de los quesos existieron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, la aplicación del cultivo adjunto de *Lactococcus lactis* GU967439 no logró producir un efecto bioprotector en el período evaluado (14 días). A excepción del sabor salado las propiedades sensoriales de los quesos no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos.



## **SUMMARY**

Lactic acid bacteria (LAB) are part of milk natural microbiota and are essential components of many starter cultures used in cheese making. The current trend in food industry is biopreservation, which has great acceptability among consumers because it is an attractive alternative to replace the use of chemical preservatives. LAB frequently exhibit antimicrobial activity and are therefore considered to be part of bioprotective cultures. Such activity is based on the production of various substances including bacteriocins (peptides with antimicrobial activity), which can be produced *in situ* in the cheese making process. The range of action of some LAB bacteriocins includes microorganisms such as *Listeria monocytogenes*, an emerging pathogen associated with food, which is a serious danger to public health. The aim of this study was to evaluate the antilisterial effect of a native LAB in Cuartirolo-like cheese and determine if their use altered the sensory properties of that cheese. The experimental design used for this purpose consisted of two treatments: the first, using native *Lactococcus lactis* GU967439 with proven antilisterial activity as adjunct culture (T1) and the second not included used as control (T2). Both kinds of Cheeses were divided into two lots, one to test the antilisterial effect and the other for the evaluation of the sensory properties. Cheeses of each treatment were inoculated with *Listeria innocua* and it was quantified after the first 2 h (t0), and then on day 7 (t1) and on day 14 (t2). Regarding sensory evaluation a descriptive sensory technique was used. The obtained results allowed to verify that *Lactococcus lactis* GU967439 has antagonistic activity *in vitro* against *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. Concerning the quantification of *Listeria innocua* during cheese ripening there were significant differences between treatments. However, implementation of *Lactococcus lactis* GU967439 as adjunct culture failed to produce a bioprotective effect during the evaluation period (14 days). Regarding sensory properties no significative differences were found between both cheeses with the exception of the salty taste.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **IMPORTANCIA DE LA QUESERÍA ARTESANAL EN URUGUAY**

La elaboración de quesos en nuestro país comienza con la inmigración europea a partir del año 1861. La mayor parte de los inmigrantes provenían de regiones productivas agrícolas ganaderas de Italia, Alemania, Francia, Austria, España, y fundamentalmente de Suiza, quienes trajeron consigo la cultura quesera de los Alpes (Borbonet, 2001).

En Uruguay la producción de quesos en estos últimos años muestra un aumento sostenido (63753 ton en el 2010 lo que significa más del doble con respecto al 2003). Aproximadamente el 68% de este volumen se destina a la exportación, siendo que el 30% corresponde a quesos de pasta blanda (entre 46% y 59,9% de humedad), dentro de los que se encuentra el queso Cuartirolo. En lo que respecta al consumo de este producto la participación del queso artesanal en el mercado interno compite con el consumo de queso industrial siendo aproximadamente el 50% del queso consumido de origen artesanal (DIEA, 2011). Desde 1990 la quesería artesanal acompañó el crecimiento de la cadena lechera, constituyéndose en un subsector de la producción agropecuaria que fue demostrando su inserción. Entre las dificultades que se señalan como más frecuentes están los problemas relativos a la sanidad del ganado, a la infraestructura de los tambos y queserías, así como los hábitos de higiene en la elaboración del queso. Esta situación repercute en la tan buscada inocuidad de un producto de alto valor proteico (Anchieri y col., 2007).

Una de las características de las queserías artesanales es que muchas de ellas utilizan fermentos lácticos naturales, generados a partir de leche o suero, los cuales están constituidos por asociaciones microbianas complejas de las que no se conoce en detalle su composición (Mannu y Paba, 2002; Núñez, 2006; Terzic-Vidojevic y col., 2007). La microbiota natural de la leche es el principal factor responsable de las características sensoriales en quesos elaborados a partir de leche cruda (Randazzo y col., 2006).

No obstante, los quesos elaborados con leche cruda se asocian con un mayor riesgo microbiológico dada la posible presencia de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* (Latorre y col., 2009; O'Brien y col., 2009; Rosengren y col., 2010). Es por esta razón, que es imprescindible la pasteurización de la leche como uno de los puntos críticos para evitar la ocurrencia de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA).

### **ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS**

Se definen como Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA): el síndrome originado por la ingestión de alimentos y/o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población (OPS, 2002).

Existen dos categorías de ETA: las intoxicaciones alimentarias causadas por toxinas producidas por los microorganismos y las infecciones alimentarias causadas por el crecimiento de los microorganismos en el cuerpo humano después de haber ingerido alimentos contaminados (Rey y Silvestre, 2005).

Según Rey y Silvestre (2005), los microorganismos causantes de ETA se los puede agrupar en dos categorías (Cuadro I).

**Cuadro I. Clasificación de microorganismos patógenos (Rey y Silvestre, 2005)**

Clásicos	Emergentes
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Shigella</i> spp.	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>E. coli</i> O157:H7
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Clostridium botulinum</i>	
<i>Clostridium perfringens</i>	

A pesar que la transmisión de estas enfermedades es un fenómeno ya conocido desde hace algún tiempo y en todo el mundo se ha constatado el aumento de su frecuencia, así como cambios en las etiologías predominantes y en la dinámica epidemiológica. De este modo, se han producido fenómenos mundiales tales como la reaparición del cólera, el aumento de la frecuencia de *Salmonella enteritidis* y otros agentes como *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* (Brown, 2010).

En este contexto la importancia de *L. monocytogenes* se debe a que está ampliamente extendida en el ambiente, en alimentos y es una de las bacterias denominada emergente dado su reconocimiento como productora de “nuevos” problemas de la salud pública (Rey y Silvestre, 2005).

#### CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO LISTERIA

El género *Listeria* pertenece a la subrama de *Clostridium* junto con *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Brochothrix*. Las características de este género son: bacilos Gram positivos, no esporulados, no acidorresistentes, aerobios o anaerobios facultativos, catalasa positiva y que producen ácido láctico a partir de glucosa y de otros azúcares. Se admiten seis especies de *Listeria* y algunas características que las diferencian se detallan en el Cuadro II. La antigua especie *L. murrayi* ha sido fusionada con *L. grayi* (Jay, 2002) y a excepción de esta última, todas las demás especies son contaminantes de alimentos (Murray y col., 1999). Las seis especies de *Listeria* se caracterizan por poseer antígenos que dan origen a 17 serovariedades.

La principal especie patógena es *L. monocytogenes*, la que tiene 13 serotipos (serotipada en base a sus antígenos O y H) todos patógenos para el hombre. Sin embargo, sólo tres de éstos (1/2a, 1/2b y 4b) son responsables de más del 90% de los casos de listeriosis en humanos (Ward y col., 2004).

**Cuadro II. Algunas Características diferenciales de *Listeria* spp. (Jay, 2002)**

Especie	Producción de ácido a partir de:					Hemólisis beta
	D-xilosa	Lactosa	Galactosa	Ramnosa	Manitol	
<i>L. monocytogenes</i>	-	Reacción variable	Reacción variable	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	+	-	Reacción variable	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+			-	-	
<i>L. welshimeri</i>	+			Reacción variable	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	Reacción variable	-	-	+
<i>L. grayi</i>	-	+	+	-	+	-

Aunque *L. innocua* está representada por tres serovariedades, en general es considerada la variante apatógena de *L. monocytogenes* (Jay, 2002).

*Listeria monocytogenes* es un bacilo corto de 0,4 a 0,5 µm de diámetro y 0,5 a 2 µm de longitud, presentando extremos redondeados. Es un microorganismo desprovisto de cápsula, psicrótrofo y asociado a infecciones transmitidas por alimentos (Farber y Peterkin, 1991). Se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente y ha sido aislada de una gran variedad de lugares como el suelo, lodo, materia vegetal en descomposición, tierra, heces de animales, aguas residuales, ensilados y en el agua (Jay, 2002).

El término "*monocytogenes*" se debe a que hace varias décadas se demostró que los extractos fenólico acuosos de células de *L. monocytogenes* inducían la producción de monocitos, lo que se denominó: factor de la actividad productora de monocitos (MPA), dándole el nombre a esta especie (Jay, 2002).

*L. monocytogenes* se desarrolla intracelularmente y es el agente causal de Listeriosis, enfermedad infecciosa grave que afecta al hombre y los animales. Puede infectar a un amplio número de especies entre las que se encuentran los mamíferos, las aves, los peces y los crustáceos. La mayoría de casos de listeriosis clínica tienen lugar en rumiantes, los cerdos raras veces desarrollan la enfermedad y generalmente las aves son portadoras subclínicas del microorganismo. La mayor parte de las infecciones en animales son subclínicas, pero la listeriosis puede producirse esporádicamente o de forma epidémica. Además del impacto económico de la listeriosis en animales, existe una conexión entre los animales y su papel como fuente de infección para el hombre debido al consumo de productos animales contaminados. La infección puede deberse al contacto directo con animales infectados especialmente durante el parto de vacas u ovejas. Sin embargo estas infecciones son muy raras (OIE, 2008).

Aunque suele ser considerada dentro de las zoonosis la mayoría de los casos se presentan en áreas urbanas sin antecedentes de contacto con animales. Los datos epidemiológicos implican a los alimentos como el vehículo más común para la transmisión de la listeriosis humana (OPS, 2002).

### Características de crecimiento

Las necesidades nutritivas de *Listeria* son las típicas de otras muchas especies de bacterias Gram positivas. Si bien la mayoría de las mismas se han definido para *L. monocytogenes*, se cree que las demás especies tienen necesidades nutritivas parecidas. *Listeria* spp. necesita al menos cuatro vitaminas del grupo B (biotina, riboflavina, tiamina y ácido teicoico), así como también los aminoácidos: cisteína, glutamina, isoleucina, leucina y valina. Las especies de *Listeria* se parecen a la mayoría de los enterococos por ser capaces de hidrolizar la esculina, crecen en presencia de 10 a 40% de bilis, en aproximadamente 10% de NaCl, en medios con un 0.025% de acetato de talio o con 0.04% de telurito potásico, pero a diferencia de los enterococos no crecen en presencia de 0.02% de azida sódica. A diferencia de la mayoría de las demás bacterias Gram positivas, crecen en agar de MacConkey. Si bien el hierro es importante en su crecimiento *in vivo*, parece ser que *L. monocytogenes* no posee compuestos específicos que fijen el hierro y satisface sus necesidades mediante movilización reductora del hierro libre, que se une a receptores de superficie (Jay, 2002).

**Efecto de la temperatura:** El rango en el que *L. monocytogenes* crece es de particular interés en los procesamientos de alimentos, ya que este microorganismo tiene características de psicrótrofo y mesófilo. Bajo condiciones de laboratorio se reportó que *L. monocytogenes* crece a temperaturas entre 3°C a 45°C, con un crecimiento óptimo entre 30 y 37°C. A pesar que *L. monocytogenes* no crece a menos de -1.5°C puede sobrevivir a temperaturas mucho menores. Sin embargo, el almacenamiento a temperaturas de freezer (-18 °C) puede causar una reducción de la población viable de *L. monocytogenes*. Además esta última puede permanecer viable más que cualquiera *Listeria* spp. durante el almacenamiento prolongado a temperaturas bajo cero (Rey y Silvestre, 2005).

**Efecto del pH:** *L. monocytogenes* puede crecer en medios con pH entre 5,6 a 9,6, con un óptimo de crecimiento en el pH neutro a algo alcalino. El crecimiento de *Listeria* a valores bajos de pH está influenciado por la temperatura de incubación y el tipo de ácido añadido al medio. Cuando el pH del caldo con soja y triptosa se ajustó a valores ácidos se comprobó que el pH mínimo de crecimiento de cuatro cepas de *L. monocytogenes* dependía del ácido que se utilizaba. Al mismo pH la actividad antimicrobiana en el citado medio, en orden de mayor a menor, fue ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico y por último ácido clorhídrico (Rey y Silvestre, 2005)

**Actividad de agua (Aw):** Como en la mayoría de las especies de bacterias la Aw óptima para *L. monocytogenes* es 0,97. Sin embargo, cuando se compara con otros patógenos que crecen en alimentos, esta bacteria tiene la habilidad de multiplicarse a valores de Aw tan bajos como 0,90 (Rey y Silvestre, 2005).

Tolerancia y sensibilidad a los métodos de conservación: Según Doyle y col. (2001), los resultados publicados sobre la termorresistencia de *L. monocytogenes* son contradictorios, existiendo trabajos de la OMS que llegan a la conclusión de que la pasteurización es un tratamiento seguro que reduce el número de *L. monocytogenes* en la leche fresca hasta niveles que no suponen un riesgo apreciable para la salud humana.

Este microorganismo ha desarrollado diferentes mecanismos para sobrevivir bajo condiciones relativamente extremas de pH, salinidad y temperatura (Vignolo y col., 2000; Larraín y Carvajal, 2008). Tiene la capacidad de desarrollarse a temperaturas desde -18° a 10°C por lo que puede ser transmitida incluso a través de alimentos refrigerados o congelados. *Listeria monocytogenes* es destruida a través de la pasteurización y por la mayoría de los agentes desinfectantes (Gandhi y Chikindas, 2007).

En definitiva, su amplia distribución en el ambiente, habilidad para crecer a temperaturas de refrigeración, capacidad de multiplicarse en valores bajos de pH y una tolerancia a niveles elevados de NaCl hacen que sea un patógeno de difícil control en los alimentos.

### Presencia de *L. monocytogenes* en productos lácteos

Según Husu y col., (1990) la leche cruda es una fuente de *L. monocytogenes* ya que fue aislada en 2.5% de muestras de tanques de almacenamiento en frío. A su vez la leche pasteurizada debe mantenerse en refrigeración y de existir una recontaminación con *L. monocytogenes*, que puede estar presente en el ambiente, acarrearía un gran aumento de ésta, ya que en tan sólo una semana conservada a 6-7 °C alcanzaría niveles de 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonia (ufc)/mL (Lovett y col., 1987).

Se ha observado que *L. monocytogenes* presente en leche utilizada para la elaboración de diferentes tipos de quesos sobrevive al proceso debido entre otros factores a su resistencia al calor (hasta 40-45 °C), al frío (4-6 °C) y su tolerancia a la sal. Durante la coagulación de la leche, las bacterias se concentran en la cuajada y dependiendo del tipo de queso, pueden crecer (queso Feta), destruirse (queso Cottage), desaparecer paulatinamente (queso Cheddar), crecer bien (Camembert) y ocasionalmente su número puede disminuir rápidamente en la maduración y luego estabilizarse (quesos Azules). Las razones de este comportamiento aún se desconocen (Genigeorgis y col., 1991).

### LISTERIOSIS TRANSMITIDA POR ALIMENTOS

Aunque la Listeriosis fue descubierta en Suecia en 1911 y se confirmó su patogenicidad en el hombre en 1929, no fue sino hasta la década de 1980 en que la importancia de los alimentos como vía primaria de transmisión fue reconocida. Esto ocurre cuando se produjeron en Norteamérica y Europa varios brotes importantes de listeriosis de origen común (FAO/OMS, 2004).

La listeriosis transmitida por alimentos es una enfermedad relativamente poco común, pero grave, con tasas de letalidad altas (20-30%), comparadas con las de otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, como por ejemplo *Salmonella*.

Al igual que otras ETA, se ve favorecida por las migraciones y el turismo, el consumo de los alimentos fuera de los hogares, la mayor longevidad de las personas, el hacinamiento urbano y el deficiente saneamiento ambiental, entre otras razones (Rey y Silvestré, 2005).

### Alimentos asociados a Listeriosis

A pesar de que son muchos y diversos los alimentos que pueden contaminarse con *L. monocytogenes*, las epidemias y los casos esporádicos de listeriosis están predominantemente asociados a alimentos listos para el consumo (LPC).

*L. monocytogenes* se ha aislado en alimentos tales como las hortalizas crudas, la leche cruda y la leche líquida pasteurizada, los quesos (en especial los blandos), el helado, la mantequilla, los embutidos de carne cruda fermentados, la carne aviar cruda y cocida, las carnes crudas y elaboradas y el pescado crudo, conservado y ahumado. Cuando *L. monocytogenes* está presente inicialmente en cantidades pequeñas en un alimento contaminado, el microorganismo podría multiplicarse durante el almacenamiento en los alimentos que brindan condiciones óptimas para su proliferación, incluso a temperaturas de refrigeración (FDA/CFSAN, 2003).

Aunque la listeriosis es una enfermedad relativamente poco común, su gravedad y el hecho de que esté muy frecuentemente asociada a alimentos de elaboración industrial, especialmente cuando se producen epidemias, la sitúan entre las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia social y económica (Roberts, 1989; Roberts y Pinner, 1990, citados por FAO/OMS, 2004).

### Población de riesgo

La enfermedad afecta principalmente a segmentos específicos de la población cuya vulnerabilidad es mayor. Básicamente, *L. monocytogenes* es un patógeno oportunista que casi siempre afecta a personas con una enfermedad o circunstancia subyacente grave (por ejemplo, inmunodepresión, VIH/SIDA, afecciones crónicas) a mujeres embarazadas; a fetos y recién nacidos; y a personas mayores (FAO/OMS, 2004). La dosis infectante de *L. monocytogenes* no se conoce muy claramente y se cree que puede variar con la cepa y la susceptibilidad del huésped. Los alimentos implicados han presentado concentraciones de *L. monocytogenes* superiores a  $10^3$  ufc/g, pero en algunos casos la concentración de *L. monocytogenes* observada en el alimento ha sido considerablemente menor (FAO/OMS, 2004). De los casos constatados de Listeriosis asociados al consumo de leche cruda o pasteurizada, se puede asumir que en personas susceptibles menos de 1.000 bacterias pueden causar la enfermedad (FDA/CFSAN, 2003). Se cree que el 5% de los seres humanos pueden ser portadores asintomáticos de *Listeria monocytogenes*, porcentaje que podría ser mayor en operarios de mataderos (Rey y Silvestre, 2005).



## Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas pueden agruparse en dos categorías: listeriosis invasiva y listeriosis no invasiva. La primera se refiere a los casos en que una infección inicial del tejido intestinal por *L. monocytogenes* deriva en la invasión de partes del organismo como el útero grávido, el sistema nervioso central, la sangre o combinaciones de éstos. La misma se caracteriza por una tasa de letalidad alta, de 20 a 30% y las infecciones pueden producir secuelas, aunque la incidencia de éstas pocas veces se determina. Los casos de listeriosis no invasiva (conocida como gastroenteritis febril) se han observado en algunos brotes, en los que la mayoría de los casos presentaron síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgia, tras un período de incubación corto. Estos brotes se han producido generalmente tras la ingestión de dosis altas de *L. monocytogenes* por personas previamente sanas (FAO/OMS, 2004).

## Brotos de Listeriosis

Durante los últimos 20 años ha sido la causa de varios de los principales brotes de ETA en USA, Canadá, Suiza, Austria, Francia e Inglaterra. Estudios realizados por la Comisión Europea revelaron entre los años 1991 a 2002 un total de 19 brotes de listeriosis invasiva. Los alimentos relacionados a éstos fueron: productos cárnicos procesados, quesos, productos de pescado procesados, manteca y otros en los que no se determinó el origen (Simjee, 2007). Según Lúnden y col., 2004, los productos lácteos han sido asociados con aproximadamente la mitad de los brotes de listeriosis en Europa y en su mayoría se vincularon con el consumo de leche cruda o productos elaborados a partir de leche no pasteurizada (Cuadro III).

**Cuadro III. Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en diferentes tipos de productos lácteos en países europeos (Lundén y col., 2004)**

Producto	Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> (%)	País de Origen
Leche Cruda	4,4	Países Bajos
Leche Cruda	3,6	Inglaterra y Gales
Leche Cruda	1,0	Suecia
Quesos de pasta blanda (elaborados con leche cruda)	65,0	Francia
Quesos de pasta blanda madurados	8,2	Inglaterra y Gales
Quesos de pasta blanda sin madurar	1,1	Inglaterra y Gales
Quesos de pasta blanda	6,0	Italia, Alemania, Austria y Francia
Quesos de pasta blanda o semi-blanda	6,0	Italia, Alemania y Francia
Quesos de pasta semi-blanda	8,0	Italia, Alemania, Austria y Francia
Quesos de pasta dura	1,5	Inglaterra y Gales
Quesos de pasta dura	4,5	Italia, Alemania, Austria y Francia
Helados	0,5	Finlandia



En EE.UU entre los años 1993 a 1998 este patógeno fue responsable del 71% de todos los retiros del mercado de productos alimenticios como consecuencia de que las normativas aplican tolerancia cero en la presencia de *Listeria* en productos listos para el consumo (Cotter y col., 2005). En ese país, entre los años 1998 a 2002 existieron 11 brotes relacionados a *Listeria monocytogenes*, los cuales implicaron un total de 256 casos de Listeriosis. Aunque *Listeria monocytogenes* sólo representó un 0,2% de todos los brotes de ETA que existieron en este período, fue el patógeno que presentó mayor tasa de mortalidad con un 43,2% (CDC, 2006). Recientemente, en el año 2011 se produjo un brote en varios estados relacionado al consumo de melones. De 146 infectados con *Listeria* 30 personas murieron como consecuencia de la infección (CDC, 2011).

En nuestro país los datos de la prevalencia de *Listeria monocytogenes* son escasos. El primer caso de neurolisteriosis fue descrito en un niño por Galiana, (1968) presentándolo como la primera observación de neurolisteriosis en la pediatría nacional. Según Conti, (2001) son varias las observaciones nacionales recientes de listeriosis con aislamiento del agente etiológico y que no han sido publicadas. OPS, (2002) reporta que durante el año 1998 se realizó la identificación de cepas de *Listeria* enviadas al laboratorio de Bacteriología y Virología de la Facultad de Medicina, procedentes del laboratorio de Bromatología de la Intendencia Municipal de Montevideo (IMM). De las 53 cepas aisladas de alimentos, 49 correspondieron al género *Listeria* y 21 de ellas fueron identificadas como *L. monocytogenes*. En el mismo año se recibieron 5 cepas de aislamiento clínico para su confirmación, 3 procedentes de infecciones en mujeres embarazadas y sus anexos ovulares y 2 de infecciones del sistema nervioso central en adultos. Aunque se trata de un estudio aislado, debe destacarse su presencia cuando se investigan alimentos, así como la causa de infecciones severas en el hombre.

En resumen *Listeria monocytogenes*, es un patógeno emergente que constituye un peligro para la salud pública y que presenta resistencia a los sistemas de conservación tradicionales, como la refrigeración o la acidificación. Dicha bacteria es de gran importancia en la industria láctea, ya que la leche cruda, pasteurizada y los quesos han estado implicados como vehículos importantes en la transmisión de listeriosis humana, sobre todo los quesos elaborados a partir de leche cruda. (FAO, OMS, 2004; Lendén y col., 2004). Si bien en nuestro país no existen datos publicados sobre su prevalencia, su presencia se ha constatado en varios alimentos (OPS, 2002). Desde hace un tiempo, la utilización de procedimientos sanitarios apropiados, los que se han denominado Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) con aplicación de tratamientos térmicos (pasteurización) son recomendados para prevenir entre otros, la contaminación de los alimentos con *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, en los alimentos mínimamente procesados y refrigerados, pueden ser necesarias estrategias adicionales para controlar el crecimiento y la supervivencia de este patógeno (Mcauliffe y col., 1999). En los últimos años han aparecido nuevas tendencias en la conservación de los alimentos, que incluyen el envasado al vacío, las atmósferas modificadas y el uso de bioconservadores (Doyle y col. 2001).

## BIOCONSERVACIÓN

En las últimas décadas se han observado importantes cambios en el área de la ciencia de los alimentos sumado a la creciente demanda de los consumidores por alimentos LPC y mínimamente procesados. A su vez existe un aumento en el conocimiento y conciencia de los riesgos derivados no sólo de los agentes patógenos transmitidos por los alimentos, sino también de aquellos que provienen de la utilización de conservantes químicos utilizados para su control (Rodríguez y col., 2003; Castellano y col., 2008).

Las primeras técnicas de conservación utilizadas se basaron en la destrucción de microorganismos no deseados a través de procesos como: secado, salazón, calor o fermentación. Estos métodos aún hoy se utilizan y se combinan como diversos obstáculos para inhibir el crecimiento de microorganismos, pero algunas de estas técnicas clásicas de preservación no son adecuadas para algunos alimentos entre los que se incluyen los productos listos para el consumo (LPC) (Rao y col., 2008). La necesidad de alternativas para extender la vida útil de los alimentos sin cambiar sus propiedades sensoriales ha puesto en marcha la investigación sobre tecnologías de bioconservación, que se basan en el uso de microorganismos no patógenos y/o sus metabolitos para retardar el deterioro de los alimentos y/o para mejorar la inocuidad de los mismos (Ross y col., 2002).

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 microbiota natural o sus metabolitos (Holzapfel y col., 1995; Stiles, 1996; Aymerich y Hugas, 1998; Hammes y Hertel, 1998; Devlieghere y col., 2004;). Muchos investigadores consideran que las bacterias ácido lácticas (BAL) son candidatas idóneas 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; Casaus y col., 1998; Devlieghere y col., 2004; Rodríguez y col., 2005).

## BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen parte de la microbiota natural de la leche, son un grupo de microorganismos de gran importancia desde el punto de vista aplicado y son los componentes fundamentales de muchos de los cultivos iniciadores utilizados en la industria alimentaria. Tradicionalmente han sido empleadas empíricamente o deliberadamente en la elaboración de diversos productos, entre los que se encuentran derivados lácteos como quesos, mantequilla, yogurt, etc. (Herrero y col., 1996) (Cuadro IV).

A pesar de que las BAL se consideraron como un grupo diferenciado a principios del siglo XX, es difícil definirlo porque engloba a microorganismos Gram-positivos muy heterogéneos, tanto desde el punto de vista morfológico como del filogenético. El rasgo común que caracteriza a las BAL es la propiedad metabólica de producir ácido láctico como único o principal producto final de la fermentación de una gran variedad de sustratos (Axelsson, 2004).

**Cuadro IV. Bacterias ácido lácticas presentes en leche y productos lácteos (Wood y Holzapfel, 1996)**

<b>LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS</b>	<b>BACTERIAS LÁCTICAS</b>
Quesos duros	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> y subsp. <i>lactis</i>
Queso Cottage	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> y subsp. <i>lactis</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Mantequilla fermentada, quesos con ojos	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> y subsp. <i>lactis</i> y var. <i>diacetilactis</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Queso tipo suizo	<i>Lactobacillus delbureckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lactobacillus helveticus</i>
Productos lácteos en general	<i>Lactobacillus brevis</i> ; <i>Lactobacillus buchnerii</i> ; <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> ; <i>Lactobacillus fermentum</i> ; <i>Lactobacillus plantarum</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Yogur	<i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetilactis</i>
Leche ácida	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Kefir	<i>Lactobacillus kefir</i> ; <i>Lactobacillus kefirianofaciens</i>

Las principales bacterias lácticas relacionadas con los alimentos y que poseen interés industrial pertenecen a los géneros *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Leroy y De Vuyst, 2004).

Las BAL son Gram positivas, normalmente inmóviles, no esporuladas, anaeróbicas facultativas, la mayoría no son sensibles al O<sub>2</sub> (pueden crecer tanto en su presencia como en ausencia del mismo), son por lo tanto anaerobios aerotolerantes. La mayoría de las cepas no poseen catalasa y eliminan el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante enzimas peroxidasa. Normalmente su capacidad biosintética es limitada y sus complejos requerimientos nutritivos incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Madigan y col., 1998).

De acuerdo al tipo de metabolismo fermentativo de carbohidratos, las bacterias lácticas se agrupan en dos categorías: homofermentativas y heterofermentativas (Jay, 2002). Las bacterias lácticas homofermentativas poseen las enzimas aldolasa y hexosaisomerasa pero carecen de fosfoetolasa. Degradan la glucosa y otras hexosas casi exclusivamente a ácido láctico, a través de la ruta de Embden-

**Meyerhof-Parnas (EMP).** Las bacterias lácticas heterofermentativas, poseen fosfoacetolasa pero carecen de aldolasa y hexosaisomerasa y en vez de utilizar la ruta metabólica de EMP, utilizan la ruta de las pentosas-fosfato. Así, catabolizan la glucosa y otras hexosas hasta ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético o etanol.

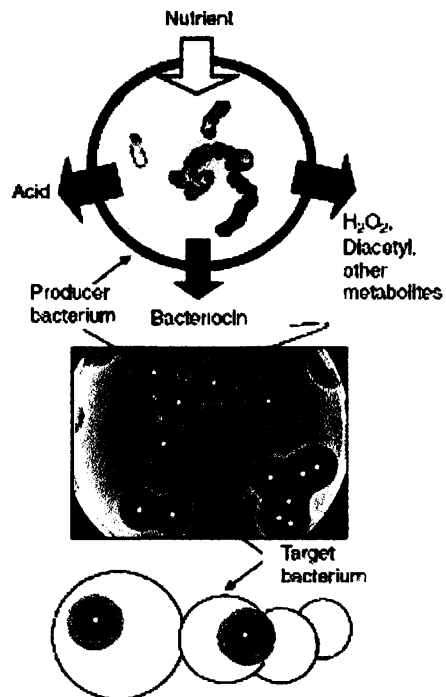
Por otra parte, las bacterias lácticas pueden utilizar como fuente de carbono diversos disacáridos entre otros, la lactosa y la sacarosa. Estos azúcares son transportados al interior celular mediante un sistema permeasa-dependiente de ATP o del sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (sistema PEP-PTS) y son hidrolizados a sus correspondientes monosacáridos; posteriormente, éstos son degradados a ácido láctico y otros metabolitos a través de alguna de las rutas metabólicas citadas anteriormente (Kandler, 1983).

Las BAL tienen un gran potencial para su uso en bioconservación debido a que son seguras para el consumo y a que durante el almacenamiento predominan en la microbiota de muchos alimentos. Las BAL son “generalmente reconocidas como seguras” o “generally recognized as safe” (GRAS) y su aplicación ha sido y es tradicional en las fermentaciones de alimentos (Castellano y col., 2008; Dall Bello y col., 2012).

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 que por el efecto antagonista microbiano (antibiosis) resulta una alternativa atractiva (Deegan y col., 2006).

#### **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

El principal factor en el que se basa la actividad antimicrobiana de las BAL es la producción de ácidos orgánicos (fundamentalmente ácido láctico), derivada de la fermentación de carbohidratos presentes en alimentos y la consecuente disminución del pH, a lo que se suma además, la competencia por nutrientes presentes en el sustrato. Estas bacterias pueden tener también la capacidad de producir sustancias inhibitorias tales como: peróxido de hidrógeno, diacetil, metabolitos de oxígeno y bacteriocinas entre otras (Figura 1) (Rodríguez y col., 2000; Carro y col., 2005). De estos compuestos antimicrobianos las bacteriocinas son a menudo los inhibidores más potentes relacionados con estas bacterias (Deegan y col., 2006).



**Figura 1. Actividad antimicrobiana de las BAL: diversos factores (Deegan y col., 2006)**

### Ácidos orgánicos

Una vez sintetizados los ácidos orgánicos a partir de la fermentación, éstos son liberados al medio extracelular donde además de contribuir a las características sensoriales y reológicas del alimento, inhiben o retardan el desarrollo de un gran número de microorganismos alterantes y/o patógenos, entre los que se incluyen *E. coli*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.* También se ha descrito que los ácidos orgánicos inhiben la germinación de las esporas de *Bacillus cereus* y *Clostridium tyrobutyricum* y el desarrollo de algunos hongos y levaduras. El efecto antimicrobiano neto de los ácidos orgánicos depende de la concentración y aumenta a bajos valores de pH. El mecanismo de acción de las formas no disociadas de los ácidos se basa en que éstas penetran en el interior de las células interfiriendo con funciones metabólicas esenciales como la traslocación de protones y sustratos, la fosforilización oxidativa y la disminución del pH intracelular. La producción de ácidos orgánicos constituye uno de los mecanismos más antiguos empleados para inhibir el desarrollo de bacterias Gram negativas (Citti, 2005).

### Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

En presencia de oxígeno las BAL producen peróxido de hidrógeno como resultado de la actividad de oxidasas. Puesto que estas bacterias son catalasa negativa, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede acumularse en el medio e inhibir el crecimiento de microorganismos. El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es variable y depende del grado de oxigenación del medio. La producción es mayor a bajas temperaturas, cuando la solubilidad del oxígeno es elevada y cuando los cultivos usados son mantenidos en constante agitación. A su vez el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede también reaccionar con otros componentes para formar sustancias inhibitoras. En leche cruda, el peróxido producido reacciona con el

tiocianato endógeno, el cual es catalizado por la lactoperoxidasa, para formar productos de oxidación intermediaria, que son inhibidores de microorganismos (Citti, 2005).

### Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)

La fermentación de azúcares por las bacterias heterofermentativas con producción de CO<sub>2</sub> contribuye a inhibición de otros microorganismos. El CO<sub>2</sub> ejerce una acción antimicrobiana frente a diversos microorganismos, creando condiciones de anaerobiosis en el sustrato que se produce, y además se genera un aumento de la presión de dióxido de carbono, verificándose una actividad específica antibacteriana.

Los microorganismos varían en su sensibilidad al CO<sub>2</sub>, mohos y bacterias Gram negativas oxidativas son más susceptibles, mientras que algunos *Lactobacillus* y levaduras poseen alta tolerancia. El mecanismo de inhibición es complejo, aunque se sabe que envuelve una combinación de efectos, como la reducción del pH intracelular, inhibición de reacciones enzimáticas y la interacción en la membrana celular impidiendo el transporte de solutos.

La inhibición de microorganismos por el CO<sub>2</sub>, es comprobada actualmente con la utilización en escala comercial de envases para productos alimenticios con atmósfera modificada y controlada (Citti, 2005).

### Etanol

El etanol es producido en bajas concentraciones por las BAL heterofermentativas y produce la deshidratación de la membrana celular al extraer los lípidos y reducir su permeabilidad. Los contenidos de etanol y ácido etanoico son inversamente proporcionales. Estos compuestos demuestran una contribución importante en los procesos fermentativos naturales cuando las bacterias heterofermentativas activas están presentes (Helander y col., 1997).

### Diacetil y acetaldehído

El diacetil es un producto final del metabolismo de BAL y es más conocido por el aroma a manteca que confiere a los productos fermentados de leche y también por su acción antimicrobiana. Las bacterias Gram negativas generalmente presentan gran sensibilidad. El uso del diacetil es limitado debido a que son necesarias dosis elevadas para la preservación. Además, su intenso aroma impide el uso en la mayoría de los alimentos, aunque existen estudios sugiriendo que concentraciones reducidas de diacetil pueden ser eficientes cuando se utilizan bajas temperaturas y que podría ser usado como antimicrobiano para utensilios y superficies operacionales debido a su alta volatilidad.

El acetaldehído es otro de los metabolitos antimicrobianos producido por las bacterias lácticas heterofermentativas a partir de los hidratos de carbono, siendo uno de los principales compuestos responsables por el aroma del yogur. La producción de este compuesto se atribuye al metabolismo del piruvato y a la reacción de la treonina aldolasa, que transforma la treonina en acetaldehído y glicina. El acetaldehído es reducido a etanol por la acción de la NAD-alcohol-dependiente deshidrogenasa, por lo que la ausencia o represión de esta enzima se traduce en la

secreción y acumulación de acetaldehído en el medio extracelular. La concentración de 10–100 ppm de acetaldehído inhibe el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos de la leche, como, entre otros, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *E. coli* (Citti, 2005).

## BACTERIOCINAS

### Definición y clasificación

Las bacteriocinas se definen como péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal, producidos por bacterias Gram positivas y Gram negativas segregados para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Joerger, 2003; Papagianni, 2003; Katikou, 2005; Motta y col., 2008; García y col., 2010).

Las bacteriocinas de las BAL son un grupo heterogéneo constituido mayoritariamente por péptidos de pequeño tamaño, generalmente catiónicos o anfipáticos, y derivados de propéptidos con un extremo N-terminal cargado negativamente. Han sido sometidas a diversas clasificaciones atendiendo a su estructura, tamaño molecular, presencia de aminoácidos modificados, modo de acción, estabilidad térmica, etc. (Arqués, 2003).

Diversos investigadores han buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas. A continuación se presenta la clasificación de estos compuestos propuesta por Kemperman y col., (2003). Algunas de las principales bacteriocinas y los microorganismos que las producen se resumen en el Cuadro V.

### Clase I: Lantibióticos

Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina,  $\beta$ -metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. Son estables al calor, péptidos policíclicos (< 5 KDa) con aminoácidos modificados.

Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina, la que fue descubierta en Inglaterra por Rogers y Whitter en 1928. Debido a su alta actividad bactericida y a que no es tóxica para los humanos, la nisina ha sido usada como conservante en alimentos por más de 50 años (Cruz-Chamorro y col., 2006). Es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, tiene actividad contra una relativa amplia gama de bacterias Gram positivas, incluyendo también esporas. Además, está autorizada en más de 45 países para ser usada como conservante alimentario (Stiles, 1993).

La nisina es un péptido catiónico, perteneciente al grupo A de los lantibióticos con actividad antimicrobiana que incluye varios patógenos Gram positivos, resistentes a varias drogas. Su biosíntesis se da durante la fase de crecimiento exponencial y se detiene completamente cuando las células entran en la fase estacionaria de crecimiento. Es un polipéptido de 34 aminoácidos que presenta características catiónicas e hidrofóbicas, con un peso molecular de 3500 Da, pertenece a la familia de lantibióticos debido a que contiene los grupos lantionina y metil-lantionina. Los aminoácidos inusuales deben ser los responsables de las importantes propiedades funcionales de la nisina, como lo son la tolerancia a la acidez, termo-estabilidad a bajo pH y una específica acción bactericida. Su mecanismo de acción es doble: por un lado se une al péptidoglicano e inhibe la síntesis de la pared celular, mientras que por otro lado, forma poros en la membrana citoplasmática. Sin embargo, la nisina es

poco soluble e inestable a pH mayores a 5 por lo que su utilización en alimentos es limitada. Este hecho ha impulsado la búsqueda de otras bacteriocinas (Stiles, 1993).

Pertencen además a este grupo otras bacteriocinas producidas por *L. lactis* como la lacticina 481 (Piard y col., 1992, citado por Arqués, 2003) y la lacticina 3147 (De Vuyst y Leroy 2007). Así como también la lactocina S producida por *Lb. sake* (Mortvedt y col., 1995, citado por Arqués, 2003) y la carnocina U149 producida por *Carnobacterium piscicola* (Stoffels y col., 1994, citado por Arqués, 2003).

Por otra parte, los lantibióticos en función de su estructura y modo de acción se subdividen en 2 grupos:

**Clase I A:** Péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y que engloban a los lantibióticos de un solo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total.

**Clase I B:** Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.

**Clase II:** No lantibióticos.

Son bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Son péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA- 1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina. Otras bacteriocinas pertenecientes al mismo incluyen algunas similares a la pediocina como las producidas por *L. lactis*: Lactococina MMFII, A (Diplococcina), B, G, M y 972 (Venema y col., 1995; Oppegård y col., 2007).

En este grupo se pueden identificar tres subclases:

**Clase II a:** Péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.

**Clase II b:** Formadores de complejos para la formación de poros que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G, M y las plantaricinas EF y JK entre otras.

**Clase II c:** péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

**Clase III**

Bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina J. V, acidofilicina A y lactacinas A y B.

**Clase IV**

Bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52).



## Clase V

Bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasicina A.

**Cuadro V. Principales bacteriocinas y microorganismos productores utilizados en la industria (Mess, 2003)**

<b>Bacteriocina</b>	<b>Clase</b>	<b>Microorganismo productor</b>
Nisina	I	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Pediocina PA-1	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92
Pediocina JD	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> JD1-23
Sakacina A	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> 706
Sakacina P	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> LTH673
Curvacina A	IIa	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174
Mesentericina Y105	IIa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Plantaricina E/F	IIb	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
Lactococcina A	IIb	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Lactococcina B	IIb	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4
Lactacina F	IIb	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Divergicina	IIc	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13
Helveticina	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>

### Espectro de acción

La efectividad de las bacteriocinas como conservantes en alimentos ha sido bien demostrada. Aunque las bacteriocinas son efectivas frente a patógenos transmitidos por los alimentos, como *L. monocytogenes*, no son antibióticos. Su síntesis y modo de acción las distinguen de los antibióticos usados con fines clínicos. Además, los microorganismos que presentan cierta resistencia a los antibióticos, generalmente no la tienen frente a las bacteriocinas y la resistencia a las bacteriocinas, casi siempre se determina genéticamente, lo que no ocurre con los antibióticos (Cleveland y col., 2001).

El espectro de acción antimicrobiana de algunas bacteriocinas de las BAL 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; Gurira y Buys, 2005). Algunas de las bacteriocinas más estudiadas y su espectro de actividad antimicrobiana se resumen en el Cuadro VI.

**Cuadro VI. Algunas de las principales bacteriocinas y su espectro de actividad antimicrobiana (Chen y Hoover, 2003)**

Bacteriocina	Espectro de Actividad
Nisina	Activo frente a diferentes especies de: <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>Listeria grayi</i> , <i>Listeria ivanovii</i> , <i>Listeria murrayi</i> , <i>Listeria seeligeri</i> , <i>Listeria welchimeri</i> y <i>Staphylococcus</i> spp.
Pediocina PA-1	Activo frente a diferentes especies de <i>Carnobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. ivanovii</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>B. cereus</i> y <i>Clostridium</i> spp.
Lacticina 3147	Activo frente a diferentes especies de <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus</i> spp. y <i>Clostridium</i> spp.
Lactococina MMFII	Activo frente a diferentes especies de <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> y <i>L. ivanovi</i> .
Lactocina S	Activo frente a diferentes especies de <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus cereus</i> y <i>Clostridium</i> spp

Generalmente su acción antimicrobiana no es eficaz 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 algunas de ellas como nisina y enterocinas en Gram negativas (Cutter y Siragusa, 1995; Helander y col., 1997).

#### Aplicación tecnológica

Las bacteriocinas constituyen una barrera muy útil, ya que actuarían sinérgicamente con otros tratamientos de conservación o tecnológicos y podrían compatibilizar la obtención de alimentos seguros. Esto determinaría una reducción considerable de las concentraciones de aditivos químicos empleados habitualmente y/o de la intensidad de los tratamientos tecnológicos aplicados, circunstancia de especial interés en alimentos mínimamente procesados (Chen y Hoover, 2003). Debido a que presentan determinadas características específicas tales como: naturaleza peptídica, que permite la degradación por enzimas digestivas y por tanto, resultan inocuas para el consumidor y su microbiota intestinal. Además algunas tienen propiedades fisico-químicas que las hacen resistentes a los tratamientos térmicos y/o cambios de pH. Este hecho sumado a su pequeño tamaño permite la difusión en sistemas semisólidos propios de la mayoría de las matrices alimenticias (Martínez, 1996).

Adicionalmente, las bacterias lácticas ofrecen la posibilidad de producir las bacteriocinas *in situ* durante el proceso de fabricación, por lo tanto, se podría evitar la adición directa de una preparación pura de la bacteriocina, que implicaría un mayor gasto económico (Martínez, 1996).

Antes de utilizar una BAL productora de bacteriocina como biopreservador, es necesario estudiar su eficacia para cada sistema de alimento en particular. Se deben determinar las concentraciones de bacteriocina requeridas para lograr un eficiente control de los patógenos transmitidos por alimentos, así como la capacidad de las cepas bacteriocinogénicas para su crecimiento y la producción de bacteriocina en la matriz alimentaria estudiada (Ananou y col., 2005).

Desde hace un tiempo y hasta el presente los estudios se centran en el aislamiento de BAL autóctonas productoras de bacteriocinas de leche y de quesos producidos en diferentes regiones del mundo. Así mismo se identifican esas bacteriocinas y se desarrolla su aplicación como *starter* o adjunto en elaboración de diversas variedades de quesos para verificar su poder antilisterial (Sulzer y Busse, 1991; McAuliffe y col., 1999; Stoyanova, y col., 2006; García-Almendárez y col., 2008; Alegría y col., 2010; Mendonça y col., 2010; Hartmann y col., 2011; Dal Bello y col., 2012).

#### BAL: características sensoriales de quesos

Las BAL juegan un rol relevante en la elaboración de quesos incrementando la diversidad de sabores y texturas. Además aquellas BAL nativas pueden caracterizar al queso de una región geográfica (Corroler y col., 1998; Albenzio y col., 2001; Wouters y col., 2002; Randazzo y col., 2009). En los quesos tradicionales no es sencillo adicionar cepas de bacterias que no forman parte de la microbiota autóctona, debido a que pueden influir negativamente en los microorganismos necesarios para obtener sus propiedades sensoriales y en la diversidad de estos productos. Por lo tanto, las cepas bacteriocinogénicas apropiadas para ser utilizadas como cultivos de protección en los quesos deben provenir de la microbiota autóctona (Trmcic y col., 2008).

Los compuestos de bajo peso molecular producidos a través de la glicólisis, proteólisis, lipólisis y las reacciones secundarias que tienen lugar a lo largo de la maduración del queso son los que más contribuyen al "*flavour*". Las actividades más importantes son derivadas de proteasas, peptidasas y esterases que transforman los componentes de la leche en compuestos de bajo peso molecular retenidos en la cuajada. Existen más de 600 compuestos volátiles identificados en quesos de diferentes variedades y muchos se han relacionado con el olor y aroma particulares (Kunji y col., 1996; Garde y col., 1997; Lane y Fox, 1997; Oumer y col., 2001; Garde y col., 2005).

Como la mayoría de las enzimas producidas por las BAL son intracelulares, la lisis celular favorecerá el acceso de las enzimas a sus sustratos y acelerarán presumiblemente la maduración del queso (Garde y col., 1997; Morgan y col., 1997; Oumer y col., 2001).

## **HIPÓTESIS**

- La utilización de *Lactococcus lactis* autóctono, como cultivo adjunto en la elaboración de quesos tipo Cuartirolo tiene efecto antilisterial.
- La utilización de *Lactococcus lactis* autóctono en la elaboración de quesos tipo Cuartirolo no modifica las propiedades sensoriales del queso.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto antilisterial y las propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartirolo elaborados con *Lactococcus lactis* autóctono productor de bacteriocinas como cultivo adjunto.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar *in vitro* la actividad bacteriocinogénica de *Lactococcus lactis* frente a *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*, previo a su aplicación como cultivo adjunto en el proceso de elaboración del queso.
- Evaluar el crecimiento de *Lactococcus lactis* y potencial efecto bacteriocinogénico en leche.
- Determinar efecto de inhibición de *Listeria innocua* (efecto antilisterial) en diferentes tiempos durante la maduración de quesos tipo Cuartirolo elaborados con *Lactococcus lactis* como cultivo adjunto.
- Comparar las características sensoriales de los tratamientos experimentales, para explorar sus posibles diferencias.

## MATERIALES Y MÉTODOS

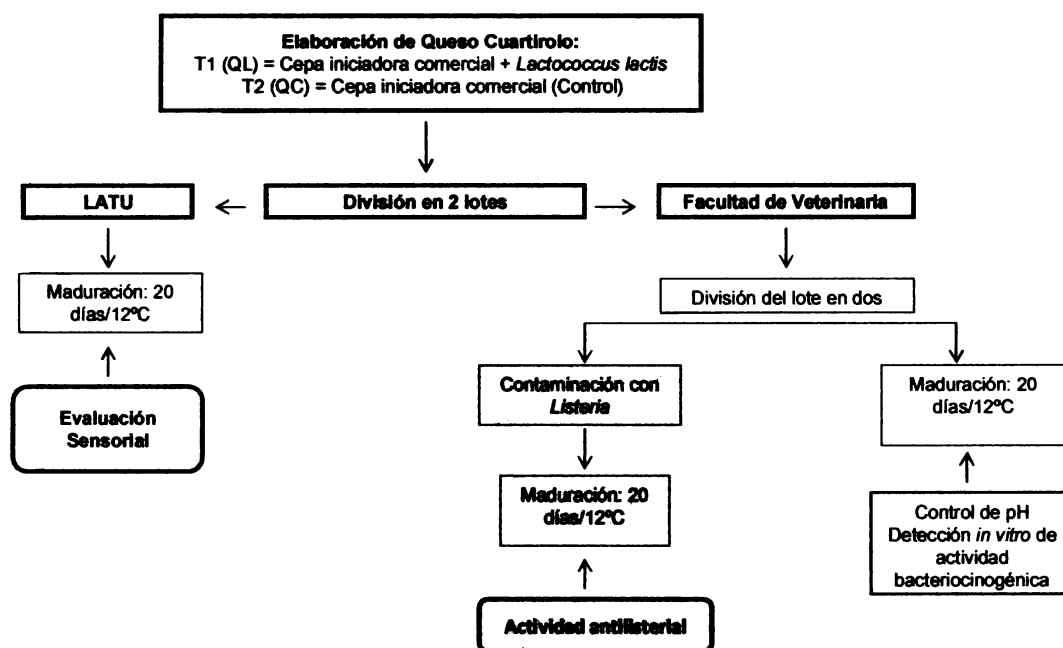
### DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados, se realizaron dos repeticiones de las elaboraciones de quesos. En cada una de ellas se utilizaron dos tratamientos en la elaboración de queso tipo Cuartirolo de acuerdo al Cuadro VII.

**Cuadro VII. Tratamientos en la elaboración de queso tipo Cuartirolo**

Tratamientos	Descripción	Composición del Cultivo Starter
T1 (QL)	Queso elaborado con <i>L. lactis</i> autóctono adjunto	50% <i>St. thermophilus</i> + 50% <i>L. lactis</i> autóctono
T2 (QC)	Queso elaborado sin <i>L. lactis</i> autóctono (Control)	100% <i>St. thermophilus</i>

A cada lote de quesos se lo subdividió en dos, uno destinado a la evaluación del efecto antilisterial y detección *in vitro* de actividad bacteriocinogénica y otro sin contaminar destinado a la evaluación sensorial (Figura 2). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado siguiendo el mismo proceso de elaboración.



**Figura 2. Diseño experimental: tratamientos y división de lotes de queso tipo Cuartirolo para sus posteriores evaluaciones**

## DETERMINACIONES Y TÉCNICAS ANALÍTICAS

### Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

*Streptococcus thermophilus* Lyofast ST 060® y *Lactococcus lactis* autóctono (GU967439) fueron las cepas utilizadas para la elaboración de queso tipo Cuartirolo.

*Streptococcus thermophilus*: Se utilizó como cultivo *starter* comercial en presentación liofilizada Lyofast ST 060® (Sacco, Italia). El mismo se compone de cepas de rápida fermentación, para inoculación directa en tina, utilizada en la producción de leche fermentada, queso blando y queso duro. Se mantuvo almacenado en su envase original a -18°C hasta el momento de su utilización. Como medio de cultivo en los ensayos *in vitro* se utilizó M17 (Oxoid, UK) suplementado con lactosa (Merck) al 10% (p/v) incubado a 41°C en aerobiosis (Mathot y col. 2003).

*Lactococcus lactis* autóctono GU967439: Fue utilizado como cultivo adjunto, se trata de una cepa con comprobado poder bacteriocinogénico aislada de leche cruda utilizada para la elaboración de quesos artesanales en la zona de Colonia. El aislamiento y caracterización del mismo se realizó en el marco del proyecto INIA-FPTA: "Aislamiento de bacterias lácticas con propiedades bacteriocinogénicas y antitumorales presentes en alimentos fermentados (quesos) de elaboración artesanal en la zona de Colonia, Uruguay". Fue mantenido congelado a -80°C en caldo Mann-Rogosa-Sharpe (MRS, Difco, USA) suplementado con glicerol (15%, v/v). Como medio de cultivo en los ensayos *in vitro* se utilizó caldo MRS (Difco, USA) incubado a 30°C por 48h en condiciones de microaerofilia, siendo éstas las condiciones óptimas determinadas en ensayos previos en nuestro laboratorio.

Los indicadores utilizados en los ensayos de inhibición *in vitro* fueron *Listeria innocua* (aislamiento de origen alimenticio proporcionado por el Laboratorio de la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, MGAP) y *Listeria monocytogenes* ATCC N° 19111. La identidad fue verificada mediante ensayos de caracterización fenotípica, como tinción de Gram y morfología celular, test de motilidad, test de hemólisis, e identificación bioquímica mediante API Listeria Biomérieux® (Hitchins, 2003). Para el crecimiento de estos microorganismos se utilizó Brain Heart Infusion, (BHI HiMedia®, India) suplementado con 0.6% (p/v) de extracto de levadura (HiMedia®, India) e incubado a 37°C por 24 h en aerobiosis. La evaluación de inhibición *in vitro* se realizó con BHI adicionado de Agar (1.5% p/v, HiMedia®, India) suplementado con 0.6% (p/v) de extracto de levadura (BHIA con extracto de levadura) y se incubaron a 37°C por 24 h en aerobiosis.

### Actividad antimicrobiana *in vitro*

Previa aplicación del *Lactococcus lactis* en la elaboración de los quesos se verificó su capacidad antagónica *in vitro*, por el método "agar spot test" (Fraga y col., 2005) utilizando como indicadores las cepas de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*. Un volumen de 2.5 µL de un cultivo fresco de *L. lactis* fue inoculado (*spotted*) sobre la superficie de placas con agar MRS (Difco, USA) e incubado a 37°C por 24h en condiciones de microaerofilia. Se observó el desarrollo de colonias en la gota inoculada, luego se cubrió la superficie de la placa con BHI *soft* agar (0.8%), inoculado previamente con las bacterias indicadoras ya citadas en una

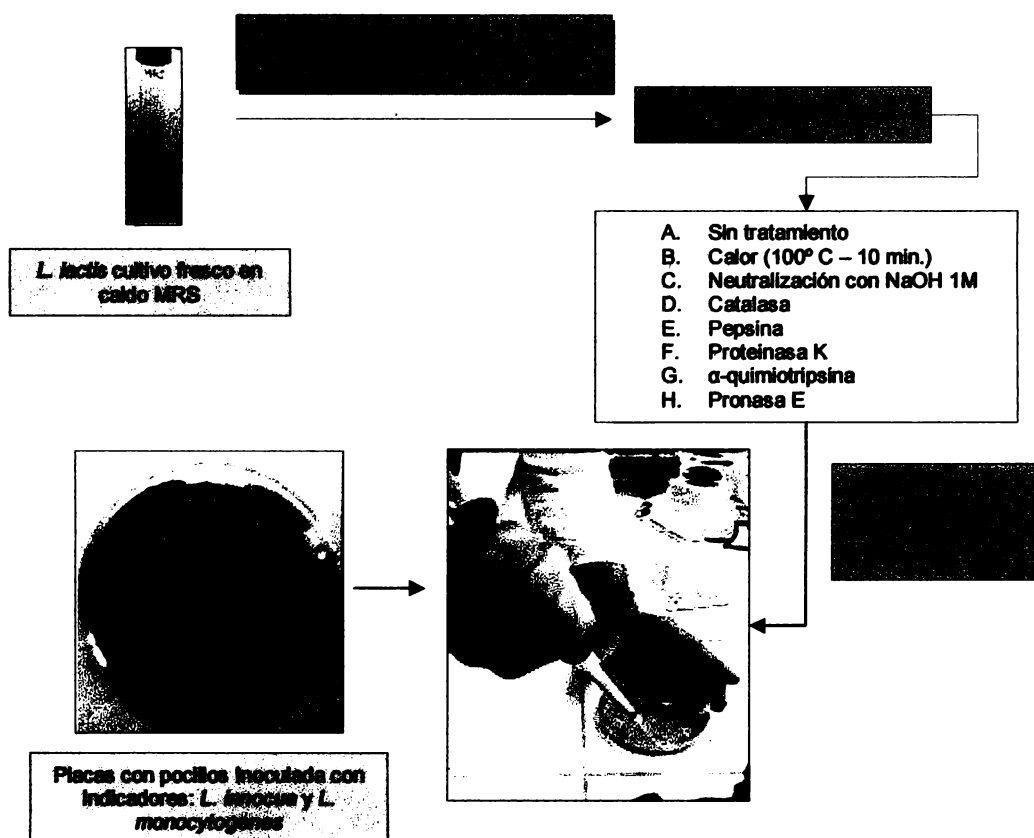
concentración de  $1 \times 10^8$  ufc/mL. Las placas se incubaron a 37°C por 24h en condiciones de aerobiosis. La inhibición del crecimiento bacteriano se determinó midiendo la zona de inhibición alrededor de las colonias que crecieron en la gota. Estos ensayos se realizaron por duplicado.

Para evaluar la naturaleza bioquímica de la/las sustancia/s antimicrobiana/s, se utilizó un cultivo de 48h de *L. lactis* que fue centrifugado (10000 RPM, 15 minutos a 4°C) y el sobrenadante fue analizado mediante la técnica "agar well diffusion" (Fraga y col., 2008, Perelmuter y col., 2008). Este sobrenadante fue dividido en tubos estériles para su posterior tratamiento con: calor (10 minutos a 100°C, neutralización con NaOH 1M, catalasa (1 mg/mL, Sigma, USA), pepsina (1 mg/mL, Sigma, USA), proteinasa K (1 mg/mL, Sigma, USA),  $\alpha$ -quimiotripsina (1 mg/mL, Sigma, USA) y pronasa E (1 mg/mL, Sigma, USA). Por otra parte, cilindros metálicos estériles fueron colocados en placas de Petri para formar los pocillos donde se inocularon los distintos tratamientos del sobrenadante. Posteriormente se sembró 1mL de caldo BHI conteniendo  $1 \times 10^8$  ufc/mL de las bacterias indicadoras en BHIA suplementado con extracto de levadura (previamente fundido y templado a 45°C). Este medio conteniendo así el microorganismo indicador se fraccionó en las placas de Petri con los cilindros estériles. Una vez solidificado el medio los mismos se retiraron y se inoculó en cada pocillo 100 $\mu$ L de cada uno de los sobrenadantes (tratados y sin tratar). Como control positivo se inoculó 100 $\mu$ L de Nisina (Nisaplin<sup>®</sup>, Danisco) en una concentración de 100mg/mL. Como control negativo se utilizó el mismo volumen de MRS (Difco, USA) neutralizado con NaOH 1M (Figura 3).

Las placas se incubaron a 37°C por 24h en aerobiosis y el efecto antimicrobiano de los diferentes tratamientos fue evaluado. Este ensayo se realizó por duplicado.

De forma similar y con la finalidad de descartar actividad antilisterial por la cepa comercial de *Streptococcus thermophilus*, se evaluó su capacidad antagonica *in vitro*, por el método "agar spot test" (Fraga y col., 2005) ya descrito.

Finalmente, para determinar la compatibilidad entre las cepas que se utilizarían en la elaboración de queso, se evaluó *in vitro* la actividad de la bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* sobre el cultivo comercial, para esto se utilizó el método "agar well difusión" (Fraga y col., 2008; Perelmuter y col., 2008), ya mencionado.



**Figura 3. Ensayo de detección de actividad antimicrobiana por la técnica “agar well difusión”**

**Curva de crecimiento, capacidad de fermentación y efecto inhibitorio de *Lactococcus lactis* en leche**

Mediante curvas de crecimiento se determinó el tiempo para obtener el mayor número de células viables utilizando como matriz leche conforme a lo indicado por Valbuena y col., (2008). Se utilizó leche en polvo descremada, reconstituida al 10%, libre de inhibidores y esterilizada a 110°C por 10 minutos. Un volumen de 100mL de leche fue sembrado con un cultivo de *Lactococcus lactis* de concentración conocida de manera tal que se alcanzara un nivel cercano a  $1,0 \times 10^3$  ufc/mL. Posteriormente se incubó a 35°C por 30 h en condiciones de microaerofilia. Durante este tiempo se tomaron muestras a la 1, 3, 6, 9, 12, 15, 21, 24, 27 y 30 h de incubación y se analizaron mediante recuento bacteriano en agar MRS (Difco, USA). Cada recuento se realizó por duplicado.

Así mismo, se evaluó la capacidad de fermentación estudiando en los mismos tiempos el pH (pH-metro, Oakton® pH 5 Acorn series) y la acidez Dörníc (Pinto y col., 1998).

Para determinar el efecto inhibitorio de *Lactococcus lactis* en leche se realizaron ensayos de “agar well diffusion” (Fraga y col., 2008; Perelmutter y col., 2008) con los sobrenadantes neutralizados obtenidos de muestras tomadas a las 12, 24 y 30 h de crecimiento en leche, utilizando como indicador *Listeria innocua*. El ensayo se



realizó por duplicado y la actividad inhibitoria midiendo el diámetro del halo de inhibición se expresó en mm.

### Producción del cultivo adjunto de *Lactococcus lactis* para su aplicación en la elaboración de quesos

Se llevó a cabo en un fermentador Bioflo II (New Brunswick Scientific Co., INC. N.J., USA) de 1500 mL de capacidad operando en modo discontinuo. Como medio de cultivo se utilizó leche en polvo descremada al 10% esterilizada a 100°C por 30 minutos, verificado por recuento en placas con MRS (Difco, USA) incubadas por 48 h en condiciones de aerobiosis y de microaerobiosis. Para el desarrollo del inóculo se realizó un preinóculo tomando 5 colonias de un cultivo en placa de MRS (Difco, USA) y se transfirieron a un tubo conteniendo 10 mL de leche en polvo descremada estéril al 10%. Luego de su incubación *overnight* a 35°C en condiciones de microaerofilia, el mismo se utilizó para inocular un matraz conteniendo 100 mL de leche en polvo descremada estéril al 10%, el cual fue incubado en las mismas condiciones. La fermentación se llevó a cabo en 1100 mL de leche en polvo descremada inoculada al 10% con el cultivo anterior, incubado a 35°C y 40 rpm de agitación durante 15 h. Estas condiciones fueron determinadas de acuerdo a las curvas de crecimiento realizadas anteriormente. Se determinó la biomasa obtenida mediante recuento en placas con MRS (Difco, USA) incubado a 30°C por 48 h en condiciones de microaerobiosis. El cultivo fue conservado en fase estacionaria a 5°C hasta su utilización en la elaboración de queso tipo Cuartirolo.

Así mismo, se tomó una muestra de dicho cultivo para determinar el efecto inhibitorio de *Lactococcus lactis*, para ello se realizaron ensayos de "agar well diffusion" (Fraga y col., 2008; Perelmuter y col., 2008) con el sobrenadante neutralizado utilizando como indicador *Listeria innocua*. El ensayo se realizó por duplicado y la actividad inhibitoria se determinó midiendo el diámetro del halo de inhibición, expresándose en mm.

### Determinación de dosis de los cultivos a aplicar

Previo a la elaboración de los quesos se realizó el ajuste de dosis de los cultivos a utilizar en 40L de leche. Para cumplir con el diseño experimental se utilizaron las siguientes dosis para cada tratamiento:

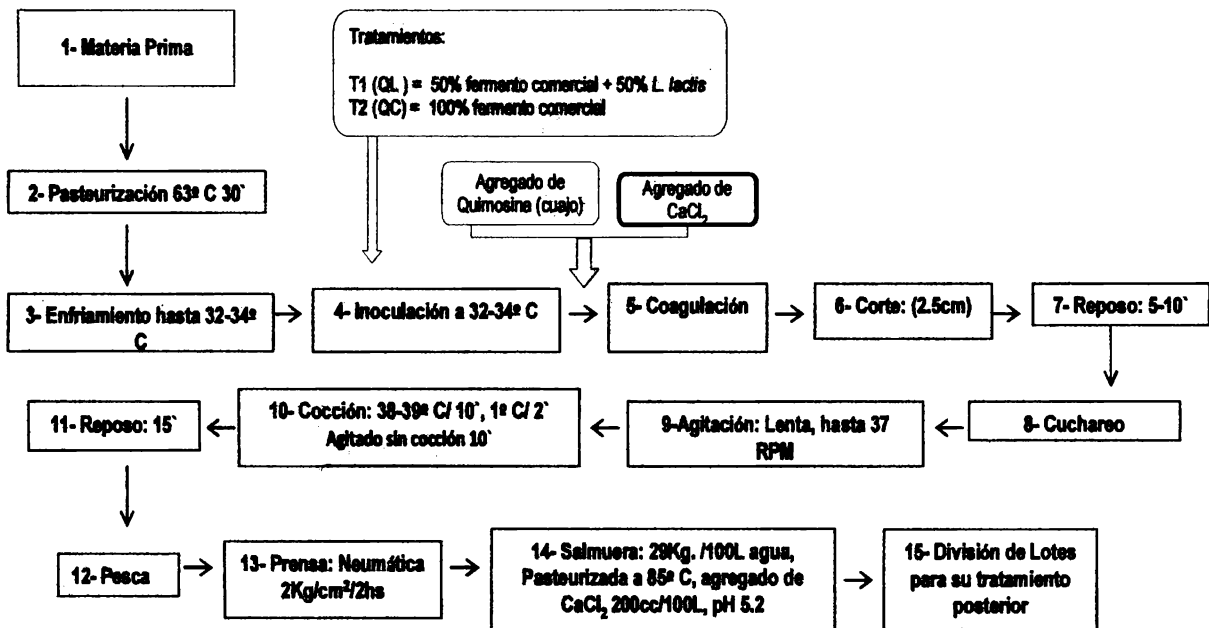
T1 (QL): Cultivo Comercial  $2.5 \times 10^{10}$  ufc + *L. lactis*  $2.5 \times 10^{10}$  ufc

T2 (QC): Cultivo Comercial  $5 \times 10^{10}$  ufc

El inóculo del cultivo *starter* comercial se determinó de acuerdo a la información técnica provista por la empresa proveedora del cultivo (Sacco, SRL), mientras que el inóculo del cultivo de *Lactococcus lactis* se calculó de acuerdo a los datos obtenidos anteriormente en el recuento en MRS.

## Elaboración de queso tipo Cuartirolo

Para la elaboración de los quesos se utilizaron un total de 80 litros de leche, que se dividieron en dos lotes de 40 L, uno para cada tratamiento: T1 y T2. La elaboración se realizó de acuerdo al estándar para queso tipo Cuartirolo (Figura 4)



**Figura 4:** Flujograma general de elaboración de quesos tipo Cuartirolo

Durante la elaboración de los quesos se retiraron muestras desde la tina para análisis de calidad microbiológica y de composición, así como controles del proceso de elaboración en diferentes etapas: pH (pH-metro, Oakton® pH 5 Acorn series), acidez Dörníc (Pinto y col., 1998) y temperatura.

### Determinación de calidad composicional, fisicoquímica y microbiológica de leche y quesos elaborados

Para evaluar la calidad de materia prima y de los productos se realizaron los siguientes análisis:

#### Leche Cruda

El análisis de composición se efectuó en el equipo Lactoscan SLP®, determinándose proteína, materia grasa, lactosa y sólidos totales en leche.

A su vez se realizaron: Acidez Dörníc (Pinto y col., 1998), pH (pH-metro, Oakton® pH 5 Acorn series), densidad, prueba de Alcohol y test para detección de inhibidores en leche, según la técnica Galesloot (FIL-IDF 57:1970; FIL-IDF 258: 1991, citados por Pinto y col., 1998) y por Delvotest® SP-NT (Stead y col., 2008).

La determinación de recuento de células somáticas directo se efectuó según la técnica de Breed (FIL-IDF, 1995).

Los análisis microbiológicos se realizaron conforme la metodología APHA, (2001). Se determinó: recuento de mesófilos aerobios totales, coliformes totales (a 30°C) y *Staphylococcus coagulasa* positiva.

#### Leche Pasteurizada

Los análisis microbiológicos realizados conforme la metodología APHA, (2001) fueron: recuento de mesófilos aerobios totales, coliformes totales (a 30°C), *Staphylococcus coagulasa* positiva.

La comprobación de efectividad del proceso térmico se comprobó a través de la determinación de actividad de la fosfatasa alcalina (Silva y col., 1997), utilizando el kit comercial Phosphatesmo MI, MN®.

#### Quesos

Se determinó el contenido de materia grasa por el método Van Gulik (NEN 3059: 1957, Leiden, Holanda; ISO N° 3433.1975, citado por Pinto y col., 1998).

A las muestras de queso se les realizó la determinación de pH (pH-metro, Oakton® pH 5 Acorn series) y porcentaje de humedad (deseccación a peso constante en balanza OHAUS®).

Los análisis microbiológicos se realizarán según APHA, (2001). Se realizaron: determinación de *Listeria* sp. y *Salmonella* sp., así como el recuento de *Staphylococcus coagulasa* positiva, coliformes totales (a 30°C) y termotolerantes (45°C).

#### Contaminación de quesos tipo Cuartirolo con *Listeria innocua*

Debido a que se utilizó la infraestructura de la planta piloto de tecnología quesera del LATU no fue posible realizar la contaminación con *Listeria* sp. durante el proceso de elaboración, optando entonces por la contaminación por inoculación directa en los quesos, luego de la etapa de salmuera y en condiciones de laboratorio. Para la contaminación de los quesos se eligió *L. innocua* como alternativa a la utilización de *L. monocytogenes*. La utilización de ésta como sustituto es considerado un modelo adecuado ya descrito por algunos autores (Hugas y col., 1995; Steg y col., 1995, citados por Weiss, 2005). Además del hecho de que se requieren menores condiciones de bioseguridad algunos autores sugieren que *L. innocua* presenta mayor resistencia a condiciones de estrés ambiental, como por ejemplo al tratamiento con nisina y calor (Kamat y Nair, 1996; Friedly y col., 2008).

Los quesos (T1 y T2), luego de salir de la salmuera se contaminaron con *L. innocua* por inyección de un inóculo en todo el queso de manera de obtener  $10^3$  ufc/g en cada queso. El inóculo se obtuvo mediante el crecimiento de *L. innocua* en BHI (HiMedia®, India) por 24 h a 37°C en condiciones de aerobiosis y posteriores diluciones hasta alcanzar dicha concentración.

La cuantificación del inóculo de *L. innocua* fue realizada mediante siembra en placas con agar Palcam (Oxoid, UK).

### Cuantificación de *L. innocua* en quesos tipo Cuartirolo

Según Corry y col., (2003) la elección del método de cuantificación de *Listeria* sp. depende de la sensibilidad requerida, siendo la técnica indicada cuando el valor esperado es menor a 200 ufc la del número más probable (NMP) y para valores por encima a éste el recuento en superficie con agar selectivo y diferencial. Por esta razón para la cuantificación de *L. innocua* se utilizaron ambas técnicas. Para los análisis se tomaron muestras de quesos (T1 y T2) en diferentes tiempos luego de la contaminación: 2 h (t0), 7 días (t1) y 14 días (t2). Dichas muestras se analizaron por duplicado tomando alícuotas de cada queso de diferentes regiones del mismo (parte interna y externa).

Para la técnica del NMP se utilizó la metodología descrita por Degenhardt y Sant'Anna, (2007). Muestras de 25 g fueron homogeneizadas con 225 mL de agua peptonada bufferada estéril (Oxoid, Uk) en *stomacher* (Bagmixer®400, Interscience) por 5 min. Posteriormente se prepararon diluciones seriadas en agua peptonada bufferada estéril (Oxoid, Uk). Cada una de estas diluciones (1,0 g, 0,1 g, 0,01 g, 0,001 g y 0,0001 g) se inocularon por triplicado en Caldo de Enriquecimiento de *Listeria* (LEB, Oxoid, Uk) y se incubaron a 30°C por 24 h (preenriquecimiento). Luego de la incubación, se inocularon 1 mL de cada tubo de caldo LEB en caldo Fraser (Acumedia, USA) y se incubó a 35°C por 48 h (segundo enriquecimiento). La confirmación de cada tubo de caldo Fraser se realizó por estriado en placas con agar selectivo para *Listeria* (PALCAM, Oxoid, UK) las cuales se incubaron durante 24-48 h a 35°C. La lectura se realizó contando los tubos de caldo Fraser positivos (hidrólisis de esculina) y confirmados mediante siembra en agar PALCAM expresando el resultado en NMP/g de acuerdo a la tabla del NMP (De Man, 1975).

Para el recuento en placa se utilizó la metodología propuesta por Rodríguez y col., (2005). Muestras de 10 g se homogeneizaron con 90 mL de agua peptonada bufferada estéril en *stomacher* (Bagmixer®400, Interscience) por 5 min. Posteriormente se prepararon diluciones seriadas en agua peptonada bufferada estéril (Oxoid, Uk) y se sembraron en placas con agar selectivo para *Listeria* (PALCAM, Oxoid, UK). Las placas se incubaron a 37° C por 48 h. La lectura se realizó contando el número de colonias típicas y multiplicándolo por el factor de dilución.

### Determinación de pH y actividad bacteriocinogénica en quesos

Durante la maduración de los quesos (T1 y T2) mantenidos a 12°C, del lote que no fue contaminado con *L. innocua* se tomaron muestras con el fin de determinar pH (pH-metro, Oakton® pH 5 Acorn series) y actividad bacteriocinogénica *in vitro*. Las muestras se tomaron en los mismos tiempos que se mencionaron anteriormente y se analizaron por duplicado utilizando para la detección de actividad bacteriocinogénica la técnica descrita por Rodríguez y col., (2005). Muestras de 5 g de cada queso fueron homogenizados con 10 mL de una solución estéril de HCl 0,02N a 50° C. El homogenizado fue centrifugado (12000g, 20 min., 4°C) y el sobrenadante obtenido se neutralizó con NaOH 1M. Un volumen de 100 µL fue inoculado en pocillos

formados en placas con BHIA conteniendo  $1 \times 10^8$  ufc/mL de *Listeria innocua*. Como control positivo se inoculó con 100  $\mu$ L de Nisina (Nisaplin<sup>®</sup>, Danisco) en una concentración de 100mg/mL. Como control negativo se utilizó el mismo volumen de MRS (Difco, USA) neutralizado con NaOH 1M. Las placas se incubaron a 37°C por 24h en aerobiosis. Luego de la incubación se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento y la actividad bacteriocinogénica se expresó en mm.

### Comparación de características sensoriales de los quesos elaborados

Para establecer si la utilización del cultivo de *Lactococcus lactis* como cultivo adjunto afectó las características sensoriales de los quesos testados se aplicó una técnica sensorial descriptiva para cuantificar algunas variables que los describían. Se utilizaron muestras de cada lote de elaboración aptas para el consumo que fueron maduradas en el LATU a 12°C. Las mismas fueron evaluadas por un panel entrenado (10 jueces, seleccionados según ISO 22935-1:2009 y entrenados según lineamientos de Lavanchy y col., 1993; Bérodier y col., 1997; Montero y col., 2005). Se evaluaron las características de textura: dureza manual, dureza en boca, elasticidad, friabilidad, solubilidad, impresión de humedad y adherencia. También se evaluaron los parámetros de sabor: intensidad de olor, intensidad de sabor, dulce, salado, amargo, ácido, picante y retrogusto.

Todas las características se evaluaron con escalas no estructuradas. Cada evaluador midió la intensidad de los 15 atributos para cada muestra de queso y se evaluaron como máximo tres muestras por sesión realizando dos repeticiones por muestra. En cada sesión se utilizaron muestras comerciales como control.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la actividad antilisterial durante la maduración, los resultados de los recuentos en placa se analizaron mediante ANOVA multifactorial considerando los efectos tiempo y tratamiento, utilizando el programa PAST (Hammer y col., 2001).

Para determinar si la diferencia en las características sensoriales entre los tratamientos era significativa, para cada atributo se realizó una prueba t-Student para muestras independientes con INFOSTAT, V2008.

## RESULTADOS

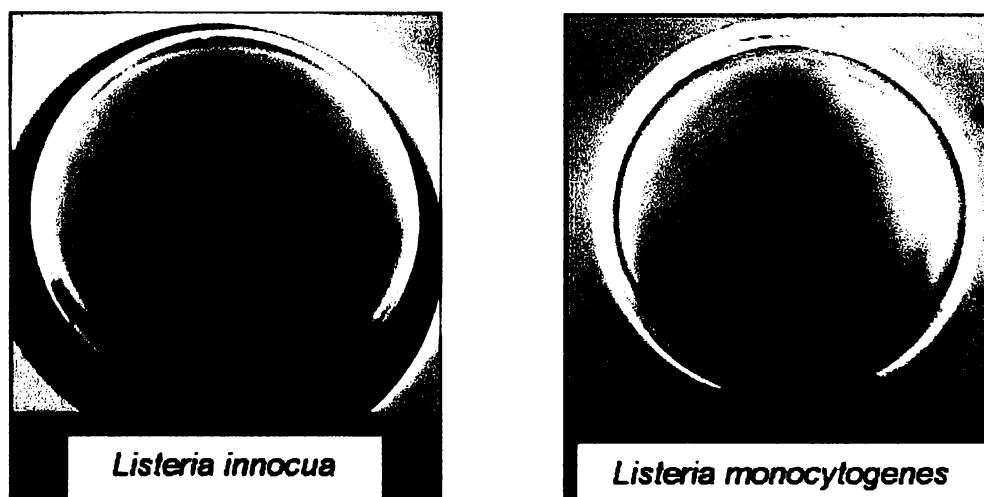
### ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE LAS CEPAS UTILIZADAS EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS

Los resultados de la actividad antimicrobiana *in vitro* de las cepas aplicadas: *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* se indican en el Cuadro VIII y Figura 5.

**Cuadro VIII. Evaluación de actividad antagonista de cultivos frente a *Listeria innocua* y *L. monocytogenes***

Cepa Utilizada	Diámetro del halo de inhibición (mm) <sup>a</sup>	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	17,5 ± 0,71	16,5 ± 0,71
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ND	ND

<sup>a</sup>: Valores de la media de los diámetros de los halos de inhibición alrededor de la gota inoculada ± desvío estándar; ND: No se detecta halo de inhibición.



**Figura 5. Actividad antagonista de *Lactococcus lactis* frente a los microorganismos indicadores *Listeria innocua* y *L. monocytogenes***

En el Cuadro IX, se observan los resultados de los sobrenadantes obtenidos a partir del cultivo de *Lactococcus lactis* en caldo MRS, luego de ser sometidos a diferentes tratamientos. Se observa que el efecto inhibitorio fue igual para ambos microorganismos indicadores.

**Cuadro IX. Efecto antilisterial *in vitro* de los sobrenadantes de *Lactococcus lactis* sometidos a diferentes tratamientos**

<b>Tratamiento del sobrenadante</b>	<b>Efecto Inhibitorio<sup>a</sup></b>
<i>Calor</i>	
100° C por 10 min.	+
<i>pH</i>	
Neutralización	+
Sin Neutralización	+
<i>Enzimas</i>	
Catalasa	+
Pepsina	+
α-Quimotripsina	-
Proteinasa K	-
Pronasa E	-
Control + <sup>b</sup>	+
Control - <sup>c</sup>	-

+: presencia de halo de inhibición; -: ausencia de halo; <sup>a</sup>: Efecto inhibitorio sobre *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*; <sup>b</sup>: Nisina 100mg/mL.; <sup>c</sup>: MRS estéril y neutralizado.

Los resultados de la actividad antimicrobiana *in vitro* para *Streptococcus thermophilus* (cultivo starter comercial) no mostraron efecto antilisterial en ninguno de los ensayos realizados. A su vez, el crecimiento de *S. thermophilus* fue evaluado en presencia del sobrenadante obtenido a partir del cultivo de *L. lactis*. Los resultados obtenidos indicaron que el sobrenadante no afectó el crecimiento de este microorganismo.

#### **CURVA DE CRECIMIENTO, CAPACIDAD DE FERMENTACIÓN Y EFECTO INHIBITORIO DE *LACTOCOCCUS LACTIS* EN LECHE**

Para determinar el tiempo en que se obtenía el mayor número de células viables de *Lactococcus lactis* en leche, se realizó una curva de crecimiento para este microorganismo. Los resultados obtenidos mostraron que el máximo número de células viables se obtuvo a las 15 h de incubación (8,72 log ufc/mL). (Figura 6 a)

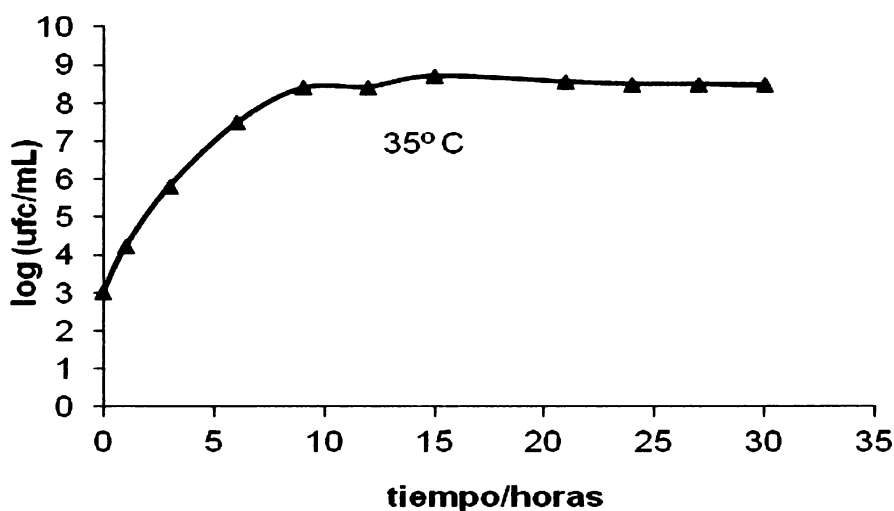
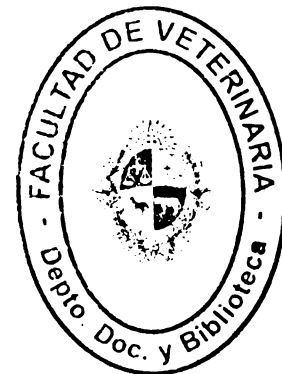


Figura 6(a). Curva de crecimiento de *Lactococcus lactis* en leche a 35° C

A su vez, la capacidad de fermentación del *L. lactis*, se evaluó mediante la valoración de la acidez titulable y la determinación de pH, en la misma matriz (Figura 6 b).

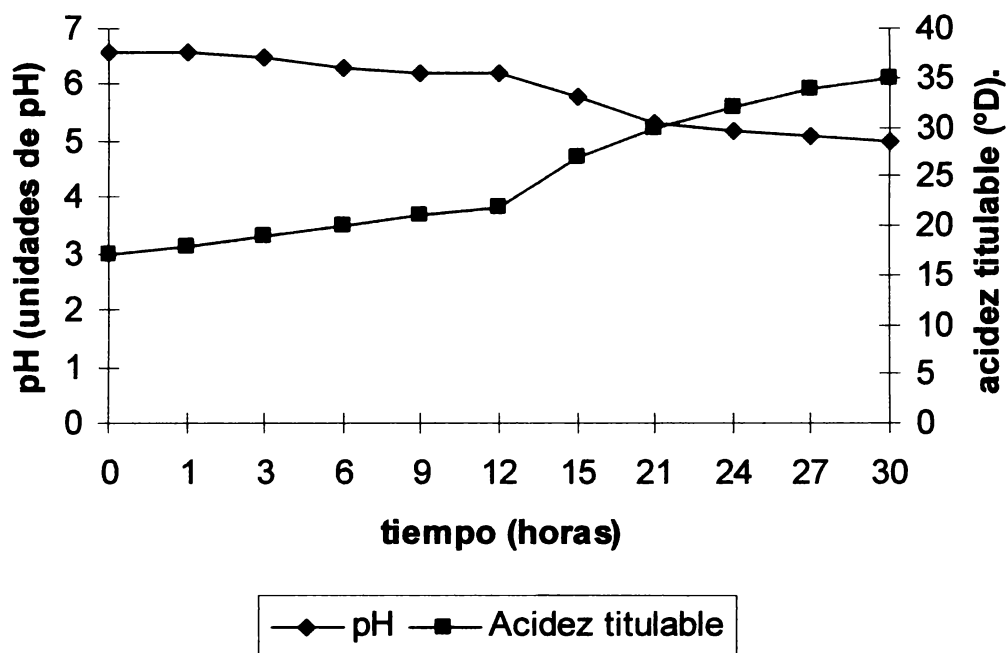


Figura 6(b). Capacidad de fermentación a 35° C de *L. lactis* en leche: pH y acidez titulable

Por otra parte en el Cuadro X se observan los resultados del efecto antilisterial del cultivo de *Lactococcus lactis* en leche, incubado a diferentes tiempos.



**Cuadro X. Efecto inhibitorio de *Lactococcus lactis* sobre *Listeria innocua* en leche**

<i>Lactococcus lactis</i> Tiempo de Incubación en Leche (h)	Halo de Inhibición (mm) <sup>a</sup> <i>Listeria innocua</i>
12	13,5 ± 0,71
24	15 ± 1,41
30	17 ± 1,41

<sup>a</sup>: Valores de la media de los diámetros de los halos de inhibición alrededor del pocillo inoculado ± desvío estándar.

### PRODUCCIÓN DEL CULTIVO STARTER DE *LACTOCOCCUS LACTIS* PARA SU APLICACIÓN EN LA ELABORACIÓN DE QUESO

Los resultados obtenidos en la realización de la curva de crecimiento para *L. lactis* en leche, permitieron definir el tiempo de incubación óptimo para la producción del cultivo *starter*. Teniendo en cuenta dichas condiciones se logró obtener a las 15 h de incubación a 35°C una biomasa de  $7,5 \times 10^7$  ufc/mL de *Lactococcus lactis* en un volumen de 1100mL de leche.

Por otra parte se determinó en dicho cultivo la presencia de efecto inhibitorio sobre *L. innocua*, obteniendo un halo de inhibición de promedio  $15 \pm 1,41$  mm de diámetro (Figura 8).

### DETERMINACIÓN DEL INÓCULO DE LOS CULTIVOS A APLICAR

Con los resultados obtenidos anteriormente en la producción del cultivo *starter*, se procedió a calcular el inóculo de cultivo de *Lactococcus lactis* de forma tal de cumplir el diseño experimental propuesto ( $2,5 \times 10^{10}$  ufc). Para ello, se inoculó a los 40L de leche un volumen de 333 mL de cultivo de *L. lactis* con una concentración de  $7,5 \times 10^7$  ufc/mL. El inóculo del cultivo *starter* comercial fue calculado de acuerdo a las recomendaciones de la empresa proveedora, utilizándose 0,2 g del cultivo liofilizado para obtener así una dosis de  $2,5 \times 10^{10}$  ufc (T1 o QL) y 0,4 g para obtener la dosis de  $5 \times 10^{10}$  ufc (T2 o QC).

### CONTROLES DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE QUESO TIPO CUARTIROLO

En cada uno de los procesos de elaboración de queso, se realizaron controles en diferentes etapas del mismo: materia prima (leche), siembra, cuajada, pesca, prensa y en el inicio de la maduración. En todas ellas se determinó pH, acidez titulable y temperatura. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro XI.

**Cuadro XI. Controles del proceso de elaboración del queso tipo Cuartirolo**

		<i>Leche</i>		<i>Siembra</i>		<i>Cuajada</i>		<i>Pesca</i>		<i>Prensa</i>		<i>Maduración</i>	
		M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
<i>pH</i>	<b>T1</b>	6,73	6,71	6,58	6,55	6,30	6,33	6,28	6,3	6,00	6,02	5,50	5,51
	<b>T2</b>	6,73	6,73	6,58	6,56	6,58	6,56	6,30	6,28	6,20	6,21	5,65	5,65
<i>Acidez (°D)</i>	<b>T1</b>	16,0	16,0	16,5	16,5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	<b>T2</b>	16,0	16,0	16,0	16,0	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<i>Temperatura (°C)</i>	<b>T1</b>	13	13	34	34	33	31	30	29	27	27	25	24
	<b>T2</b>	15	14	34	34	33	31	30	29	28	27	25	23

M: muestreos realizados; T1: Tratamiento 1 o Queso Lactis; T2: Tratamiento 2 o Queso Control.

#### DETERMINACIÓN DE CALIDAD DE LA LECHE UTILIZADA Y DE QUESOS ELABORADOS

Los resultados de los análisis de calidad composicional, fisicoquímica y microbiológica de la leche utilizada en la elaboración de los quesos tipo Cuartirolo se resumen en los cuadros XII, XIII y XIV.

**Cuadro XII. Análisis de composición de la leche destinada a la elaboración de queso tipo Cuartirolo**

	<b>T1 (QL)</b>		<b>T2 (QC)</b>	
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>
Temperatura	24,77	20,13	24,23	22,20
Materia Grasa (%)	3,68	3,90	3,87	3,92
Proteína (%)	2,97	3,10	2,93	3,08
Lactosa (%)	4,22	4,63	4,16	4,60
SNG	7,98	8,44	7,87	8,40
Sales	0,75	0,75	0,75	0,83
Punto Crioscópico	0,52	0,52	0,518	0,518
Densidad	1,027	1,030	1,027	1,030

M: muestreos realizados; T1: Tratamiento 1 o Queso Lactis; T2: Tratamiento 2 o Queso Control.

**Cuadro XIII. Análisis de calidad de la leche destinada a la elaboración de queso tipo Cuartirolo**

	T1(QL)		T2(QC)	
	M1	M2	M1	M2
<b>Leche cruda</b>				
Acidez titulable (°D)	16	15	16	15
pH	6,72	6,8	6,70	6,9
Densidad (g/mL)	1029	1031	1029	1031
Prueba de alcohol 68°	negativa	negativa	negativa	Negativa
Delvotest	negativo	negativo	negativo	Negativo
Galesloot	negativo	negativo	negativo	Negativo
Recuento de Células Somáticas (Cel/mL)	2.23x10 <sup>5</sup>	3,12x10 <sup>5</sup>	1.96x10 <sup>5</sup>	3,92 10 <sup>5</sup>
<b>Leche pasteurizada</b>				
Prueba de Fosfatasa alcalina	negativa	negativa	negativa	negativa

M: muestreos realizados. T1: Tratamiento 1 o Queso Lactis. T2: Tratamiento 2 o Queso Control.

**Cuadro XIV. Análisis microbiológicos de la leche destinada a la elaboración de queso tipo Cuartirolo**

	T1 (QL)		T2 (QC)	
	M1	M2	M1	M2
<b>Leche cruda</b>				
RTMA*(ufc/mL)	1.5x10 <sup>5</sup>	1.0x10 <sup>4</sup>	5.6x10 <sup>3</sup>	3,1x10 <sup>4</sup>
Coliformes Totales (ufc/mL)	< 100	1,1x10 <sup>2</sup>	4.8x10 <sup>2</sup>	2,2x10 <sup>3</sup>
<i>Staphylococcus coagulasa</i> + (ufc/mL)	3.0x10 <sup>2</sup>	2,2x10 <sup>3</sup>	< 100	4,3x10 <sup>3</sup>
<b>Leche pasteurizada</b>				
RTMA (ufc/mL)	< 10	1,2x10 <sup>2</sup>	< 10	1,0x10 <sup>2</sup>
Coliformes Totales (ufc/mL)	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Staphylococcus coagulasa</i> + (ufc/mL)	< 10	< 10	< 10	< 10

\*: Recuento total de mesófilos aerobios; M:muestreos realizados; T1:Tratamiento 1 o Queso Lactis; T2: Tratamiento 2 o Queso Control.

Por otra parte, en el Cuadro XV se observan los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos de los quesos elaborados.

**Cuadro XV. Análisis fisicoquímicos y microbiológicos de quesos tipo Cuartirolo**

	T1 (QL)		T2 (QC)	
	M1	M2	M1	M2
<b>Análisis Fisicoquímicos</b>				
pH	5,06	5.35	5,03	5,22
Humedad (%)	46	50	46	43,5
Materia Grasa/ Extracto Seco (%)	41	48	49	41,6
<b>Análisis Microbiológicos</b>				
Coliformes Totales (ufc/g)	6.3x10 <sup>3</sup>	< 100	5.6x10 <sup>3</sup>	< 100
Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	< 3	< 3	< 3	< 3
<i>Staphylococcus coagulasa</i> + (ufc/g)	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Salmonella</i> sp. (en 25 g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Listeria</i> sp. (en 25 g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

M: muestreos realizados; T1: Tratamiento 1 o QL; T2: Tratamiento 2 o QC.

#### CUANTIFICACIÓN DE *LISTERIA INNOCUA* DURANTE LA MADURACIÓN DE LOS QUESOS

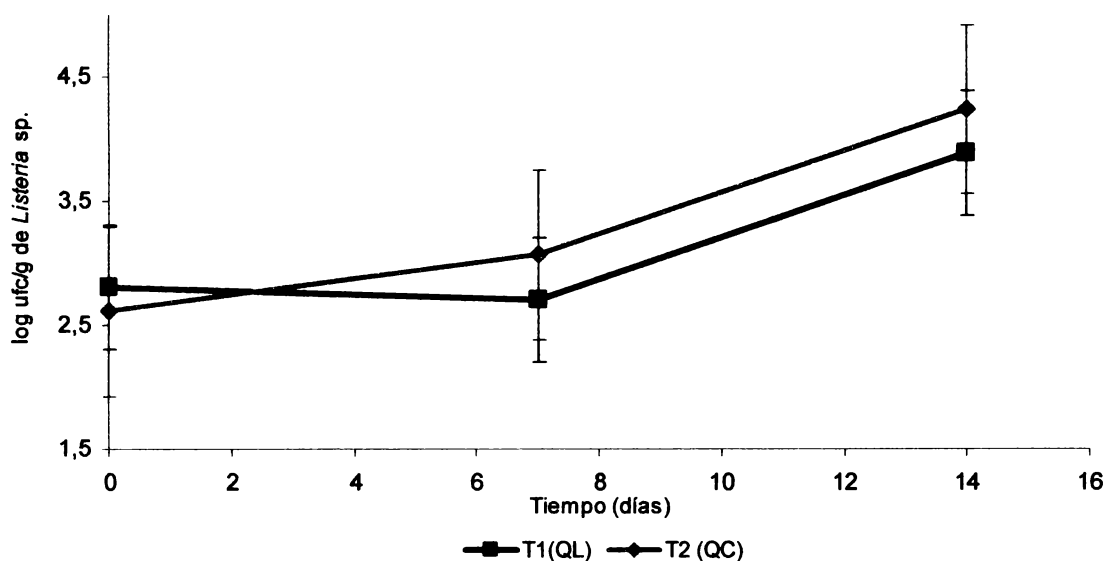
La cuantificación de *Listeria innocua* se realizó mediante las técnicas del NMP y recuento en placa, los resultados obtenidos del NMP se observan en el Cuadro XVI.

**Cuadro XVI. Cuantificación de *Listeria innocua* durante la maduración de los quesos mediante la técnica del NMP<sup>1</sup>**

	T1		T2	
	M1	M2	M1	M2
t0 (2h)	4,6 x 10 <sup>2</sup>	1,1 x 10 <sup>2</sup>	1,1 x 10 <sup>3</sup>	4,6 x 10 <sup>2</sup>
t1 (7 días)	4,6 x 10 <sup>2</sup>	2,1 x 10 <sup>2</sup>	4,6 x 10 <sup>3</sup>	4,6 x 10 <sup>2</sup>
t2 (14 días)	1,1 x 10 <sup>4</sup>	4,6 x 10 <sup>3</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>

<sup>1</sup>: Significa (NMP/g); M: muestreos realizados; T1: Tratamiento 1 o QL; T2: Tratamiento 2 o QC.

La evolución de la concentración de *L. innocua* determinada mediante recuento en placa durante la maduración de los quesos se describe en la Figura 7. Existieron diferencias significativas entre los tratamientos en el transcurso del tiempo (efecto tratamiento).



**Figura 7.** Cuantificación de *Listeria innocua* durante la maduración del queso tipo Cuartirolo almacenado a 12° C. Queso elaborado con *Lactococcus lactis* GU967439 (T1) y Queso elaborado con cultivo comercial no bacteriocinogénico (T2)

Asimismo en el Cuadro XVII se observa que existieron diferencias significativas entre cada uno de los tiempos evaluados (efecto tiempo).

**Cuadro XVII.** Resultado del recuento (Log ufc/g) de *L. innocua* durante la maduración del queso tipo Cuartirolo (efecto tiempo)

Media (Log ufc/g)	t 0 (2 hs)	t 1 (7 d)	t 2 (14 d)
T1(QL)	2,81 <sup>a</sup>	2,71 <sup>b</sup>	3,88 <sup>c</sup>
T2 (QC)	2,62 <sup>a</sup>	3,07 <sup>b</sup>	4,23 <sup>c</sup>
Error Estándar	0,06	0,06	0,06

\*Letras diferentes (entre pares de datos), indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

## DETERMINACIÓN DE pH Y ACTIVIDAD BACTERIOCINOGÉNICA EN QUESÓS

Durante la maduración de los quesos se tomaron muestras para la determinación de pH y la detección de actividad bacteriocinogénica *in vitro*. En el Cuadro XVIII se observan los resultados de pH durante la maduración.

**Cuadro XVIII. Análisis de pH durante la maduración de los quesos T1 y T2**

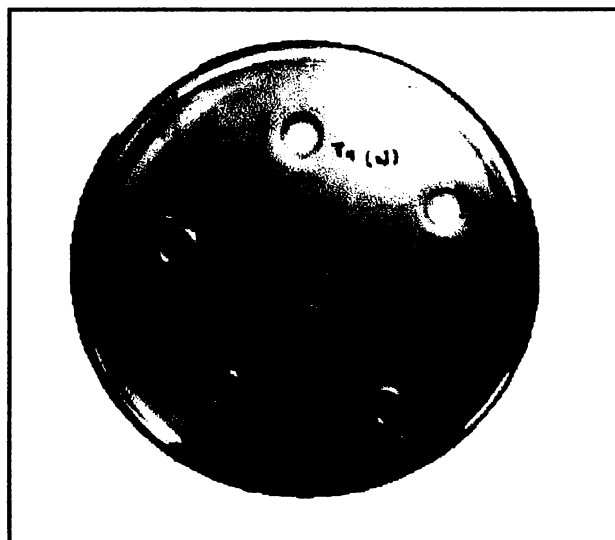
	pH		
	Tiempo 0 (2h)	Tiempo 1 (7 días)	Tiempo 2 (14 días)
T1 (QL)	5,35	5,07	5,00
T2 (QC)	5,22	5,09	5,02

Los resultados de la detección de actividad antimicrobiana (bacteriocinogénica) *in vitro* se observan en el cuadro XIX-Figura 8.

**Cuadro XIX. Detección de actividad bacteriocinogénica *in vitro* en quesos (T1 y T2) durante la maduración**

	Halo de Inhibición (mm) <sup>a</sup>		
	Tiempo 0 (2h)	Tiempo 1 (7 días)	Tiempo 2 (14 días)
T1 (QL)	13 ± 1,41	10 ± 0	3 ± 1,41
T2 (QC)	ND	ND	ND
Control +	21 ± 0,71	21 ± 0,71	21 ± 0,71
Control -	ND	ND	ND

<sup>a</sup>: Valores de la media de los diámetros de los halos de inhibición ± desvío estándar; ND: No se detecta halo de inhibición.



**Figura 8. Detección de actividad antimicrobiana en los sobrenadantes neutralizados obtenidos a partir de: cultivo adjunto de *L. lactis* en leche (*Escalado*); Quesos durante la maduración (tiempo 0, tiempo 1 y tiempo 2). Controles positivo (+) y negativo (-).**

### COMPARACIÓN DE CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LOS QUESOS ELABORADOS

Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial y su posterior análisis estadístico se observan en el Cuadro XX. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en ninguno de los atributos evaluados excepto en el atributo de sabor salado.

**Cuadro XX. Evaluación sensorial de quesos tipo Cuartirolo**

Parámetros Sensoriales	Tratamientos	
	T1 (QL)	T2 (QC)
<b>Atributos de Textura</b>		
Dureza manual	3,2 <sup>a</sup>	3,5 <sup>a</sup>
Dureza en boca	2,8 <sup>a</sup>	3,1 <sup>a</sup>
Elasticidad	4,6 <sup>a</sup>	4,6 <sup>a</sup>
Friabilidad	2,8 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>
Solubilidad	4,2 <sup>a</sup>	4,2 <sup>a</sup>
Impresión de humedad	3,9 <sup>a</sup>	4,0 <sup>a</sup>
Adherencia	3,4 <sup>a</sup>	3,2 <sup>a</sup>
<b>Atributos de Sabor</b>		
Intensidad de olor	2,6 <sup>a</sup>	2,8 <sup>a</sup>
Intensidad de sabor	3,6 <sup>a</sup>	3,3 <sup>a</sup>
Dulce	0,8 <sup>a</sup>	0,6 <sup>a</sup>
Salado	3,8 <sup>a</sup>	3,0 <sup>b</sup>
Amargo	1,0 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>
Ácido	2,0 <sup>a</sup>	2,0 <sup>a</sup>
Picante	0,5 <sup>a</sup>	0,5 <sup>a</sup>
Retrogusto	2,1 <sup>a</sup>	2,1 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes (entre pares de datos), indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

## DISCUSIÓN

En este estudio, se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *L. innocua* y *L. monocytogenes* de *Lactococcus lactis* GU967439 autóctono. Se evaluó además su aplicación como cultivo adjunto en la elaboración de quesos tipo Cuartirolo, determinando si existía efecto inhibitorio sobre *L. innocua*. Por otra parte, se determinó si la utilización del cultivo adjunto de *L. lactis* modificaba alguna de las propiedades sensoriales de dichos quesos.

### ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE *LACTOCOCCUS LACTIS*

Los resultados de la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Lactococcus lactis* GU967439 indicaron que este microorganismo presentó actividad antagonista frente a los indicadores *Listeria innocua* y *monocytogenes*, dado que se observó un halo de inhibición al crecimiento de ambos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por algunos autores (Martínez, 1996; Bromberg y col., 2005). Esta actividad puede deberse a diferentes factores: producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y otros compuestos entre ellos las bacteriocinas por lo que se caracterizó la naturaleza de dicho efecto.

Los resultados indicaron que el sobrenadante obtenido del cultivo de *L. lactis* GU967439 mantuvo su efecto inhibitorio frente a los microorganismos indicadores, cuando se aplicó calor, se neutralizó con NaOH 1M y se trató con catalasa y pepsina. La estabilidad térmica es una propiedad común en las bacteriocinas de BAL, la que tienen bajo peso molecular y estructura poco compleja (probablemente sin estructura terciaria) (Barba y Piard, 1993; González y col., 1994; Todorov y Dicks, 2005). La termoestabilidad es una característica muy importante para los compuestos utilizados como bioconservantes ya que muchos de los procesos de la industria alimentaria involucran etapas de calentamiento (pasteurización y esterilización de la leche) (Piard y Desmazeaud, 1992; Zapata y col., 2009). Sin embargo, existen algunas bacteriocinas como: helveticina J, y las bacteriocinas de *Lb. casei* y *Lb. delbrueki* subsp *lactis* que son muy sensibles al calentamiento, lo cual indica que poseen una estructura proteica más compleja (Joerger y Klaenhammer, 1990; Rammelsberg y Radier, 1990; Tora y col., 1991).

En la literatura se reporta que las bacteriocinas son generalmente estables a pH ácido o neutro, aunque existen excepciones interesantes. Así por ejemplo, la solubilidad y estabilidad de la nisina decrece desde un pH óptimo de 2 a un pH de 6, lo que constituye un inconveniente tecnológico importante para su utilización en los alimentos no ácidos, como carne y pescados enlatados y algunos derivados lácteos (Stiles, 1993; De Vuyst y Vandamme, 1994). En el presente trabajo el sobrenadante neutralizado y tratado con catalasa mantuvo la actividad antimicrobiana, lo que descarta que el efecto sea sólo debido a la producción de ácido y peróxido de hidrógeno por parte del *Lactococcus lactis* en estudio. En contraposición, no se observó efecto antimicrobiano cuando el sobrenadante fue tratado con las enzimas  $\alpha$ -quimotripsina, proteinasa K y pronasa E. La sensibilidad a proteasas es un criterio clave en la caracterización de un inhibidor como bacteriocina. Dada su definición como sustancia proteica es que generalmente se inactiva por una serie de enzimas proteolíticas (tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, pepsina, proteinasa K, etc.).



El comportamiento respecto a la sensibilidad frente a proteasa puede indicar la singularidad de una bacteriocina ya que este tipo de sustancias de distintas bacterias varían en sensibilidad con diferentes enzimas proteolíticas (De Vuyst y Vandamme, 1994). Por lo que es posible que la actividad antimicrobiana encontrada sea debida también a la presencia de una o varias sustancias peptídicas.

Ortolani y col., (2010), caracterizaron la producción de bacteriocinas y sustancias similares de aislamientos de BAL provenientes de leche cruda y quesos blandos. En sus resultados indican que 18 de las mismas correspondieron a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, encontrándose en 7 de ellos la presencia de genes que codifican para nisina. Ésta es una bacteriocina de bajo peso molecular, producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, del grupo de los lantibióticos y se caracteriza por la presencia de aminoácidos inusuales (lantionina y metil-lantionina) que son los responsables de importantes propiedades funcionales de la misma, como lo son la tolerancia a la acidez, termoestabilidad a bajo pH y específica acción bactericida (Stiles, 1993). Comportamiento similar presenta también la Lacticina 481 (De Vuyst y Vandamme, 1994). Por otra parte, la nisina se inactiva con  $\alpha$ -quimotripsina, pero mantiene su actividad luego del tratamiento con pepsina (De Vuyst y Vandamme, 1994) situación similar a la respuesta con estas enzimas que se observó en este trabajo. Por lo anterior, podría inferirse que existe la producción de nisina por *Lactococcus lactis* GU967439, aunque son necesarios estudios complementarios para el aislamiento, purificación y caracterización molecular con la determinación de secuencia de genes de la/s bacteriocina/s para así dar continuidad a este trabajo.

#### CURVA DE CRECIMIENTO EN LECHE: CAPACIDAD DE FERMENTACIÓN Y EFECTO INHIBITORIO DE *LACTOCOCCUS LACTIS*

Los resultados obtenidos mostraron que el número máximo de células viables se obtuvo a las 15 h de incubación (8,72 log ufc/mL), por lo que ese período se correspondería con el final de la fase exponencial para este microorganismo. La literatura indica que la biosíntesis de bacteriocinas y particularmente, la nisina se desarrolla en esta fase (Martínez, 1996; Juncioni de Arauz y col., 2009). Por lo que se definió este tiempo para la producción del cultivo a aplicar posteriormente en la elaboración del queso. De esa forma el inóculo de *Lactococcus lactis* repicado nuevamente en leche continuará en esa fase de crecimiento y por lo tanto produciendo la o las sustancias con actividad antimicrobiana. Además, lo anterior se verifica también por los valores de pH y acidez en ese período. En las condiciones experimentales ensayadas, fue posible determinar la capacidad de fermentación para el cultivo y expresarla como una relación entre temperatura, tiempo y pH, siendo ésta: 35°C/15 horas/5.8.

Por otra parte, el estudio realizado por Martínez, 1996, utilizando *L. lactis* subsp. *lactis* IPLA 729 indica valores máximos de crecimiento (ufc/mL) que coinciden con la producción máxima de nisina, medida en unidades arbitrarias (UA)/mL, cercanos a las 10 horas de incubación tanto en leche como en medio de cultivo M17. En el presente estudio en relación a la curva de crecimiento en leche, se puede observar que existió actividad antilisterial en todos los tiempos evaluados, lo que parece indicar que se mantiene incluso en la fase estacionaria del crecimiento de esta bacteria.

## CALIDAD DE LECHE Y DE QUESOS ELABORADOS

En relación a los resultados de análisis de leche utilizada en el proceso de elaboración es importante destacar que el proceso de pasteurización fue efectivo y por tanto su calidad es adecuada. Así mismo, los resultados de análisis microbiológicos de los diferentes lotes de queso tipo Cuartirolo establecen que cumplen con los requisitos establecidos por el Reglamento Bromatológico Nacional (RBN). Los quesos tipo Cuartirolo elaborados cumplen a su vez con las especificaciones del RBN en cuanto a su composición (MG y humedad) (MSP, 1994).

### EFFECTO ANTILISTERIAL DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO TIPO CUARTIROLO

Con respecto al recuento de *Listeria innocua* durante la maduración se observó que existieron diferencias significativas entre ambos tratamientos, sin embargo la concentración de *Listeria innocua* fue superior a 3 Log de ufc/g en ambos tratamientos, por lo que la utilización de *L. lactis* autóctono no fue efectiva para el control de *Listeria innocua* en las condiciones ensayadas. Esto es similar a lo reportado por Sulzer y Busse, (1991) en un trabajo sobre maduración de quesos Camembert, encontrando que el crecimiento de *Listeria monocytogenes* (SLCC 1694) no se vio afectado cuando se utilizó como cultivo adjunto *Lactococcus lactis* 1881 (productor de nisina) en una concentración de  $10^7$  ufc/g. Sin embargo, reportan que el crecimiento de *Listeria monocytogenes* fue completamente detenido cuando se lo utilizó como único *starter*. No obstante, existen estudios que han demostrado la habilidad de bacteriocinas, especialmente nisina, para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos (Ryser, 1999; Samelis y col., 2003; Rodríguez y col., 2005). Altos niveles de esta bacteriocina han demostrado su efecto contra *L. monocytogenes* en quesos blandos en períodos tan cortos como 24 h (Ryser, 1999). Asimismo Cosentino y col., (2012) comprobaron el efecto contra *Listeria* de seis *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislados de alimentos lácteos artesanales en Italia. En sus resultados indican una reducción de 4 log de ufc/mL en comparación con el control y 2 log de ufc/mL respecto al inóculo inicial de *L. monocytogenes*.

### ACTIVIDAD BACTERIOCINOGÉNICA DE *LACTOCOCCUS LACTIS* EN QUESOS

Los resultados del presente estudio determinaron la existencia de efecto bacteriocinogénico en los quesos elaborados con *L. lactis* (T1) durante toda la maduración. Sin embargo, dicho efecto fue disminuyendo a lo largo de la misma (disminución de los diámetros de los halos de inhibición). Esto podría explicarse por una disminución en la concentración y por tanto en la actividad de la sustancia responsable de ese efecto. Maisnier-Patin y col., (1992), estudiaron el efecto de inhibición de *Listeria monocytogenes* por BAL productoras de nisina en quesos Camembert. Estos autores encontraron que la concentración de nisina tanto en la cuajada como en el queso tuvo una producción paralela al desarrollo de *Lactococcus lactis*. Así describen que la concentración de nisina fue máxima en la cuajada a las 9 hs, luego disminuyó lentamente durante 9-24 hs y drásticamente en la maduración. En presencia de nisina *L. monocytogenes* disminuyó rápidamente entre las 6 h a 24 hs, a su vez el efecto de inhibición se continuó hasta el final de la segunda semana de maduración en el interior de los quesos Camembert, llegando a una reducción de

3.3 log de ufc/g de *Listeria* con respecto al nivel inicial. No obstante, posteriormente este patógeno volvió a desarrollarse en los quesos, manteniéndose una diferencia de 2.4 log ufc/g entre los quesos elaborados con el cultivo productor de nisina y el control durante la maduración (6 semanas). En general observaron que la nisina era efectiva cuando se inoculaba la leche destinada a la elaboración de queso, con una concentración de *L. monocytogenes* entre  $10^1$  y  $10^3$  ufc/mL.

Con respecto a la determinación de pH los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los valores se mantuvieron cercanos a 5 en ambos tratamientos. Estudios realizados por Dal Bello y col., (2012) sobre el efecto antilisterial de varios *Lactococcus lactis* autóctonos productores de diferentes bacteriocinas, en quesos Cottage, indican que el efecto se mantuvo en valores de pH: 6.5, 5.5 y 4.5 (aunque la magnitud en dicho efecto presentó diferencias significativas de acuerdo a la bacteriocina). Estas variaciones deben ser consideradas en futuros estudios.

## EVALUACIÓN SENSORIAL DE QUESOS TIPO CUARTIROLO

En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos en los atributos evaluados, a excepción del sabor salado. Garde y col., (2005) reportan que no hubo diferencias significativas en la intensidad de aroma cuando utilizaron una cepa de *Lactococcus lactis* productora de bacteriocina como cultivo adjunto para elaborar quesos tipo Hispano, en comparación con el tratamiento control, lo que coincide con lo obtenido en este estudio.

Por otra parte, los atributos de textura no presentaron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Este resultado coincide con lo reportado por Ávila y col., (2005) quienes no encontraron diferencias significativas en los atributos de textura, en quesos tipo Hispano elaborados con *Lactococcus lactis* productor de bacteriocinas.

Con respecto al atributo de sabor salado, si bien el proceso de salmuera fue igual para ambos quesos, posiblemente hubo diferencias en la distribución de la misma. Dado que no se determinó el contenido de sal en los quesos no es posible discutir esta variable, la que debería ser considerada en futuros ensayos. No obstante, cabe destacar que el aumento del sabor salado en el queso elaborado con *Lactococcus lactis* (T1) podría ser un factor (concentración de cloruro de sodio) que interfirió también en el desarrollo de *Listeria innocua* en el producto.

## CONCLUSIONES



*Lactococcus lactis* GU967439 tiene actividad antagonista *in vitro* frente a *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*.

La actividad antilisterial de *Lactococcus lactis* GU967439 se mantuvo durante su crecimiento en leche en las condiciones de este trabajo.

La actividad antimicrobiana de *Lactococcus lactis* GU967439 coincide con una sustancia de naturaleza proteica tipo bacteriocina.

La aplicación del cultivo adjunto de *Lactococcus lactis* GU967439 en quesos tipo Cuartirolo no resultó efectivo para el control *Listeria innocua*.

La utilización de *Lactococcus lactis* autóctono en la elaboración de quesos tipo Cuartirolo no modificó las propiedades sensoriales del queso en las condiciones de este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albenzio, M.; Corbo, M.R.; Rehman, S.U.; Fox, P.F.; De Angelis, M.; Corsetti, A.; Sevi, A.; Gobetti, M. (2001) Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk, or by heating the curd in hot whey. *International Journal of Food Microbiology* 67:35-48.
2. Alegría, A.; Delgado, S.; Roces, C.; López, B.; Mayo, B. (2010) Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 143:61-66.
3. American Public Health Association. (2001) *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*. 4a.ed. Washington DC. American Public Health Association. 676p.
4. Ananou, S.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M.; Gálvez, A.; Valdivia, E. (2005) Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Science* 71:549–556.
5. Anchieri, D.; Carrera, D.; Lagarmilla, P.; Aguirre, E. (2007) *Prácticas de Higiene en la Quesería Artesanal*. Programa de desarrollo tecnológico. Área Salud Pública Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Montevideo. Mastergraf, 40 p.
6. Arqués, J.L. (2003) *Tratamientos Combinados de Bacteriocinas y otros Sistemas Inhibitorios para la mejora de la seguridad de los Productos Lácteos*. Universidad Complutense de Madrid. 198p.
7. Ávila, M.; Garde, S.; Gaya, P.; Medina, M.; Nuñez, M. (2005) Influence of a bacteriocin-producing lactic culture on proteolysis and texture of Hispánico cheese. *International Dairy Journal* 15:145-153.
8. Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand (Eds.). *Lactic Acid bacteria*, Nueva York: Marcel Dekker. P 1-66.
9. Aymerich, M.T.; Hugas, M. (1998) Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. *Eurocarne* 72:39-49.
10. Barba, J.L.; Piard, J.C. (1993) Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1416-1422.
11. Bérodier, F.; Lavanchy, P.; Zannoni, M.; Casals, J.; Herrero, L.; Adamo, C. (1997) Guide d'Évaluation Olfacto-Gustative des Fromages à Pâte Dure et Semi-dure. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 30:653-664.
12. Borbonet Legnani, S. (2001) *Historia de la quesería en Uruguay*. Montevideo. LATU. 180 p.

13. Bromberg, R.; Moreno, I.; Delboni, R.R.; Cintra, H.C.; Oliveira, P.T.C. (2005) Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* CTC 204 and the effect of this compound on the mesophilic bacteria associated with raw beef. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21:351-358.
14. Brown, J. E. (2010) *Nutrition now*. 6a ed. Wadsworth Publishing. Belmont. 688p.
15. 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.
16. Casaus, P. (1998) Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium* T136. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 381p.
17. Castellano, P.; Belfiore, C.; Fadda, S.; Vignolo, G. (2008) Review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science* 79:483-499.
18. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2006) Surveillance for Foodborne-Disease, Outbreaks-United States, 1998-2002. Surveillance Summaries, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 55:48p.
19. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2011). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. Disponible en: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/120811/index.html> Fecha de Consulta: 17 de Marzo de 2012.
20. Chen, H.; Hoover, D.G. (2003) Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety* 2:82-100.
21. 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. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2643-2648.
22. Citti, R. (2005) Aislamiento e Identificación de Bacterias Lácticas Bacteriocinogénicas de Leches y Quesos de Búfala de Venezuela: Actividad Antimicrobiana y Caracterización Bioquímica y Genética de sus Bacteriocinas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 447p.
23. Cleveland, J.; Montville, T.; Nes, I.; Chikindas, M. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Review article. *International Journal of Food Microbiology* 71:1-20.
24. Conti Díaz, I.A. (2001) Revisión: Enfermedades emergentes y reemergentes en Uruguay. *Revista Médica del Uruguay* 17:180-199.
25. Corroler, D.; Mangin, I.; Desmasures, N.; Gueguen, M. (1998) An ecological study of lactococci isolated from milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Applied and Environmental Microbiology* 64:4729-4735.

26. Corry, J.E.; Curtis, G.D.; Baird, R.M. (2003) Handbook of Culture Media for Food Microbiology 2a.ed. Amsterdam. Elsevier. P271-315.
27. Cosentino, S.; Fadda, M.E.; Deplano, M.; Melis, R.; Pomata, R.; Pisano, M.B. (2012) Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Articles in Press. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/jbb/aip/376428.pdf> Fecha de Consulta: 23 de Marzo de 2012.
28. Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P. (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. Nature Reviews 3:777-788.
29. Cruz-Chamorro, L.; Puertollano, M.A.; Puertollano, E.; Álvarez de Cienfuegos, G.; De Pablo, M.A. (2006) In vitro biological activities of magainin alone or in combination with nisin. Peptides 27:1201-1209.
30. Cutter, C.; Siragusa, G.P. (1995) Population reductions of Gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. Journal of Food Protection 58:977-983.
31. Dal Bello, B.; Cocolin, L.; Zeppa, G.; Field, D.; Cotter, P.; Hill, C. (2012) Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. International Journal of Food Microbiology 153:58-65.
32. De Man, J.C. (1975) The probability of most probable numbers. Applied Microbiology and Biotechnology 1:67-78.
33. De Vuyst, L.; Vandamme, E. (1994) Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application. London. Chapman. 539p.
34. De Vuyst, L.; Leroy, F. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 13:194-199.
35. Deegan, L.H.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, P. (2006) Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. International Dairy Journal 16:1058-1071.
36. Degenhardt, R.; Sant'Anna, E. (2007) Survival of *Listeria monocytogenes* in low acid Italian sausage produced under Brazilian conditions. Brazilian Journal of Microbiology 38:309-314.
37. Devlieghere, F.; Vermeiren, L.; Debevere, J. (2004) New preservation technologies and limitations. International Dairy Journal 14:273-285.
38. DIEA (2011). Uruguay; Ministerio de Ganadería Agricultura y pesca. Estadísticas agropecuarias. Montevideo, Uruguay, Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,583,O,S,0,MNU,E;27;7;MNU;,.htm> Fecha de consulta: 22 de febrero de 2012.
39. Doyle, M. (2001) Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras. Zaragoza. Acribia. 799 p.
40. Farber, J.M.; Peterkin, P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiology Review 55:476-511.

41. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (FDA/CFSAN). (2003) *Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*. Gyza, Egipto. 127p.
42. Fraga, M.; Scavone, P.; Zunino, P. (2005) Preventive and therapeutic administration of an indigenous *Lactobacillus* sp. strain against *Proteus mirabilis* ascending urinary tract infection in a mouse model. *Antonie van Leeuwenhoek* 88:25-34.
43. Fraga, M.; Perelmuter, K.; Delucchi, L.; Cidade, E.; Zunino, P. (2008) Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:71-78.
44. Friedly, E.C.; Grandall, P.G.; Ricke, S.; O'Bryan, C.A.; Martin, E.M.; Boyd, L.M. (2008) Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes* in hamburger patties. *Journal of Food Science* 73:M174-M178.
45. Galiana, J. (1968) Neurolisteriosis: Primer caso pediátrico nacional. *Archivos de Pediatría de Uruguay* 39:194-202.
46. Gandhi, M.; Chikindas, M.L. (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113:1-15.
47. García, P.; Rodríguez, L.; Rodríguez, A.; Martínez, B. (2010) Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology* 21:373-382.
48. García-Almendárez, B.; Cann, I.; Martin, S.; Guerrero-Legarreta, I.; Regalado, C. (2008) Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control* 19:670-680.
49. Garde, S.; Gaya, P.; Medina, M.; Nuñez, M. (1997) Acceleration of flavour formation in cheese by a bacteriocin-producing adjunct lactic culture. *Biotechnology Letters* 19:1011-1014.
50. Garde, M.; Ávila, M.; Medina, M.; Núñez, M. (2005) Influence of a bacteriocin-producing lactic culture on the volatile compounds, odour and aroma of Hispánico cheese. *International Dairy Journal* 15:1034-1043.
51. Genigeorgis, C.M.; Carnicu, M.; Dutulescu, D.; Farver, T.B. (1991) Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30 °C. *Journal of Food Protection* 54:662-668.
52. González, B.; Arca, P.; Mayo, B.; Suarez, J.E. (1994) Detection, Purification, and Partial Characterization of Plantaricin C, a Bacteriocin Produced by a *Lactobacillus plantarum* Strain of Dairy Origin. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2158-2163.
53. Gurira, O.; Buys, E.M. (2005) Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiology* 22:159-168.
54. Hammer, Ø.; Harper, D.A.; Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontología Electronica* 4:1-9.



55. Hammes, W.P.; Hertel, C. (1998) New developments in meat starter cultures. *Meat Science* 49:125-138.
56. Hartmann, H.; Wilke, T.; Erdmann, R. (2011) Efficacy of bacteriocin-containing cellfree culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology* 146:192-199.
57. Helander, I.; Wright, A.; Mattila-Sandholm, T. (1997) Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology* 8:146-150.
58. Herrero, M.; Mayo, B.; González, B.; Suárez, J.E. (1996) Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *Journal of Applied Microbiology* 81:565-570.
59. Hitchins, A.D. (2003) *Bacteriological Analytical Manual: Capítulo 10, Detection and Enumeration of Listeria monocytogenes in Foods*. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071400.htm> Fecha de Consulta: 10 de Enero de 2011.
60. Holzapfel, W.H.; Geisen, R.; Schillinger, U. (1995) Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24:343-362.
61. Husu, J.R.; Seppänen, T.J.; Sivelä, S.K.; Rauramaa, A.L. (1990) Contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* on dairy farms. *Journal of Veterinary Medicine B*. 37:309-314.
62. International Dairy Federation (IDF). (1995) FIL-IDF Standard N°148A. Enumeration of Somatic cells. Brussels, Belgium. 8p.
63. Jay, M. (2002). *Micrbiología Moderna de los Alimentos*. 4ª ed. Zaragoza, Acribia. 638 p.
64. Joerger, M.C.; Klaenhammer, T.R. (1990) Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin. *Journal of Bacteriology* 172: 6339-6347.
65. Joerger, R.D. (2003) Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *Poultry Science* 82:640-647.
66. Juncioni de Arauz, L.; Faustino Jozala, A.; Gava Mazzola, P.; Vessoni Penna, T. (2009) Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology* 20:146-154.
67. Kamat, A.S.; Nair, P.M. (1996) Identification of *Listeria innocua* as a biological indicator for inactivation of *Listeria monocytogenes* by some meat processing treatments. *LWT-Food Science and Technology* 29:714-720.
68. Kandler, D. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:209-224.

69. Katikou P.; Ambrosiadis, I.; Georgantelis, D.; Koidis, P.; Georgakis, S.A. (2005) Effect of *Lactobacillus*-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef. *Journal of Applied Microbiology* 99:1303-1313.
70. Kemperman, R.; Kuipers, A.; Karsens, H.; Nauta, A.; Kuipers, O.; Kok, J. (2003) Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1589-1597.
71. Kunji, E.R.; Mierau, I.; Hagting, A.; Poolman, B.; Konings, W.N. (1996) The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:187-221.
72. Lane, C.N.; Fox, P.F. (1997) Role of starter enzymes during ripening of Cheddar cheese made from pasteurised milk under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal* 7: 55–63.
73. Larraín, D.; Carvajal, J. (2008) Los aspectos fisiopatológicos y moleculares involucrados en el traspaso de *Listeria monocytogenes* a través de la barrera placentaria (una revisión bibliográfica). *Boletín Escuela de Medicina U.C, Pontificia Universidad Católica de Chile* 33:20-30.
74. Latorre, A.A.; Van Kessel, J.S.; Karns, J.S.; Zurakowski, M.; Pradhan, A.K.; Zadoks, A.N.; Boor, K.J.; Schukken, Y.H. (2009) Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: Evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. *Applied Environmental Microbiology* 75:1315-1323.
75. Lavanchy, P.; Berodier, F.; Zannoni, M.; Noël, Y.; Adamo, C.; Squella, J.; Herrero, L. (1993) L'Evaluation Sensorielle de la Texture des Fromages à Pâte Dure ou Semi-Dure. Etude Interlaboratoires. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 26:59-68.
76. Leroy, F.; De Vuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology* 15:67-78.
77. Lovett, J.D.; Francis, W.; Hunt, J.M. (1987) *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *Journal of Food Protection* 50:188-192.
78. Lundén, J.; Tolvanen, R.; Korkeala, H. (2004) Human Listeriosis Outbreaks Linked to Dairy Products in Europe. *Journal of Dairy Science* 87:E6–E11.
79. Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (1998) Brock: Biología de los Microorganismos. 8ª ed. Madrid, Prentice. 986p.
80. Maisnier-Patin, S.; Deschamps, N.; Tatini, S.R.; Richard, J. (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* 72:249-263.
81. Mannu, L.; Paba, A. (2002) Genetic diversity of lactococci and enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo ewe's milk cheese. *Journal of Applied Microbiology* 92:55-62.
82. Martínez, B. (1996) Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: nisina z y lactococina 972. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo, Asturias, España. 110p.

83. Mathot, A.; Beliard, E.; Thuault, D. (2003) *Streptococcus thermophilus* 580 Produces a Bacteriocin Potentially Suitable for Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Hard Cheese. *Journal of Dairy Science* 86:3068-3074.
84. McAuliffe, O.; Hill, C.; Ross, P. (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufacture with a lacticin 3147-producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology* 86:251-256.
85. Mendonça, P.; Martins, L.; Tassinari, M.; Keizo, A.; Nogueira, G.; Nero, L. (2010) Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potencial. *LWT-Food Science and Technology* 43:1320-1324.
86. Mess, P.; Guerrieri, E.; Bondi, M. (2003) Bacteriocin-like substance (BLS) production in *Aeromonas hydrophila* water isolates. *FEMS Microbiology Letters* 220:121-125.
87. Ministerio de Salud Pública (MSP). (1994) Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto Nº 315/994 2ª ed., Montevideo, IMPO, CD ROM.
88. Montero, H.; Aranibar, G.; Cañameras, C.; Castañeda, R. (2005) Metodología para la caracterización de quesos argentinos. INTI-Lácteos. Presentado en las Jornadas de Análisis Sensorial, Tendencias actuales y aplicaciones "JASLIS 2005". 6 al 8 de septiembre 2005. Buenos Aires, Argentina. 10p.
89. Morgan, S.; Ross, R.P.; Hill, C. (1997) Increasing starter cell lysis in Cheddar cheese using a bacteriocin-producing adjunct. *Journal of Dairy Science* 80:1-10.
90. Motta, S. A.; Brandelli, A. (2008) Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. strain P34. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:641-646.
91. Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H. (1999) *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC. Asm Press. 870p.
92. Núñez, M. (2006) Desarrollo de Fermentos lácticos autóctonos argentinos para la producción de quesos. *Tecnología Láctea Latinoamericana* 39:18-23.
93. O'Brien, M.; Hunt, K.; McSweeney, S.; Jordan, K. (2009) Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. *Food Microbiology* 26:910-914.
94. Opegård, C.; Fimland, G.; Thorbæk, L.; Nissen-Meyer, J. (2007) Analysis of the Two-Peptide Bacteriocins Lactococcin G and Enterocin 1071 by Site-Directed Mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 73:2931-2938.
95. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Organización Mundial de la Salud, FAO/OMS. (2004) Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo: resumen interpretativo. Serie de evaluación de riesgos microbiológicos No 4. Roma. 53p.
96. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2008). Manual sobre animales terrestres, Capítulo 2.9.7. *Listeria Monocytogenes*. 18p. Disponible en: [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.09.07.%20Listeria%20monocytogenes.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.07.%20Listeria%20monocytogenes.pdf) Fecha de Consulta: 17 de Marzo de 2012.
97. Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2002) Enfermedades transmitidas por alimentos en Uruguay. Montevideo. OPS. 203p.

98. Ortolani, M.B.T.; Moraes, P.M.; Perin, L.M.; Viçosa, G.N.; Carvalho, K.G.; Silva Junior, A.; Nero, L.A. (2010) Molecular identification of naturally occurring bacteriocinogenic and bacteriocinogenic-like lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese. *Journal of Dairy Science* 93:2880-2886.
99. Oumer, A.; Gaya, P.; Fernández-García, E.; Mariaca, R.; Garde, S.; Medina, M.; Nuñez, M. (2001) Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocinproducing adjunct culture. *Journal of Dairy Research* 68:117-129.
100. Papagianni, M. (2003) Ribosomally synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advance* 21:465-499.
101. Perelmuter, K.; Fraga, M.; Zunino, P. (2008) In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *Applied Microbiology* 104:1718-1725.
102. Piard, J.C.; Desmazeaud, M. (1992) Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substance. *Lait* 72:113-142.
103. Pinto, M.; Vega y León, M.; Pérez, N. (1998) Métodos de análisis de la leche y derivados. Valdivia, Ediciones Universidad Austral de Chile. 489p.
104. Rammelsberg, M.; Radler, F. (1990) Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology* 69:177-184.
105. Randazzo, C.; Vaughan, E.; Caggia, C. (2006) Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: Microbial dynamics during assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *International Dairy Journal* 109:1-8.
106. Randazzo, C.; Caggia, C.; Neviani, E. (2009) Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiology Methods* 78:1-9.
107. Rao, M.S.; Chander, R.; Sharma, S. (2008) Synergistic effect of chitooligosaccharides and lysozyme for meat preservation. *LWT-Food Science and Technology* 41:1995-2001.
108. Rey, A. M.; Silvestre, A. A. (2005) Comer sin riesgos 2: Las enfermedades transmitidas por alimentos. 2ª ed. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 350p.
109. 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.
110. Rodríguez, J.M.; Martínez, M.I.; Horn, N.; Dodd, H.M. (2003) Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 80:101-116.
111. 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. *International Dairy Journal* 15:51-57.

112. Rosengren, A.; Fabricius, A.; Guss, B.; Sylvén, S.; Lindqvist, R. (2010) Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International Journal of Food Microbiology* 144:263-269.
113. Ross, R.P.; Morgan, S.; Hill, C. (2002) Preservation and fermentation: Past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79:3–16.
114. Ryser, E.T. (1999) Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. En: Ryser, E.T.; Marth, E.H. (Eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Marcel Dekker, New York. P411-503.
115. Samelis, J.; Kakouri, A.; Rogga, K.; Savvaidis, I.; Kontominas, M. (2003). Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4 °C in vacuum packages. *Food Microbiology* 20:661-669.
116. Silva, P.; Pereira, D.; Oliveira, L.; Costa Junior, L. (1997) Físico-Química do leite e derivados. Métodos Analíticos. Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda. Juiz de Fora, Minas Gerais. 189 p.
117. Simjee, S. (2007). *Foodborne Diseases (Infectious Disease)*. New Jersey, Humana Press. 540p.
118. Stead, S.L.; Ashwin, H.; Richmond, S.F.; Sharman, M.; Langeveld, P.C.; Barendse, J.P.; Stark, J.; Keely, B.J. (2008) Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest® SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk. *International Dairy Journal* 18:3-11.
119. Stiles, M.E. (1993) Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. *Journal of Dairy Science* 77:2718-2724.
120. Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:331-345.
121. Stoianova, L.; Sul'timova, T.; Botina, S.; Netrusov, A. (2006) Isolation and Identification of New Nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* from Milk. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42:492-499.
122. Sulzer, G.; Busse, M. (1991) Growth inhibition of *Listeria* spp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. *International Journal of Food Microbiology* 14:287-296.
123. Terzic-Vidojevic, A.; Vukasinovic, M.; Veljovic, K.; Ostojic, M.; Topisirovic, L. (2007) Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlatar cheese. *International Journal of Food Microbiology* 114:36-42.
124. Todorov, S.D.; Dicks, L.M.T. (2005) *Lactobacillus plantarum* isolates from molasses produces bacteriocins active against Gram-Negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* 36:318-326.
125. Trmcic, A.; Obermajer, T.; Rogelj, I.; Bogovic Matijasic, B. (2008) Short communication: Culture-independent detection of lactic acid bacteria bacteriocin genes in two traditional Slovenian raw milk cheeses and their microbial consortia. *Journal of Dairy Science* 91:4535-4541.

126. Valbuena, E.; Barreiro, J.; Sánchez, E.; Castro, G.; Kutchinskaya, V.; Briñez, W. (2008) Predicción del crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche descremada estéril en función a la temperatura. *Revista Científica FCV-LUZ* 18:745-758.
127. Venema, K.; Venema, G.; Kok, J. (1995) Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends in Microbiology* 3:299-304.
128. Vignolo, G.; Palacios, J.; Farias, E.M.; Schilliner, U.; Holzapfel, H. (2000) Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Current Microbiology* 41:410–416.
129. Ward, T. J.; Gorski, L.; Borucki, M. K.; Mandrell, R. E.; Hutchins, J.; Pupedis, K. (2004) Intraspecific Phylogeny and Lineage Group Identification Based on the *prfA* Virulence Gene Cluster of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* 186:4994-5002.
130. Weiss, A.; Hammes, W. (2005) Lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* spp. on cold-smoked salmon. *European Food Research and Technology* 222:343–346.
131. Wood, B.J.; Holzapfel, W.H. (1996). The lactic acid bacteria: The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, London. 392p.
132. Wouters, J.T.; Ayad, E.H.; Hugenholtz, J.; Smit, G. (2002) Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* 12:91-109.
133. Zapata, S.; Muñoz, J.; Ruiz, O.S.; Montoya, O.I.; Gutierrez, P.A. (2009) Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.* 16:75-82.