



Facultad de Veterinaria

Departamento de Higiene y Tecnología
de los Alimentos

Efecto del tiempo de almacenamiento refrigerado sobre la calidad del queso Oaxaca (México) elaborado con leche cruda y estudio taxonómico y tecnológico de su microflora ácido-láctica

Effect of refrigerated storage time on the quality of Mexican Oaxaca cheese made from raw milk, and studies on the taxonomy and technological properties of the lactic acid bacteria isolated from this cheese

Memoria presentada por:

Lucía Fuentes Jiménez

Para obtener el grado de Doctora por la Universidad de León

Dirigida por:

Dr. Javier Mateo Oyagüe

Dra. Irma Caro Canales

Dra. María del Rosario García Armesto

León, Julio de 2014

Esta tesis doctoral estuvo financiada mediante los fondos obtenidos de:

Beca del programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) que otorga la Secretaría de Educación Pública (SEP) mediante la Dirección General de Educación Superior Tecnológica (DGEST), México. Convocatoria 2010. Folio No. ITESOREH-002.

Recursos de apoyo a la investigación del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León

AGRADECIMIENTOS

“No se puede desatar un nudo sin saber cómo está hecho”

Aristóteles

Agradezco a DIOS por la fortaleza que me dio cada día para salir adelante. Sin él, no hubiera logrado terminar esta etapa profesional, por darme primeramente unos padres, a mis dos tesoros (Gema Idalith e Irais Paloma), y mis hermanos. Me ha dado la oportunidad de volver a tejer la madeja de hilo cuando las hebras estaban rotas y dispersas. Por transformar lo difícil en fácil.

Mi formación académica y personal ha sido posible gracias a la ayuda sincera y desinteresada no solo de mi familia, de todos aquellos ángeles (porque eso significan para mí) que fueron partícipes de este largo camino. Muchos de ellos no están presentes, pero su recuerdo y su sabiduría, siempre me acompañaran hasta el final.

No existen palabras para expresarle mi gratitud a mi director de tesis: Dr. Javier Mateo Oyagüe, por todo el apoyo recibido a nivel académico y personal, el tiempo dedicado a este trabajo y por contribuir a mi formación.

A la Dra. Irma Caro Canales, por su colaboración, ayuda y guía en el desarrollo de la parte experimental y en la revisión de este trabajo. Por los consejos que contribuyeron a mi formación académica. Mil gracias!!

A la Dra. María Rosario García Armesto, por la aportación de sus conocimientos y experiencia en la revisión de este trabajo.

A Julio Claro, principalmente por su amistad, porque siempre estuvo dispuesto a ayudar, no solo en el ámbito profesional, también en lo personal, te has convertido en un gran amigo.

Al personal del departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, que en su momento contribuyeron en mi formación académica. En especial a Leti, que siempre fue amable y cariñosa siempre que necesite de su ayuda y a Dolores que siempre alegraba el día con sus risas.

Al personal del departamento de Bioquímica, que amablemente me facilitaron las instalaciones para el desarrollo de la PCR, en especial al Dr. Javier Rúa, Andrea, Álvaro y Joaquín.

A los becarios, a los alumnos de prácticas y los alumnos de intercambio académico, por compartir momentos de alegría y trabajo. Principalmente a Isela que con su alegría y entusiasmo me hizo ver la vida de una forma diferente a pesar que era el primer invierno que no pasaba con mi hija. A Dafne, quien siempre me ayudo cuando me sentí sola en este país, por confiarme a sus amigos y por su inigualable solidaridad. A Osmaida, gracias por acompañarme a mis citas médicas, las cuales coadyuvaron a que no me desmoralizara, por tus consejos y todos los buenos ratos que pasamos juntas, eres un ejemplo de superación. A Don Savage, gracias por todas las clases divertidas de inglés, principalmente por los fines de semana que empleo.

A mis amigos, en especial a Ana Rodríguez y sus hijos David e Iván porque siempre me prestaron auxilio a mí y a mi familia en todo momento, me llevo un grato recuerdo de ustedes, porque antes de ser mi amiga fuiste una hermana. Te quiero mucho!!. A la familia Cachaguay, Don Pedro y Narzi, en ustedes siempre encontré paz espiritual, sus consejos siempre fueron encaminados a ayudarme, a fortalecer mi vida. A Araceli y D. Bricio porque hemos recibido una gran ayuda, sin casi conocernos, por disponer de su tiempo para compartirlo con nosotros. Muchas gracias.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y en particular al Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAP), por facilitarme las instalaciones para la realización del análisis sensorial y parte del estudio microbiológico de este trabajo. De igual forma quiero agradecer a los profesores (Sergio Soto, Rosa Hayde Alfaro, Norma Güemes y Melitón Jesús Franco) que me apoyaron en todo momento para la realización de esos ensayos, así como alumnos.

Al Instituto Tecnológico Superior del Oriente del Estado de Hidalgo, por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por ofrecerme las herramientas necesarias para desarrollarme tanto en el ámbito profesional como personal.

Doy las infinitas gracias al Dr. Gerardo Téllez Reyes, por sus consejos magistrales y muy oportunos, el cual me hizo reflexionar para trasladarme a esta Máxima Casa de Estudios, con el objetivo de culminar esta importante etapa de mi vida como investigadora.

A mis compañeros, amigos y alumnos del ITESA, porque más que asistir a un trabajo, asistía a mi casa, donde todos ustedes me ayudaron a compartir la factura que nos representa la vida paso a paso, principalmente al Mtro. Xenón, Brisia, Vicente, Yazmín, Viviana Ortiz, Sofía, Maritza, Lupita, Sonia, Adriana, Marina, Diana, el Mtro. José Antonio Zamora, el Ing. Carlos Suberbiel, la Ing. Guadalupe Díaz, el Ing. Patricio Ávila, Mtro. J. Arturo Vega,.....

Luis A. Téllez, Karla Sánchez, Gabriel Flores, mi sobrino Elías Bautista y Claudia Lucas. Gracias por dedicarme su tiempo para escuchar mis problemas, por demostrarme su preocupación por mí, por ayudarme a buscarle la solución y sobre todo POR SU AMISTAD.

A mis padres: José Eugenio y Guadalupe. Papá me dejaste un buen ejemplo de superación, de constancia, de generosidad, de un hombre cabal y honrado, gracias por haberme guiado mis pasos desde el cielo. Mi mayor gratitud es para mi madre porque lo que soy, se lo debo a ella. TE QUIERO MUCHO!

A mis hermanos por todos los momentos felices de nuestra infancia. Irma, te agradezco mucho el que me ayudaras en todo momento, principalmente a concluir la preparatoria. Muchas gracias hermanita. Ahhh y no creas que me he olvidado de ti Roberto, gracias cuñado.

A mis tesoros *Gema Idalith e Irais Paloma*, hijas me siento muy dichosa de poder ser su madre, ustedes son la luz de mis días, mi gran felicidad, mi mayor alegría. LAS AMO MUCHO!!, gracias por existir. Este trabajo lo he realizado gracias a su sacrificio, no saben cuánto me dolió dejar esas mamitas extendidas cuando marchaba, sus lágrimas derramadas, me dejaban un nudo en la garganta y un dolor en mi corazón, muchas veces estuve tentada a regresar y olvidarme de todo, pero siempre me detuve a pensar, que les estoy enseñando, que puedo hacer para que su camino sea menos difícil,.... hay mucho que decir, pero quiero que sepan que este trabajo es de ustedes.

Noé, tu sabes por cuantos obstáculos pasamos juntos, gracias por darme fortaleza. Atesoro el sacrificio que has hecho por venir a este País aun cuando sabias lo que implicada estar aquí. TQM.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción general.....	1
1.1. Introducción.....	2
1.1.1. Generalidades sobre la producción de queso en el mundo y en México, en particular.....	2
1.1.2. Definición y clasificación de los quesos.....	2
1.1.3. Quesos de “pasta filata”.....	5
1.1.4. El queso Oaxaca.....	6
1.1.5. Propiedades funcionales y organolépticas de los quesos de “pasta filata” no madurados o de corta maduración.....	15
1.1.5.1. <i>Textura</i>	16
1.1.5.2. <i>Color</i>	18
1.1.5.3. <i>Fundido</i>	19
1.1.5.4. <i>Sabor</i>	21
1.1.6. Microflora ácido-láctica en los quesos.....	22
1.1.6.1. <i>Características generales de las bacterias ácido-lácticas</i>	22
1.1.6.2. <i>Identificación y clasificación de las BAL</i>	23
1.1.6.3. <i>Uso y características tecnológicas de las bacterias ácido lácticas en la elaboración del queso</i>	27
 Capítulo 2. Objetivos del trabajo.....	 33
 Capítulo 3. Evolución de las características microbiológicas, químicas, funcionales y organolépticas del queso Oaxaca elaborado con leche cruda durante su almacenamiento refrigerado (8°C).....	 36
3.1. Introducción.....	37
3.2. Material y métodos.....	40
3.2.1. Toma de muestra y diseño del experimento.....	40
3.2.2. Análisis microbiológicos.....	41
3.2.2.1. <i>Recuento de flora aerobia mesófila viable (FAMV)</i>	42
3.2.2.2. <i>Recuento de bacterias ácido -lácticas (BAL)</i>	42
3.2.2.3. <i>Recuento de bacterias coliformes y Escherichia coli</i>	43
3.2.2.4. <i>Recuento de cocos Gram-positivos/catalasa-positivos</i>	43
3.2.2.5. <i>Recuento de mohos y levaduras</i>	43
3.2.3. Determinación de los componentes mayoritarios de los quesos.....	44
3.2.3.1. <i>Humedad</i>	44
3.2.3.2. <i>Grasa</i>	45
3.2.3.3. <i>Proteína</i>	46
3.2.3.4. <i>Cenizas</i>	47
3.2.4. Determinación de marcadores o índices de acidificación, lipólisis y proteólisis de los quesos.....	48
3.2.4.1. <i>Azúcares</i>	48
3.2.4.2. <i>Ácidos orgánicos de cadena corta</i>	49
3.2.4.3. <i>Ácidos grasos libres</i>	50
3.2.4.4. <i>Nitrógeno soluble en agua y nitrógeno no proteico</i>	53
3.2.4.5. <i>Nitrógeno aminoacídico (α-amínico)</i>	53
3.2.5. Evaluación de propiedades funcionales de los quesos.....	54
3.2.5.1. <i>Extensión durante el fundido</i>	54
3.2.5.2. <i>Color antes y después del fundido</i>	55
3.2.5.3. <i>Textura del queso no fundido</i>	56
3.2.5.4. <i>Análisis sensorial</i>	56

3.2.5.5. <i>Entrenamiento de catadores</i>	56
3.2.5.6. <i>Evaluación del sabor, olor y textura</i>	59
3.3. Resultados y discusión	64
3.3.1. Componentes mayoritarios de los quesos.....	64
3.3.2. Variación cuantitativa de los principales grupos microbianos en el queso durante el almacenamiento a refrigeración.....	65
3.3.2.1. <i>Evolución de la microflora aerobia mesófila viable y de las bacterias ácido-lácticas</i>	65
3.3.2.2. <i>Evolución de coliformes, Escherichia coli, cocos Gram-positivos/catalasa-positivos y mohos y levaduras</i>	69
3.3.3. Variación cuantitativa de los índices o marcadores de acidificación, lipólisis y proteólisis de los quesos durante su almacenamiento a refrigeración.....	73
3.3.3.1. <i>Evolución del contenido de azúcares (lactosa, glucosa y galactosa)</i>	74
3.3.3.2. <i>Evolución del contenido de los ácidos láctico y acético</i>	77
3.3.3.3. <i>Evolución del contenido de ácidos grasos libres</i>	80
3.3.3.4. <i>Evolución del contenido de nitrógeno no proteico y de nitrógeno soluble en agua</i>	86
3.3.3.5. <i>Evolución del contenido de nitrógeno aminoacídico</i>	89
3.3.3.6. <i>Evolución del pH</i>	90
3.3.4. Variación cuantitativa de las propiedades funcionales de los quesos durante su almacenamiento a refrigeración.....	91
3.3.4.1. <i>Evolución del color</i>	92
3.3.4.2. <i>Evolución de la textura</i>	95
3.3.4.3. <i>Evolución de la capacidad de extensión del queso durante el fundido</i>	100
3.3.4.4. <i>Evolución de color del queso fundido</i>	102
3.3.5. Variación cuantitativa de la calidad sensorial de los quesos durante su almacenamiento a refrigeración.....	106
3.3.5.1. <i>Aroma y gusto</i>	107
3.3.5.2. <i>Textura (sensación fundente-pastosidad)</i>	111
3.3.5.3. <i>Aceptabilidad del queso</i>	112
Capítulo 4. Taxonomía y características bioquímicas de las bacterias ácido-lácticas del queso tradicional Oaxaca elaborado con leche cruda	114
4.1. Introducción	115
4.2. Material y métodos	118
4.2.1. Aislamiento de bacterias ácido-lácticas durante el proceso de elaboración del queso.....	118
4.2.1.1. <i>Toma de muestras de leche, cuajada y queso</i>	118
4.2.1.2. <i>Recuentos</i>	119
4.2.1.3. <i>Aislamiento y caracterización taxonómica inicial</i>	119
4.2.2. Identificación genética de las cepas aisladas.....	121
4.2.2.1. <i>Extracción del DNA</i>	121
4.2.2.2. <i>Condiciones de la técnica de PCR del gen 16S RNA ribosómico</i>	121
4.2.2.3. <i>Purificación, secuenciación e identificación de la secuencia</i>	123
4.2.2.4. <i>Análisis estadístico de los datos y preparación de los árboles filogenéticos</i>	123
4.2.3. Estudio bioquímico y tecnológico de las cepas aisladas del queso.....	126
4.2.3.1. <i>Fermentación de carbohidratos</i>	126
4.2.3.2. <i>Actividad enzimática</i>	127
4.2.4. Características tecnológicas.....	128
4.2.4.1. <i>Capacidad de acidificación de la leche</i>	128
4.2.4.2. <i>Actividad proteolítica</i>	128
4.2.5. Aspectos de inocuidad de las bacterias ácido-lácticas aisladas del queso.....	129

4.2.5.1. <i>Sensibilidad frente a los antibióticos</i>	129
4.2.5.2. <i>Actividad hemolítica</i>	134
4.3. Resultados y discusión	135
4.3.1. Recuento de bacterias ácido lácticas en las distintas etapas del proceso de elaboración del queso.....	135
4.3.2. Aislamiento de bacterias ácido-lácticas.....	136
4.3.3. Identificación genética de las cepas aisladas.....	137
4.3.4. Filogenia de las cepas aisladas.....	145
4.3.5. Características bioquímicas. Fermentación de Carbohidratos.....	154
4.3.6. Características bioquímicas. Actividad enzimática.....	169
4.3.7. Características tecnológicas.....	180
4.3.7.1. <i>Velocidad de acidificación</i>	180
4.3.7.2. <i>Actividad proteolítica</i>	185
4.3.8. Características de inocuidad de las bacterias ácido-lácticas aisladas.....	188
4.3.8.1. <i>Sensibilidad a antibióticos</i>	188
4.3.8.2. <i>Actividad hemolítica</i>	202
Capítulo 5. Conclusiones	203
Capítulo 6. Referencias bibliográficas	207

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Introducción

1.1.1. Generalidades sobre la producción de queso en el mundo y en México, en particular

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2012) se estima que la producción de queso en el mundo fue de 2.412 mil toneladas en el año 2011. La elaboración de quesos a nivel mundial viene experimentando un importante incremento en los últimos años (del orden del 17'13% durante el periodo 2010-2012), siendo Estados Unidos (E.E.U.U.), Australia, la Unión Europea (U.E.) y Suiza los países y/o entidades supranacionales que muestran un mayor volumen de producción. En concreto, la U.E. es la principal exportadora de queso, siendo responsable de casi el 30 por ciento del comercio mundial (FAO, 2012). Por el contrario, la Federación Rusa, Japón, Egipto, Arabia Saudí, la República de Corea y México son los principales importadores de este producto. Estos grandes importadores centran su compra en quesos comerciales de bajo precio (FAO, 2012).

La industria de productos lácteos es la tercera actividad más importante dentro de la industria alimentaria mexicana (Secretaría de Economía, 2012), siendo el queso Oaxaca el segundo más importante debido a una gran demanda a nivel nacional (Ramírez-Nolla y Vélez-Ruiz, 2012). A pesar de la gran cantidad de pequeñas empresas lácteas de carácter artesanal (Secretaría de Economía, 2012), en los últimos años, en México, la comercialización de queso se ha focalizado en las grandes cadenas de venta de pizzas y comida rápida, debido al incremento de este tipo de establecimientos (PROFECO, 2012).

1.1.2. Definición y clasificación de los quesos

En el Codex Alimentarius (Codex Standard 283-1978; www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXS_283s.pdf) define

el queso como “el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido por coagulación de la leche u otros productos lácteos (nata, leche parcialmente desnatada, nata de suero o la mezcla de varios de ellos), con separación del suero”. De acuerdo con Eck (1990), la fabricación del queso se realiza en cuatro etapas fundamentales:

1. La *coagulación*: consiste en una serie de modificaciones fisicoquímicas de las micelas de caseína bajo la acción de enzimas proteolíticas o del ácido láctico, que determinan la formación de una red proteica llamada “gel o coágulo”.
2. El *desuerado*: operación por la que el suero se separa de la cuajada, después de la aplicación de una fuerza mecánica, para su posterior distribución en moldes que puedan ser sometidos, o no, a presión.
3. El *salado*: incorporación de sal en el interior de la cuajada, sobre la superficie o por inmersión en salmuera.
4. La *maduración*: conjunto de transformaciones bioquímicas de los constituyentes del queso bajo la acción de enzimas, la mayor parte de las cuales tienen un origen microbiano.

La variabilidad en las características de los quesos que se comercializan a nivel mundial (se estima la existencia de más de 1400 variedades de queso; FAO, 2013) se debe no solamente a los diferentes tipos de leche, o sus mezclas, que pueden emplearse en la fabricación (vaca, oveja, cabra, búfala, etc.) sino también a las diferentes tecnologías que pueden usarse en su elaboración: i) la pasterización, ii) el empleo de diversos microorganismos iniciadores o estárter y iii) la modificación de tiempos y/o temperaturas, así como de otros parámetros de alguna/s de las operación/es del proceso/s de fabricación. Estas variaciones van a tener como consecuencia la obtención de quesos con características diferentes. Los principales parámetros que se utilizan para clasificar los quesos de acuerdo a lo anteriormente descrito son: i) el tipo de leche, ii) el tipo de coagulación, iii) la textura, iv) la humedad, v) el contenido en extracto seco, vi) la cantidad de materia grasa, vii) los

microorganismos que participan en su elaboración, viii) la zona de producción y ix) la tecnología de fabricación (Eck, 1990).

La Norma Mexicana de Sanidad (NOM 243-SSA1-2010) establece varios tipos de quesos, recogiendo en ella muchos de los quesos típicos de México (Tabla 1.1). Sin embargo, existen otros quesos, también considerados como típicos mexicanos, que no son mencionados en dicha norma como por ejemplo del queso Tenate, que es un queso artesanal elaborado con leche cruda. La escasez de datos y contradicciones sobre la composición y calidad de muchas las variedades de quesos mexicanos hace que no estén bien caracterizados, lo que a su vez, posiblemente, determina que no existan Figuras o Marcas de Calidad Diferenciada que amparen estos productos, elaborados, en muchos casos, de forma artesanal. Prueba de ello son los pocos trabajos existentes sobre la caracterización de los quesos mexicanos. En este sentido, en trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación se ha constatado que dentro de un mismo tipo de quesos existe una amplia heterogeneidad, tanto en sus propiedades físico-químicas como en su calidad microbiológica (Caro *et al.*, 2013; Caro *et al.*, 2014).

Tabla 1.1 Clasificación de quesos según la Norma Mexicana NOM 243-SSA1-2010

TIPO DE QUESO	
<i>Frescos</i>	
Frescales	Panela, Canasto, Sierra, Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado, Adobado
De pasta cocida	Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Del Morral, Adobera.
Acidificados	Cottage, Crema, Doble Crema, Petit Suisse, Nuefchatel
<i>Madurados</i>	
Madurados prensados de pasta dura	Añejo, Parmesano, Cotija, Reggianito.
Madurados prensados	Cheddar, Chester, Chihuahua, Manchego, Brick, Edam, Gouda, Gruyere, Emmental, Cheshire, Amsterdam, Butterkase, Coulomiers, Dambo, Erom, Friese, Fynbo, Havarti, Harzer-Kase, Herrgardsost, Huskallsost, Leidse, Maribo, Norvergia, Provolone, Port Salut, Romadur, Saint Paulin, Samsoe, Svecia, Tilsiter, Bola, Jack.
De maduración con mohos	Azul, Cabrales, Camembert, Roquefort, Danablu, Limburgo, Brie
<i>Procesados</i>	
Fundidos y fundidos para untar.	

1.1.3. Quesos de “pasta filata”

Los quesos de “pasta filata” o hilada se distinguen por incluir en su procesado un tratamiento de amasado de la cuajada, previamente acidificada, a una temperatura elevada. Mediante este tratamiento la cuajada adquiere una estructura fibrosa orientando sus fibras proteicas en la dirección de la tensión ejercida (Fox *et al.*, 2000). El término “pasta filata” deriva del italiano y significa “pasta hilada” o “cuajada estirada” y se refiere a la adquisición de una textura fibrosa y elástica única, mediante un proceso de estiramiento que es peculiar de todos los quesos que llevan esa denominación (“pasta filata”) y que confiere a este grupo diverso de quesos su identidad común (Kindstedt *et al.*, 2004).

Los quesos de “pasta filata” parecen ser originarios de la región Norte del Mediterráneo, que abarca Italia, Grecia, los Balcanes, Turquía y Europa del Este. Tradicionalmente, los quesos de “pasta filata” se han producido a partir de leche de vaca, cabra, oveja o búfala de agua. Algunos quesos de “pasta filata” son blandos o semi-blandos por ejemplo: el Mozzarella fresco o el Scamorza (Kindstedt, 2004). Otros son semi-duros como los quesos Caciocavallo, Ostwepock y Kasseri, o duros como el Provolone, Parenca, Kashkaval y Kasar peyniri, entre otros (Ottogalli, 2000).

En la actualidad, en los Estados Unidos de América y países influenciados por sus costumbres se ha popularizado el queso Mozzarella para pizzas o para fundir, que es diferente al Mozzarella típico en Italia (Kindstedt, 1993a). El tipo de queso Mozzarella para pizzas tiene una humedad comprendida entre el 45% y el 52% y un contenido en grasa sobre materia seca que suele estar entre el 30 y el 45%. Este tipo de queso es parecido en composición al queso Oaxaca y tiene menor contenido en humedad y mayor en grasa que el queso Mozzarella tradicional (USDA, 2011).

1.1.4. El queso Oaxaca

El queso Oaxaca es un queso Mexicano tradicional cuyos orígenes se remontan a finales del siglo XIX (Domínguez-López *et al.*, 2011). Este queso se clasifica dentro de la familia de quesos de “pasta filata”. En México el queso Oaxaca pertenece al grupo de los quesos frescos de pasta cocida (NOM 243-SSA1-2010), entendiéndose como queso fresco aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso se caracterizan por su alto contenido de humedad, y por no tener corteza o tener corteza muy fina, pudiendo o no adicionarles aditivos e ingredientes opcionales.

A pesar de que la normativa anteriormente mencionada indica que los quesos deben elaborarse con leche pasteurizada, actualmente una cantidad de queso Oaxaca se fabrica con leche cruda, especialmente el queso Oaxaca elaborado artesanalmente en pequeñas plantas, lo que suscita cierta polémica entre productores, instituciones gubernamentales y consumidores a cerca de la inocuidad de este producto lácteo para el consumo. En algunas instancias se argumenta que teniendo en cuenta que se emplea agua caliente para el

maxalado, la cuajada experimenta un tratamiento térmico equivalente a la pasteurización. Sin embargo, tecnológicamente, el maxalado de la cuajada en agua caliente (entre 55°C a 70°C) no garantiza que en el conjunto de la misma y particularmente en su interior se logren temperaturas y tiempos suficientes como para ser considerada como pasteurizada.

La producción de queso Oaxaca en México, que puede acercarse a las 100.000 toneladas anuales (Domínguez-López *et al.*, 2011), se concentra principalmente en los estados de Oaxaca, Torreón y el Estado de México. Aunque el estado de Hidalgo (donde se ha realizado parte de este estudio; Figura 1) no se encuentra entre los estados con mayor producción, la producción de leche es una de las actividades pecuarias más importantes. De acuerdo con la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2012) en el año 2010 en el estado de Hidalgo se produjeron una media de 419,273 miles de litros de leche al día. El destino de la leche se distribuye, aproximadamente, de la siguiente manera: 56 % se utiliza para la producción de queso, 41 % se pasteuriza y envasa, y sólo 3 % se comercializa como leche fresca cruda (Cervantes *et al.*, 2013). En este estado se han desarrollado tres cuencas lecheras importantes: Valle de Tulancingo, Tizayuca y Mezquital. La región del Valle de Tulancingo es una de las más importantes en el estado de Hidalgo, en cuanto a la producción de leche y queso (Cervantes *et al.*, 2013), albergando más de 56 fábricas de quesos – la mayoría de las cuales podrían considerarse en base a su tamaño como artesanales – donde se procesan anualmente 219 millones de litros de leche (García, 2006).

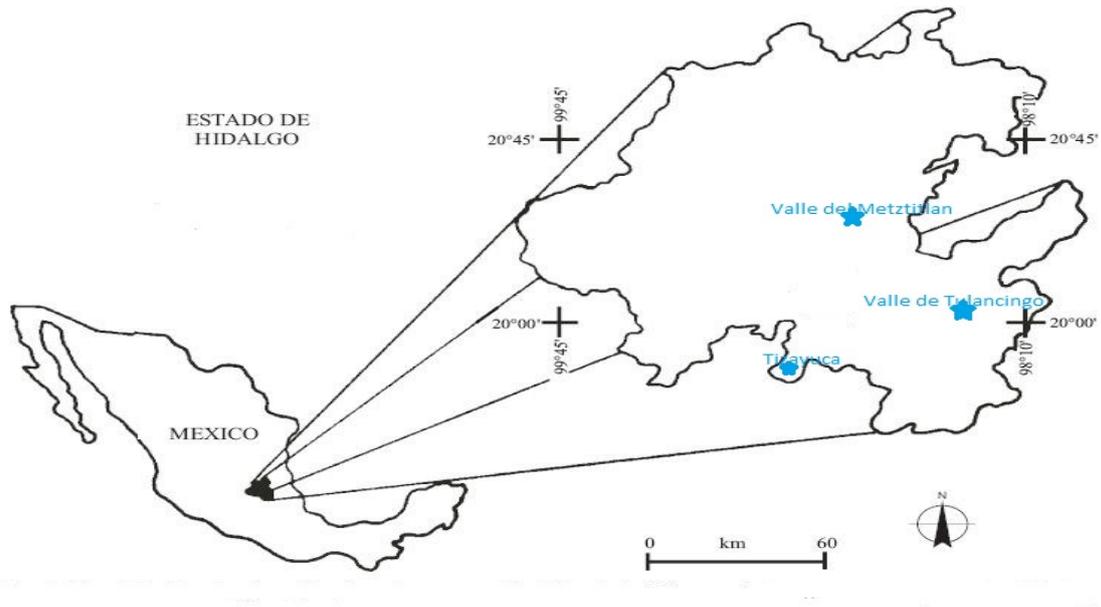


Figura 1.1. Mapa de la República Mexicana con la localización geográfica del estado de Hidalgo y las principales cuencas lecheras (adaptado de Bravo *et al.*, 2009)

El procedimiento seguido en las plantas de elaboración del queso Oaxaca en el centro de México se esquematiza en la Figura 1.2.

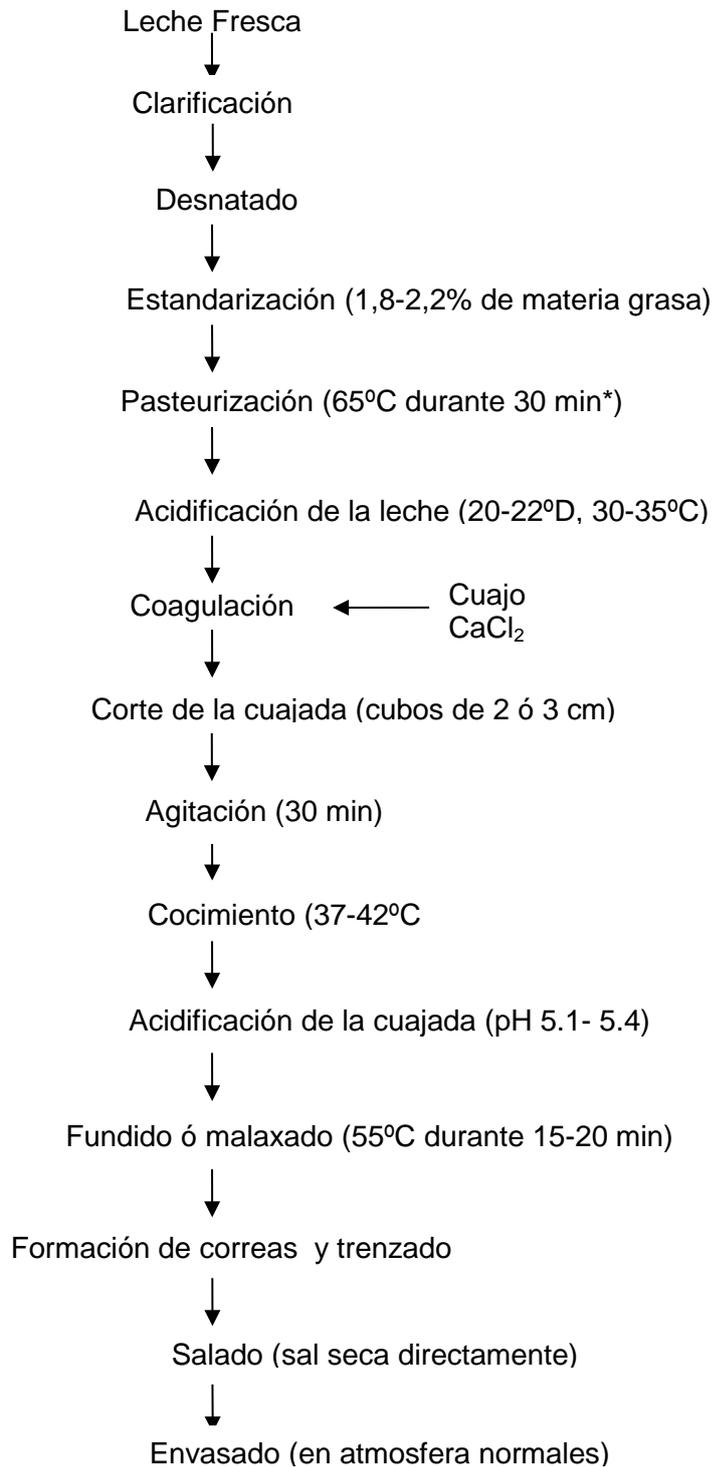


Figura 1.2. Diagrama de flujo de elaboración del queso Oaxaca.*Este proceso puede o no realizarse

La cuajada se acidifica hasta alcanzar un pH de 5,3-5,2. Posteriormente, mediante un malaxado en agua caliente, se moldea y se le da la forma definitiva (Caro *et al.*, 2014). Como principal característica del proceso, hay que señalar que el malaxado se realiza con agua caliente con el fin de que adquiera una textura fibrosa y elástica, de forma que se moldea hasta darle una forma redonda y trenzada (Ramírez-Nolla y Vélez-Ruiz, 2012). Por otra parte, en los quesos elaborados con leche cruda los tiempos de elaboración del queso Oaxaca son variables, dependiendo principalmente de la capacidad de acidificación de la microflora ácido-láctica de la leche de partida, que determinará que el proceso de acidificación sea lento, en ocasiones, mientras que en otras, discurra con bastante celeridad.

Por lo que se refiere a la morfología final del queso Oaxaca, la presentación del mismo es característica y se realiza en forma de correas trenzadas o enrolladas en bola o madeja de lana de entre 0,5 a 5 kg de peso (Figura 1.3). El queso se comercializa envasado en bolsas de plástico, en atmosfera normal o al vacío (Ramírez-Nolla y Vélez-Ruiz, 2012). Este queso se caracteriza por no tener corteza, además de por tener un periodo de vida de útil corto, requiriendo condiciones de refrigeración para su conservación. Su superficie es brillante con un color, tanto en la superficie como al corte, blanco nacarado o hueso. Así mismo, al corte, las correas se abren en sentido paralelo y dan aspecto fibroso, como de pechuga de pollo (Figuras 1.4 y 1.5). El queso es rebanable, sin ojos y de pasta semi-blanda. Estas características y su sabor peculiar y suave permiten que sea consumido fresco o fundido, incluido como ingrediente en distintas preparaciones culinarias.



Figura 1.3. Aspecto del queso Oaxaca envasado al vacío donde se aprecian las correas enrolladas en forma de madeja



Figura 1.4. Aspecto del queso Oaxaca, correa abierta donde se aprecia la fibrosidad del queso.

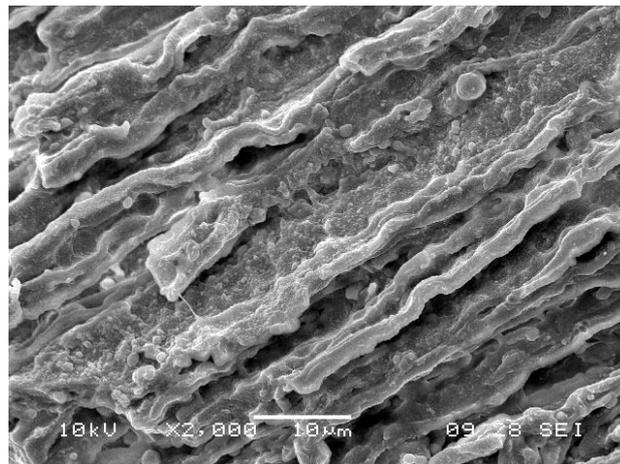


Figura 1.5. Fotografía del queso Oaxaca obtenida con el microscopio electrónico (con el permiso de Irma Caro Canales).

Las características tecnológicas y de textura deseables en el queso Oaxaca, según manifiestan los elaboradores y catadores especializados del mismo, son las siguientes:

- El queso debe de fundir (gratinar).
- Las correas del queso y su fibrosidad deben permanecer bien definidas.
- La correa del queso debe tener una dureza intermedia, siendo capaz de formar hilos al desmenuzarse, de forma similar a lo que ocurre con una pechuga de pollo (previamente hervida) cuando se deshebra.

Por otra parte, los defectos más comunes atribuidos a este tipo de queso según Pérez (1999) son:

- Queso “cocido”, sin buena estructura fibrosa y de textura adherente. Este defecto se debe a un exceso de acidez en el momento del malaxado.
- Pasta “seca y dura”. En este caso, el defecto se relaciona con una falta de acidez al inicio del cuajado (pH alto al cuajar).
- Sabor amargo. Que puede deberse a una contaminación con levaduras, mohos o bacterias proteolíticas. También a una alta actividad proteolítica derivada del cuajo.
- Sabor rancio, debido a un exceso de lipólisis de la materia grasa, probablemente por la presencia de lipasas bacterianas.
- Existencia de hinchazón (inflado), debido a una contaminación por bacterias coliformes o levaduras.
- Defectos de fundido. Cuando funde en exceso o, por el contrario, no funde, se suele asociar con demasiada o escasa acidez de la pasta, respectivamente. Sin embargo, si la pasta al fundir tiene una consistencia grumosa, se asocia generalmente con adulteración de la leche de partida con suero o con la presencia en la misma de contaminantes químicos como por ejemplo: residuos de antibióticos u otros.
- Presencia de mohos en la superficie del queso como consecuencia de una falta de higiene en el proceso de elaboración, un envasado defectuoso o condiciones descuidadas de almacenamiento.
- Consistencia reblandecida de la pasta. Se asocia con temperaturas demasiado elevadas durante la pasterización o el malaxado. También con un malaxado demasiado prolongado.
- Color amarillento. Puede deberse a la oxidación de la grasa por contacto prolongado con el aire; a la presencia de adulterantes por ejemplo, adición de agua oxigenada, NaOH, ó contaminantes químicos como cobre, dióxido de cloro en la leche; o a la presencia de pigmentos como los betacarotenos en la materia grasa de la leche.

En estudios previos se ha determinado la composición química y características microbiológicas del queso Oaxaca por miembros del grupo de investigación de los directores de la tesis doctoral, figurando un resumen de los mismos en las Tablas 2.2. y 2.3., respectivamente (Caro *et al.*, 2013 y Caro *et al.*, 2014).

Tabla 2.2. Características químicas y fisicoquímicas del queso Oaxaca elaborado en el estado de Hidalgo

Parámetros	Media ± D.E.
pH	5,0± 0,2
a_w	0,973±0,006
Humedad (% m/m)	50,8±2,2
Cenizas (% m/m)	3,5± ,4
Proteína (% m/m)	21,4±1,4
Grasa (% m/m)	22,4±2,5
NaCl (% m/m)	1,6±0,7
MG/MS (% m/m)	45,6±4,9
H/MSD (% m/m)	65,6±0,3

D.E.: Desviación Estandar; MG: Materia Grasa; MS: Materia Seca; H: Humedad; MSD: Materia Seca Desengrasada. Fuente: Caro *et al.* (2014),

Tabla 2.3. Características microbiológicas del queso Oaxaca (expresadas en \log_{10} ufc/g)

FAMV	BAL	Mohos y Levaduras	Coliformes	<i>Escherichia coli</i>
7,63±0,76	6,52±0,85	4,82±2,52	4,08±1,41	3,61±1,21

FAMV: Flora Aerobia Mesófila Viable; BAL: Bacterias Ácido-Lácticas. Fuente: Caro *et al.* (2013),

Teniendo en cuenta su composición química y de acuerdo a la clasificación de los quesos propuesta por Eck (1990), el queso Oaxaca es un queso de pasta semiblanda, en el límite entre graso y semigraso (establecido en un porcentaje de materia grasa sobre materia seca de 45%). La composición del queso Oaxaca es similar a la de otro queso mexicano de “pasta filata”, el queso Asadero, que es elaborado principalmente en el Norte del país (Alba *et al.*, 1991; USDA, 2005). La diferencia más notoria entre ambos quesos es que el Asadero tiene un contenido en humedad menor que el Oaxaca, aunque esa diferencia no es muy acusada (entorno a un 5% menos de

humedad). Alba *et al.* (1991) resaltaron en su trabajo la similitud entre el queso Mozzarella (bajo en humedad, elaborado en los Estados Unidos) y el Asadero. Por lo tanto también cabe esperar una gran similitud entre el Mozzarella y el Oaxaca, lo que se corrobora, como ya sugerimos anteriormente, al comparar los valores de la composición de ambos quesos Oaxaca mexicano y Mozzarella (USDA, 2011).

Por otra parte, la microflora del queso Oaxaca mostrada en la Tabla 2.3 se caracteriza por la contribución predominante del grupo de BAL en el conjunto de la flora aerobia mesófila viable. También hay que destacar la presencia de recuentos elevados de bacterias coliformes y de *E. coli*, que se asocian con una calidad higiénica deficiente de la leche y/o de las prácticas de elaboración. La composición microbiana de los quesos de “pasta filata”, en general, y del queso Oaxaca, en particular, depende en gran medida de si se lleva a cabo la acidificación de la leche de forma espontánea o de si se usa leche pasteurizada y cultivos iniciadores para su fabricación. En el primer caso, existirá en el queso una mezcla compleja de microorganismos, cuya composición dependerá de numerosos factores ambientales siendo, en general, las BAL la población dominante (Parente *et al.*, 1998; Coppola *et al.*, 2001). En el segundo caso, predominarán las bacterias utilizadas en los cultivos iniciadores, que suelen ser una mezcla de BAL en la que habitualmente se emplean cepas termófilas (Ober *et al.*, 1991). El uso de estos cultivos puede conducir a una menor variabilidad en la microflora de los quesos resultantes.

En los últimos años se están realizando, de forma creciente, trabajos de investigación relativos al queso Oaxaca, aunque todavía quedan aspectos por estudiar. En las investigaciones publicadas hasta el momento se muestran y discuten datos relativos a las propiedades (físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales) del queso Oaxaca referidas al producto final (De Oca-Flores *et al.*, 2009; Villanueva-Carvajal *et al.*, 2012; Caro *et al.*, 2013; Saxer *et al.*, 2013), aspectos tecnológicos relacionados con la elaboración del queso como el efecto de la composición de la leche, de la pasteurización o de las condiciones de acidificación sobre características de calidad, microestructura y/o rendimiento del queso (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2006; Caro *et al.*, 2011; Colin-Cruz *et al.*, 2011; Morales-Celaya *et al.*, 2012), o aspectos socio-culturales y económicos (Domínguez-López *et al.*, 2011). Sin embargo, a la vista de estas

publicaciones no se han estudiado aún los cambios que experimentan las propiedades responsables de la calidad de este queso durante su almacenamiento.

1.1.5. Propiedades funcionales y organolépticas de los quesos de “pasta filata” no madurados o de corta maduración

Por propiedades funcionales de los quesos se entienden aquellas que les confieren aptitudes beneficiosas para su almacenamiento y conservación, presentación y preparación culinaria. Se ha descrito un número elevado de propiedades funcionales en los quesos cuya importancia depende en cierta medida del tipo de queso considerado.

En primer lugar, se han de citar las propiedades funcionales que tienen los quesos antes de su eventual tratamiento térmico (fundido). Unas están relacionadas con la textura: facilidad para el rebanado y/o desmenuzado, dureza, mantenimiento de la forma original, etc. Otras son relativas al color del queso. En segundo lugar, en los quesos frescos o poco madurados, generalmente consumidos poco después de su elaboración, con una pasta acidificada, pH igual o inferior a 5.4, como es el caso de la mayoría de los quesos mexicanos, entre ellos el Oaxaca, la aptitud para el fundido es una de las características más relevantes para la preparación culinaria de diversos platos: quesadillas, pizzas, etc. El fundido viene definido a su vez por diversos parámetros como son: la derretibilidad o extensión durante el fundido, temperatura de fundido, tiempo de fundido, el estiramiento del queso fundido, la retención de grasa en el fundido o los cambios de color. La composición del queso es responsable última de las propiedades funcionales (Fox *et al.*, 2000). Además está bien documentado que las propiedades funcionales de los quesos se ven afectadas por las condiciones de elaboración y su maduración.

En la bibliografía se han encontrado numerosos estudios sobre las propiedades funcionales del queso Mozzarella (Yun *et al.* 1995; Fife *et al.* 1996; Guinee *et al.* 2000; Joshi *et al.* 2004, Sheehan and Guinee, 2004; Kindstedt, 2004; Sheehan *et al.* 2005; Zisu and Shah 2005). Sin embargo, hasta el momento, los estudios relacionados con las propiedades funcionales del queso Oaxaca son escasos.

1.1.5.1. Textura

La textura es muy importante en la selección y preferencia de los alimentos, siendo reconocida como uno de los principales parámetros de la calidad (Bourne, 1973). Los atributos sensoriales de textura de los quesos son varios y se dividen en características mecánicas, geométricas y otras (Fox *et al.*, 2000). La textura en el queso es el resultado de su estructura, adquirida durante el proceso de elaboración y modificada durante la maduración.

El queso Mozzarella, como representante de los quesos de “pasta filata” no madurado, en comparación con otros quesos, presenta una dureza relativamente baja, y alto valor de elasticidad, cohesividad, adhesividad, masticabilidad y gomosidad (Tunick *et al.*, 1991). El queso Oaxaca, por su parte, comparado con otros quesos mexicanos, también presenta una baja dureza y elevada cohesividad, pero su elasticidad y adhesividad son bajas (Caro *et al.*, 2014).

En los quesos de “pasta filata” no madurados, en general, y en el queso Oaxaca, en particular, se valora su facilidad de desmenuzamiento como atributo de textura. Esta propiedad se puede definir como la aptitud de un queso para ser desmenuzado. Esta operación se dificulta tanto si el queso es muy blando y pastoso como si es duro y quebradizo. También es importante para el queso Oaxaca en relación a su textura, el mantenimiento de la estructura fibrosa característica y de la integridad de la correa y la firmeza del queso a lo largo de la conservación.

En los quesos de “pasta filata” la operación de estirado trae como consecuencia que la proteína dominante, el fosfoparacaseinato monocálcico, adquiera una microestructura fibrosa. La proteína se alinea en fibras orientadas en la dirección del estirado, con columnas intercaladas embebidas de suero y con grasa emulsificada entre las mismas (McMahon *et al.*, 1993). La aptitud de la cuajada para el estirado e hilado en el proceso de malaxado está principalmente relacionada con el calcio (Lucey y Fox, 1993). Demasiado Ca asociado a la caseína producirá una cuajada dura que se desgarrará y se fracturará durante el hilado, mientras que un contenido muy bajo en Ca producirá una completa pérdida de estructura y elasticidad. La presencia de Ca asociado a la proteína, a su vez, depende del pH. Al descender el pH, el fosfato de calcio

coloidal, ligado a la caseína y a la para κ -caseína que forman la “malla” (o red de la cuajada), se vuelve soluble y migra hacia la fase acuosa (sérica), dejando la matriz estructural parcialmente desmineralizada (Lucey y Fox, 1993) y muy hidratada. Además del Ca, la textura del queso de “pasta filata” puede depender de factores como la temperatura de malaxado: a mayor temperatura, textura más firme (Tunick *et al.*, 1993), o la cantidad de sal (Kindstedt, 1993b).

En el queso, la caseína es el componente estructural más importante ya que forma una red que atrapa la grasa y embebe el agua. Las condiciones utilizadas en la elaboración del queso determinan el grado de agregación de la caseína y por lo tanto la formación de estructuras más o menos rígidas y porosas. La grasa y el agua se ubican en el interior de la matriz proteica de caseína y tienen un papel plastificante al disminuir la fricción entre cadenas de proteína (Prentice *et al.*, 1993). De esta forma, la composición mayoritaria del queso determina en gran medida la textura del mismo. Un aumento en el contenido de humedad (manteniéndose constante la cantidad de grasa sobre extracto seco) provoca una textura más blanda (Tunick *et al.*, 1991). La cantidad de proteína aumenta la dureza y la de grasa la disminuye; en este sentido, Sundar y Upadhyay (1990) proponen el coeficiente proteína/grasa como indicador de dureza del queso. También se ha comprobado que en el queso Mozzarella para pizza, un contenido en grasa superior al 38% produce un queso blando y difícil de desmenuzar (Kindstedt, 1993b). Igualmente, se ha encontrado una relación inversa entre contenido en grasa y elasticidad y cohesividad (Tunick *et al.*, 1991). Por el contrario, una disminución del contenido de grasa (con el fin de elaborar quesos con bajo contenido en grasa) genera normalmente cambios no deseados en la textura, en particular genera quesos duros y gomosos, que pueden empobrecer su calidad (McMahon *et al.*, 1993). El contenido en minerales también está relacionado con la dureza, a más cantidad de Ca, que normalmente viene dado por pH más elevados, mayor es la dureza (Kindstedt, 1993b).

La cohesividad del queso, además de depender de la grasa del queso, depende de factores como la humedad sobre materia seca desengrasada, minerales, proteínas y pH (Sundar y Upadhyay, 1992). Los quesos con bajo contenido en grasa y alto en proteína son más cohesivos y un pH bajo en el malaxado disminuye la cohesividad. La elasticidad está relacionada con el

contenido en proteínas y su grado de desmineralización, más proteínas y más minerales hacen el queso más elástico (McMahon *et al.*, 1993). Por otra parte, la proteólisis en el queso durante su maduración o almacenamiento juega un papel fundamental en su textura, como se verá posteriormente.

Dentro de los métodos instrumentales más utilizados para determinar la textura de los quesos se encuentra el análisis de perfil de textura, en el cual se determinan propiedades primarias como la dureza, cohesividad, elasticidad y adhesividad y otras secundarias como la fracturabilidad, masticabilidad y gomosidad (Hennelly, 2006). En el queso Oaxaca la aplicación de esta técnica no parece ser sencilla debido a la forma del queso, que forma correas de pequeño diámetro que no permiten obtener cilindros o cubos suficientemente grandes, y su estructura fibrosa, hace que el cubo o cilindro de queso utilizado para la medida no sean homogéneos en relación a la orientación de las fibras que se considere.

1.1.5.2. Color

El color de los quesos crudos está influido por el tipo de leche empleada, por la técnica de elaboración y por el tiempo de maduración. El agente colorante en la leche responsable del color de los quesos es el caroteno, un pigmento amarillo con ligeros tintes naranjas, que se encuentra contenido en la grasa de la leche (Fox *et al.*, 2000). Como dicha grasa pasa en su mayor parte al queso, se produce una concentración de este color después de la coagulación.

El color del queso durante el fundido se ve afectado tanto por fenómenos químicos, como la reacción de Maillard, como por fenómenos físicos como la pérdida de humedad o la exudación de grasa (Richoux *et al.*, 2008). Cuando el queso Mozzarella, o el queso para fundir en general, se hornea, la superficie del queso pierde luminosidad y adquiere una tonalidad marronácea que si es excesiva puede llegar a ser un defecto (Imm *et al.*, 2003; Wang y Sun, 2003). El pardeamiento ocurre cuando la concentración de azúcares es elevada. En concreto, se ha mencionado que cuando hay una acumulación de galactosa en el queso, debido a la predominancia de microorganismos que no utilicen dicho azúcar, se produce pardeamiento considerable al fundir el queso con calor. Por

el contrario, una baja cantidad en azúcares libres y/o en aminoácidos, péptidos u otras moléculas con grupos amino libre, hacen que el queso no presente pardeamiento. Existen otros factores de composición con efecto sobre el pardeamiento como la sal, que en concentraciones en agua superiores al 4% favorecen el pardeamiento (McMahon *et al.*, 1993). Por otra parte, la exudación de grasa durante el fundido aumenta el brillo y empeora la apariencia y el color de los quesos fundidos. En quesos con alto contenido en grasa sobre materia seca se incrementa aumenta su derretibilidad y hay una disminución en la retención de grasa durante el fundido (Tunick *et al.*, 1991), que, en el queso Mozzarella lleva a ser muy exagerada cuando el porcentaje grasa sobre extracto seco excede el 37% (Kindstedt, 1993b).

El color de los quesos puede medirse subjetivamente por comparación con tablas de color y objetivamente usando un aparato medidor de color (espectrofotocolorímetro). McMahon *et al.* (1993) realizaron la determinación objetiva del color, a través de la espectrofotometría de reflectancia, ya que esta técnica instrumental es uno de los métodos más utilizados debido a su estrecha correlación con la percepción visual del ojo humano. Esta metodología permite evaluar los cambios de color a lo largo del tiempo, sobre una misma muestra y sin necesidad de su destrucción; por lo que constituye una técnica rápida y fácil de realizar.

1.1.5.3. Fundido

El fundido se puede definir como la capacidad del queso, desmenuzado o no, para fluir (expandirse) y fusionarse, formando una masa derretida y estirable (Caro *et al.*, 1999). El fundido es una de las propiedades funcionales más importantes de los quesos que se van a utilizar como ingredientes para la preparación de alimentos cocinados o calentados: quesadillas, pizzas, etc.

La composición del queso influye sobre sus características de fundido. A medida que el contenido en Ca y P descienden en la cuajada (debido generalmente al descenso del pH durante la acidificación de la misma) el queso funde más intensamente (Kindstedt, 1993b). La propiedad de estirado del queso fundido (capacidad de formar tiras fibrosas, lisas y resistentes que se alargan sin romperse al aplicar una tensión de tracción al queso) está también

relacionada con la concentración de Ca y P y, consecuentemente, con el pH de la cuajada y con la integridad de la caseína (Kindsedt, 1993b). El pH alto de la cuajada, además de empeorar el fundido del queso y el estirado, provoca una mayor pérdida de grasa. El contenido en sal influye negativamente sobre el fundido, en la revisión de Kindsedt se menciona que un queso Mozzarella con un 1,8% de sal funde mucho peor que otro con el 1,0%. Sin embargo, una mayor cantidad de sal parece prevenir el defecto de separación de grasa en el queso, pues aumenta la capacidad emulsificante de las caseínas por mecanismos relacionados con el intercambio iónico.

Se han descrito varias formas de evaluar la extensión del queso durante el fundido que consisten básicamente en dos tipos de experimentos. En uno de ellos se coloca un cilindro de queso sobre una base plana y se calienta a una temperatura y tiempo establecidos, determinándose finalmente el % de extensión del queso fundido sobre el área inicial del cilindro de queso (Guinee *et al.*, 2000; Richoux *et al.*, 2001; Wang y Sun, 2001). El otro consiste en meter un cilindro de queso en un tubo, colocarlo horizontalmente en un horno y calentar a temperaturas y tiempos diversos determinando la distancia de avance del queso en el tubo (McMahon *et al.*, 1993; Hennelly *et al.*, 2005). El tiempo que tardan los trozos de queso en mostrar una consistencia semilíquida es otra forma de medir la propiedad funcional del fundido (Guinee *et al.*, 2000). Estos últimos autores han desarrollado un método para su determinación que consiste en colocar un cilindro de queso desmenuzado sobre una base plana en un horno a una temperatura determinada y medir el tiempo que transcurre hasta fundirse el queso, es decir, hasta que no se puedan diferenciar los trozos visibles.

El estirado del queso fundido usualmente se cuantifica manualmente usando un tenedor y levantando el queso fundido, debiéndose encontrar al menos un estiramiento de 7,5 cm para poder decir que el queso “estira” bien (USDA, 1980). Apostolopoulos (1993) describe otras dos formas de evaluar el estirado. En la primera, el queso desmenuzado se coloca sobre una base de pizza constituida de dos porciones concéntricas de 60 y 165 mm de diámetro que a su vez se colocan sobre discos concéntricos del mismo tamaño. El disco del centro tiene un eje perpendicular a su superficie. El conjunto se introduce en un microondas y después del calentamiento deseado se procede a levantar

el disco central a una velocidad constante (1500 mm/min) observándose la altura a que se puede levantar el disco sin que las tiras de queso se rompan. El segundo método de medida consiste en comprimir un pedazo cilíndrico de queso una vez fundido entre dos placas metálicas, una de las cuales está caliente. Durante la compresión se traza la curva de la fuerza de deformación necesaria para que el trozo de queso alcance el espesor fijado. Por su parte, McMahon *et al.* (1993) relacionan la viscosidad aparente del queso fundido a 60°C, determinada mediante un viscosímetro de Brookfield con un vástago en forma de T, con el estirado, concluyendo que una alta resistencia al giro implica un gran estirado.

Por otra parte, la pérdida de grasa durante el fundido se puede determinar colocando un cilindro de queso sobre un papel, procediendo a su fundido y midiendo la extensión del círculo de grasa que se forma en el papel (Richoux *et al.*, 2001). La retención de grasa también se puede determinar en el queso mediante homogeneización en un medio acuoso, calentamiento y medida la cantidad de grasa liberada mediante centrifugación (Kindstedt y Fox, 1991; McMahon *et al.*, 1993).

1.1.5.4. Sabor

Los sabores principales de los quesos son el salado y el ácido. El salado por la adición de sal y el ácido por la formación de ácido láctico. Además, algunos quesos pueden llevar azúcar por lo que se detecta el sabor dulce. También en los quesos se puede detectar el sabor amargo, que viene dado por la presencia de péptidos originados principalmente a partir de las regiones hidrofóbicas de las proteínas mediante procesos proteolíticos (Fox *et al.*, 2000). El análisis de los compuestos sápidos se lleva a cabo por diversas técnicas instrumentales como la cromatografía, electroforesis y métodos enzimáticos (Fox *et al.*, 2000).

Respecto a los componentes aromáticos, alguno de los atributos más utilizados para describir el aroma de los quesos son: 'a crema', 'a yogur', 'agrio', 'a fruta', 'herbáceo', 'amoniacal', 'a establo', 'a leche', 'a moho', 'a nuez', etc. (Fox *et al.*, 2000; Retiveau *et al.*, 2005). Los numerosos compuestos volátiles implicados en el aroma de los quesos se detectan y cuantifican

mediante cromatografía gaseosa, normalmente con un detector de espectrometría de masas. Estos compuestos pertenecen a las familias de los alcoholes, ácidos, compuestos nitrogenados, azufrados, cetonas y aldehídos, ésteres e incluso terpenos (Fox *et al.*, 2000) y proceden de las materias primas, de las reacciones de proteólisis y lipólisis enzimáticas (catalizadas por enzimas endógenas o microbianas), de otras reacciones bioquímicas mediadas por bacterias, de la reacción de Maillard y de la de Strecker, así como de la oxidación de las grasas (Fox y Wallace, 1997). Cuando hay una descompensación en los volátiles de los quesos el sabor del queso puede desviarse de lo normal, adquiriendo matices no deseados que disminuyen su calidad (olores rancios, afrutados, químicos, etc.).

1.1.6. Microflora ácido-láctica en los quesos

1.1.6.1. Características generales de las bacterias ácido-lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos que tienen como característica común la producción de ácido láctico como principal producto derivado de la glucólisis. Estas bacterias se encuentran en diversos hábitats, como el tracto intestinal, vegetales, alimentos fermentados, etc. Los géneros más importantes de BAL son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* y *Tetragenococcus* (Schleifer *et al.*, 1995, Reddy *et al.*, 2008), siendo el género *Lactobacillus* el más amplio y diverso, con alrededor de 80 especies reconocidas (Devlieghere *et al.*, 2004; Galvez *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista de la fermentación de los carbohidratos, las BAL se pueden agrupar en dos grandes grupos, según sus patrones de fermentación:

- I) El grupo homofermentativo compuesto por los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y el grupo homofermentativo de *Lactobacillus* que producen ácido láctico como producto principal de la fermentación de la glucosa, utilizando la vía de glucólisis Embden-Meyerhoff (Axelsson, 1998). Estas BAL

fermentan 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico (Parra, 2010), generando un rendimiento neto de 2 moles de ATP por molécula de glucosa metabolizada

- II) El grupo heterofermentativo, integrado por los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium* y algunos *Lactobacillus* (Carr *et al.*, 2002). Estos microorganismos, producen aproximadamente 50% de ácido láctico; por cada mol de glucosa que fermentan, generando además de ácido láctico, etanol, CO₂, ácido acético, etc. (Devlieghere *et al.*, 2004; Ly *et al.*, 2008) por la vía 6-fosfogluconatofosfocetolasa (Galvez, 2007). Esta vía heterofermentativa genera un mol neto de ATP.

En la industria láctea son cinco los géneros de BAL de mayor relevancia: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus* (Beresford *et al.*, 2001), siendo numerosos los productos lácteos en los que intervienen dichos microorganismos, por ejemplo: quesos, suero de mantequilla fermentado, mantequilla, yogur, etc. (Gilliland, 1986; Todorov, 2009, Rizzello *et al.*, 2014). En estos productos lácteos, las BAL tienen gran importancia, al participar en su fermentación y/o maduración, proporcionándoles multitud de propiedades. Su crecimiento causa acidificación de la matriz, siendo esta la primera propiedad de los productos lácteos fermentados y por ende mejoran las características sensoriales como el sabor, el aroma, la textura y la calidad nutritiva, produciendo texturas y sabores únicos (Savadogo *et al.*, 2006; Arribas y Polo, 2008; Hugenholtz, 2008).

1.1.6.2. Identificación y clasificación de las BAL

Los trabajos de clasificación de las BAL fueron iniciados en 1919 por Orla-Jensen. Esa clasificación se basó en la morfología celular, la forma de fermentar la glucosa, la temperatura de crecimiento y la utilización de diversos azúcares (Axelsson, 1989). Dicho trabajo constituyó un paso importante para el conocimiento de las BAL. Actualmente, algunas de las características definidas por Orla-Jensen son todavía utilizadas para su caracterización. Como características generales las BAL son organismos Gram positivos, no esporulados, cocos o bacilos, no móviles, microaerófilos o aerotolerantes,

catalasa y oxidasa negativos y producen ácido láctico como el principal producto de la fermentación de carbohidratos (Orla-Jensen, 1924; Carr *et al.*, 2002).

Las BAL constituyen un grupo diverso de bacterias que tienen una morfología, una fisiología y un metabolismo similar y que, además, se encuentran filogenéticamente próximas (Khalid, 2011, Cintas *et al.*, 2001; Rojas y Vargas, 2008). Actualmente, su clasificación se ha venido realizando desde las perspectivas fenotípica y genotípica. La primera metodología nos acerca a la taxonomía bacteriana teniendo en cuenta las características morfológicas, las propiedades fisiológicas, bioquímicas y metabólicas, así como otros caracteres tales como la composición de la pared celular o los ácidos grasos de las células (Stil and Holzapfel, 1997; Bou *et al.*, 2011).

Los métodos fenotípicos han sido utilizados para la identificación de la microflora presente en los quesos. Actualmente se reconoce que estos métodos presentan algunos inconvenientes como por ejemplo: escaso poder discriminante, ser muy laboriosos y tener un alto coste (Kandler y Weiss, 1986, Schleifer *et al.*, 1995). La clasificación fenotípica no es considerada como concluyente, debido a que realiza una identificación probable pero no definitiva. No obstante, los métodos fenotípicos combinados han sido usados y siguen siéndolo actualmente, para detectar diferencias entre cepas de un mismo taxón, por ejemplo biovar o biotipo (Schleifer *et al.*, 1995) y permiten reconocer cepas o aislados atípicos (Samelis, 2011).

Actualmente los métodos fenotípicos son utilizados en diversos estudios de investigación con dos propósitos; por un lado, para realizar una identificación preliminar de las BAL y por el otro lado, para conocer la capacidad y/o potencial metabólico de los diferentes aislamientos (Ostlie *et al.*, 2005, Nikolic *et al.*, 2007, Sing y Sing 2014). En este sentido los métodos fenotípicos permiten conocer características tecnológicas de las cepas de BAL aisladas de los quesos, tales como sus capacidades de acidificación, proteólisis, lipólisis o la resistencia a antibióticos, entre otros aspectos (Kongo, 2013). Entre los sistemas de identificación fenotípica para la clasificación de BAL más utilizados encontramos los sistemas API (bioMérieux) y Biolog (Biolog).

La segunda metodología acerca a la taxonomía bacteriana o filogenia desde un enfoque molecular, como el porcentaje de moles de G y C en el DNA, propiedades electroforéticas de los genes, secuenciación del RNA ribosómico y secuenciación de genes diana, para realizar la asignación a especie (Bou *et al.*, 2011). Los métodos genotípicos tienen un gran poder discriminante, permitiendo la diferenciación entre cepas y una identificación precisa de las mismas (Cocolin *et al.*, 2004). En las últimas tres décadas se han desarrollado diversas técnicas moleculares para la identificación y caracterización de BAL (Schleifer *et al.*, 1995, Busse *et al.*, 1996, Giraffa y Neviani, 2001, Ostlie, 2005, Sing y Sing, 2014). Estas técnicas están basadas en el estudio de la secuenciación completa o parcial de los genes 16S o 23S RNAr, la secuenciación de genes que codifican proteínas o el estudio del genoma entero como en el caso de las hibridaciones DNA/DNA (Schleifer *et al.*, 1995, Rodicio y Mendoza, 2004, Giraffa y Neviani 2001). Los métodos genéticos tiene grandes ventajas para la identificación: especificidad (capaces de detectar el microorganismo de interés), sensibilidad (son capaces de detectar la presencia de un solo microorganismo), poder discriminante (pueden determinar la composición de comunidades microbianas en diferentes entornos) y rapidez, los resultados se pueden obtener en menos de 24 h (Rodicio y Mendoza, 2004). Sin embargo, también tienen sus limitaciones como pueden ser por ejemplo, la posible mutación de genes utilizados en la identificación microbiana (Das *et al.*, 2014). También esos autores mencionan que los métodos genotípicos, tienen una alta sensibilidad pero muchos de ellos no son capaces de distinguir entre las células vivas o muertas por que simplemente determinan los ácidos nucleicos.

Muchas técnicas genotípicas desarrolladas están basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifica determinados fragmentos de DNA o RNA mediante el uso de cebadores o *primers*. Unos de los cebadores más utilizados para la identificación a nivel de especie son los cebadores específicos del gen 16S RNAr para la especie a estudiar (Woese, 1987; Rodicio y Mendoza, 2004; Temmerman *et al.*, 2004, Bou *et al.*, 2010). Esta secuenciación es seguida de su comparación mediante algoritmos de búsqueda en programas como el BLAST, comparado secuencias de los fragmentos problema de los genes estudiados con las secuencias

almacenadas en bases de datos, por ejemplo: Genbank (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) o *Ribosomal Database Project* (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>). Esta metodología (basada en la secuenciación de determinados genes y el uso de programas informáticos) además permiten inferir la filogenia de las bacterias estudiadas, realizando un alineamiento de las secuencias ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) y construyendo árboles filogenéticos con programas como el Phylogeny Inference Package (Feng y Doolittle, 1987; Stackebrandt y Teuber, 1988; Aquilanti *et al.*, 2007; Felsenstein, 2009;).

Otro grupo de técnicas moleculares utilizadas para la identificación de BAL están basadas en el uso de enzimas de restricción combinada con la PCR ambas (Dicks *et al.*, 1996, Giraffa y Neviane, 2001, Aquilanti *et al.*, 2007). Las enzimas de restricción, rompen el DNA en fragmentos específicos que son amplificados y separados por electroforesis. Los perfiles obtenidos dependen de la cepa que se esté analizando. Ejemplos de estos métodos son la electroforesis de campo pulsado, el polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) y RFLP combinado con la PCR. Otra técnica utilizada es la amplificación aleatoria por PCR, sin cebadores específicos, denominada amplificación polimórfica de DNA al azar (RAPD), esta técnica es muy usada y útil para identificación de BAL y consiste en amplificar fragmentos determinados al azar en todo el genoma de cada microorganismo, por lo que al igual que en la técnica anterior hay perfiles distintos para cada especie o biotipo. El ribotipado es otra una técnica que ha sido utilizada para identificar y clasificar las BAL en función de los genes del RNA ribosómico (Lyhs *et al.*, 2002, Caro *et al.*, 2013). Esta técnica combina el uso de enzimas de restricción con la detección de los fragmentos resultantes mediante sondas DNAr. El poder de discriminación de esta técnica depende en gran medida del tipo de enzimas de restricción y de las sondas de DNAr utilizadas. Finalmente, otras técnicas utilizadas para la identificación de BAL son las basadas en la hibridación DNA-DNA o en la caracterización de DNA plasmídico (Dicks *et al.*, 1996).

Recientemente, se están desarrollando metodologías en diversos campos de la bioquímica molecular que buscan una mejor caracterización y uso específico de las BAL, por ejemplo la utilización de las BAL enfocado a

desarrollar productos lácteos con propiedades sensoriales y funcionales determinadas. En este sentido, la metabolómica y proteómica, son metodologías que nos permiten encontrar el lazo de unión entre los métodos fenotípicos y genotípicos (Amiel *et al.*, 2001) y desde el punto de vista tecnológico, permite relacionar las cepas de BAL con los requerimientos del tipo de elaboración en las que serán usadas (Van de Guchte, 2012). La proteómica estudia y caracteriza a los microorganismos de acuerdo al conjunto de proteínas expresadas por un genoma (Bou *et al.*, 2011). La metabolómica que determina y analiza cuantitativamente los metabolitos producidos por los microorganismos, que son modificados en función de las condiciones del crecimiento microbiano y que no se encuentran genéticamente regulados. Generalmente son moléculas de bajo peso molecular (<1500 Da) como péptidos, amino ácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, polifenoles, alcaloides o minerales (Wishart, 2008, Mozzi *et al.*, 2013). Desde nuestro punto de vista y de acuerdo con Busse *et al.* (1996) y Stiles *et al.* (1997) los estudios taxonómicos de BAL deberían ser polifacéticos.

1.1.6.3. Uso y características tecnológicas de las bacterias ácido lácticas en la elaboración del queso

Las BAL se encuentran en altas concentraciones en todo el proceso de elaboración del queso, desde el inicio de la fabricación hasta la maduración (en su caso), en la que, debido a las enzimas que aportan, juegan un importante papel para la acidificación, formación de aroma y sabor y la textura (Cogan *et al.*, 2000). Debido a su relevante papel en el queso, el conocimiento de su taxonomía, uso, y manejo, tienen una gran importancia en la industria láctea. Por otra parte, desde el punto de vista económico, las BAL generan un gran movimiento comercial en la industria láctea (De Vos, 2011).

Los quesos se pueden elaborar por fermentación espontánea de la leche, sin adición de cultivos iniciadores. Las BAL más frecuentes en este tipo de quesos pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Cogan *et al.*, 1997).

Adicionalmente, los quesos se pueden elaborar con cultivos iniciadores o estárter. De acuerdo con Beresford *et al.* (2001), los cultivos iniciadores se

definen como aislamientos o cepas de BAL, generalmente lactococos, que producen suficiente ácido como para reducir el pH de la leche a menos de 5.2 en 6 horas, a una temperatura de 30-37°C. Normalmente los cultivos iniciadores son mixtos, es decir, compuestos de varias cepas de distintos géneros y/o especies. Los cultivos iniciadores se clasifican en mesófilos, que intervienen en procesos de fermentación que tiene lugar en un amplio rango de temperaturas (10°C-40°C) o termófilos, que actúan a temperaturas entre 30°C y 50°C (Cogan, 1996).

Los cultivos iniciadores son agregados al inicio de la elaboración de los quesos y pueden alcanzar rápidamente altos recuentos microbianos entre 10^9 a 10^{10} ufc/g de queso (Montel *et al.*, 2014). La actividad principal de los cultivos iniciadores de BAL durante la elaboración del queso es la producción de ácido láctico, aunque también participan en el proceso de maduración, debido a sus enzimas que son las responsables de llevar a cabo la proteólisis y la conversión de los aminoácidos en compuestos aromáticos (Fox y Wallace, 1997).

Además, los cultivos iniciadores pueden llevar como adjuntos otras cepas de BAL, incluidas en ellos con fines distintos al de acidificación como por ejemplo para contribuir al desarrollo del aroma o de la textura en el queso. En este sentido, un gran número de las cepas de BAL de los géneros que se han aislado con mayor frecuencia de los quesos elaborados sin el uso de cultivos iniciadores, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* han sido propuestas, o se utilizan, como adjuntos de los cultivos iniciadores. No obstante, la *European Food Safety Authority* (EFSA, 2013) no considera seguro el uso de *Enterococcus* spp. debido a la presencia en algunas cepas de este género (de las especies *E. faecalis* o *E. faecium*) de factores de virulencia y también a la frecuencia con que presentan resistencia a diferentes antibióticos. Aunque no son todas las cepas las que entrañan peligro, su presencia en los quesos elaborados con leche cruda es abundante y su papel tecnológico en los quesos importante (Jett *et al.*, 1994; Giraffa, 2003).

La microflora láctica presente en los quesos elaborados con cultivos se puede dividir en dos grupos: las cepas que forman parte de los propios cultivos iniciadores y aquellas BAL que no forman parte estos y que son denominadas “BAL no pertenecientes a los cultivos” (NSLAB). Las NSLAB no crecen durante

el proceso de acidificación de la leche y, por lo tanto, no contribuyen de forma importante a la producción de ácido. Sin embargo se desarrollan en el interior de los quesos (Beresford *et al.*, 2001; Montel *et al.*, 2014), alcanzando niveles de 10^8 UFD/g de queso durante su maduración o almacenamiento, por lo que algunos autores indican que esta microflora juega un papel muy importante durante la maduración del queso, siendo son los principales responsables de la formación de compuestos aromáticos en esta etapa (Ross *et al.*, 2000; Beresford *et al.*, 2001). En la maduración las NSLAB constituyen la microflora más abundante debido a que son capaces de crecer a pH bajo, en presencia de altas cantidades de NaCl, en anaerobiosis y sin la presencia de carbohidratos fermentables (Montel *et al.*, 2014). Debido a su importancia hay bastante investigación sobre la caracterización de las NSLAB, siendo uno de los fines de esta investigación el aislamiento, el estudio y la selección de cepas que puedan para ser utilizadas como adjuntos en los cultivos iniciadores.

Respecto a las características tecnológicas más importantes de las BAL podríamos incluir las siguientes: i) capacidad de producción de ácido láctico, ii) producción de CO_2 , iii) actividad proteolítica, iv) actividad lipolítica, v) producción de compuestos antimicrobianos, y vi) producción de expolisacaridos, entre otros (El Soda *et al.*, 1986; Shirai *et al.*, 1996; Laws *et al.*, 2001; Chamba *et al.*, 2004; Gobbetti *et al.*, 2002; Ammor *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007).

La producción de ácido láctico es posiblemente una de las propiedades más importantes de las BAL en el conjunto del proceso de elaboración del queso. La acidificación de la leche mejora la actividad del cuajo y la acidificación de la cuajada favorece su sinéresis y la solubilización del calcio micelar y, además, previene el crecimiento de bacterias patógenas y/o alterantes (Fox, 2000). Así mismo, la acidificación colabora en los procesos enzimáticos que tienen lugar durante la fase de maduración, interviniendo en las características finales del queso, sabor, aroma, color, textura. De acuerdo con Fernández (2012), un aspecto a considerar en las BAL relativo a la acidificación, es su capacidad de desarrollarse a pH bajo, debido a que el pH es uno de los elementos determinantes de la competencia entre grupos microbianos, que limita su crecimiento. Por ejemplo, las cepas de *Lactobacillus*

spp. pueden desarrollarse en medios con valores de pH entre 3,2 a 3,5. Estos valores son más bajos que los valores de pH a los que pueden crecer las cepas de *Lactococcus spp.* (pH de 4,0 a 4,5) o las de *Leuconostoc spp.* (pH de 5,0)

Además de ácido láctico, las BAL producen otros metabolitos de interés en la fabricación del queso. La producción de CO₂ es significativa en las BAL heterofermentativas como producto de la fermentación de los azúcares. No obstante, también existe producción de CO₂ en especies homofermentativas, como consecuencia del metabolismo del citrato, aunque en menor medida. Los géneros más asociados a la producción de CO₂ son: *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y algunas especies de *Lactococcus*. Esta actividad es deseable en quesos de pasta “semiabierta” como el Havarti, el Morral mexicano y los quesos azules donde es necesaria la presencia de cavidades aireadas para permitir el desarrollo de los mohos (Chamba *et al.*, 2004).

La actividad proteolítica de las BAL se ha asociado a proteasas que se encuentran en la pared celular y que degradan inicialmente las caseínas presentes de la leche en oligopéptidos, que posteriormente son transportados al interior de las células a través de un sistema de transporte específico de péptidos (Savijoki *et al.*, 2006). Posteriormente, esos péptidos son degradados por la acción de diversas peptidasas a péptidos cortos y/o aminoácidos, para su utilización metabólica. La proteólisis en los quesos es un proceso dinámico en los que influyen diversos aspectos, entre ellos su composición química, la microflora y la tecnología aplicada durante la elaboración y maduración (Donkor *et al.*, 2007; Steele *et al.*, 2013; Montel *et al.*, 2014).

Por otra parte, BAL cuentan con diversas enzimas, principalmente las intracelulares, responsables de los perfiles aromáticos de los quesos, específicamente de relevantes compuestos volátiles, desde el punto de vista del aroma, que se forman a partir de los aminoácidos (Steele *et al.*, 2013). Estos autores indican que en las BAL existen dos grandes rutas metabólicas por las que los aminoácidos se convierten en compuestos aromáticos: las reacciones de eliminación del grupo amino catalizadas por las aminoliasas y la vía metabólica que inician las aminotransferasas. La primera vía es de gran interés en el sabor del queso por la formación de metanotiol a partir de metionina. La segunda vía es responsable de la formación de α -cetoácidos, a

partir de metionina y de compuestos aldehídos ramificados, alcoholes y ácido carboxílicos.

Respecto a la actividad lipolítica, las BAL tienen actividad lipolítica baja-moderada (Gobbetti *et al.*, 1996; Fenster *et al.*, 2000). La lipólisis de los quesos atribuible a la microflora ácido-láctica es limitada, debiéndose principalmente a la acción de sus lipasas sobre mono y diglicéridos, que previamente habrían sido hidrolizados por las lipasas nativas de la leche (Stadhouders y Veringa, 1973; Tornadijo *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha observado que algunas cepas de BAL, como por ejemplo algunas cepas de *Lactobacillus casei* (Yu, 1986), liberan una cantidad importante de ácidos grasos de cadena larga C16 y C18:1. Comparando entre lactococos y lactobacilos, los lactococos suelen presentar más actividad lipolítica (Piatkiewicz, 1987). En general, las lipasas de las BAL como lactococos y lactobacilos forman principalmente ácidos grasos libres de cadena corta (EL-Soda *et al.*, 1986; Kamaly y Marth, 1989). La contribución de la lipólisis de las BAL al aroma del queso no parece demasiado importante (Law 1984; Olson, 1990).

Las BAL pueden presentar actividad antimicrobiana general debida a la producción de diversas sustancias como ácido láctico y ácido acético, peróxido de hidrogeno, diacetilo, productos secundarios generados por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocianato (Shirai *et al.*, 1996). Además, las BAL pueden producir de forma específica bacteriocinas, que son componentes proteicos o péptidos con efecto bactericida o bacteriostático. Las bacteriocinas tienen un estrecho espectro y han sido intensamente estudiadas por su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* spp. entre otras (Stiles, 1996; Holo *et al.*, 2001; Vázquez *et al.*, 2009).

Algunas BAL tienen la capacidad de sintetizar polisacáridos extracelulares. Los exopolisacáridos son polisacáridos de cadena larga formados por unidades de azúcares, principalmente, glucosa, galactosa y ramnosa, en diferentes proporciones (Laws *et al.*, 2001). Estos compuestos son polímeros de cadena larga y contribuyen a mejorar la textura y viscosidad del producto fermentado (De Vuyst y Degeest, 1999; Ruas-Madiedo, 2002). La producción de exopolisacáridos está muy ligada a la especie, a las condiciones

externas de crecimiento y a la composición del medio (Lin y Chang, 2007). También algunas cepas de BAL tienen capacidad para la formación de manitol y por tanto producir sabor dulce (Ferain *et al.*, 1995; Neves *et al.*, 2000; Gaspar *et al.*, 2004). Además, pueden ser usadas para mejorar la calidad nutricional de los alimentos, debido a la producción de vitaminas; ácido fólico, riboflavina (LeBlanc *et al.*, 2010). Así mismo, pueden ser usadas con el fin de obtener una propiedad sensorial característica de un queso, por ejemplo, la textura cremosa de los quesos de pasta acidificada.

Finalmente, cabe comentar que el uso de BAL en los cultivos iniciadores tiene una problemática de índole sanitario consistente en su eventual resistencia adquirida a ciertos antibióticos. La resistencia adquirida es codificada por genes de resistencia que pueden ser transmitidos de unas bacterias a otras (por ejemplo desde BAL a bacterias patógenas del tracto intestinal de los consumidores. Las bacterias patógenas con resistencia a antibióticos representan un importante problema para el control de las enfermedades infecciosas en los hospitales y en las comunidades (Tenover, 2006). En este contexto debe estudiarse en las BAL que vayan a ser utilizadas en los cultivos iniciadores, su resistencia frente a los antibióticos, entendiéndose que no se deberían usar BAL que presenten resistencia adquirida. Para identificar la resistencia adquirida a los antibióticos de las BAL se utilizan técnicas fenotípicas y genotípicas. El método fenotípico más utilizado es el estudio de la concentración mínima inhibitoria frente a los antibióticos. La resistencia adquirida se identifica cuando la concentración mínima inhibitoria es superior a un valor de corte, que es un valor por encima del rango normal de concentración inhibitoria mínima que presenta una determinada especie bacteriana frente a un determinado antibiótico (Flórez *et al.*, 2005). Entre los sistemas genotípicos caben resaltar las técnicas basadas en la identificación de genes por PCR o en el estudio de los *microarrays* – pequeñas fracciones de ADN (Ammor *et al.*, 2007; Klare *et al.*, 2007; Devirgiliis *et al.*, 2008; Ouoba *et al.*, 2008; Korhonen *et al.*, 2010).

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

OBJETIVO 1

Teniendo en cuenta la falta de estudios sobre los cambios que experimenta la calidad sensorial del queso Oaxaca durante su almacenamiento y el interés que el tema suscita entre los elaboradores, distribuidores, comerciantes y consumidores, el primer objetivo del presente estudio ha sido evaluar el efecto del almacenamiento en las condiciones usualmente empleadas en el mercado regional (envasados al vacío y a temperaturas de refrigeración entre 8-10°C), sobre diversas características microbiológicas, químicas y sobre las principales propiedades funcionales y sensoriales del queso tradicional Oaxaca elaborado con leche cruda.

La hipótesis del trabajo es que el almacenamiento disminuye la calidad del queso y es adecuado saber cuáles son los factores limitantes de su vida útil y los mecanismos que subyacen en su pérdida de calidad, para de esta forma poder diseñar procedimientos encaminados a aumentar la estabilidad del queso durante su almacenamiento y retardar el deterioro de su calidad.

OBJETIVO 2

Las bacterias ácido-lácticas involucradas en la producción del queso juegan un papel relevante en las características sensoriales del mismo, así como en la inhibición de los posibles microorganismos patógenos y alterantes presentes. Por este motivo, se considera esencial su identificación y caracterización tecnológica en los quesos artesanales con el fin de poder desarrollar en una etapa posterior cultivos microbianos iniciadores propios de cada variedad concreta de queso que permita la potenciación de sus características diferenciales. Hasta el momento no existen datos en la bibliografía sobre la microflora ácido-láctica del queso tradicional Oaxaca.

Por lo tanto, el segundo objetivo este trabajo ha sido conocer y caracterizar taxonómicamente, bioquímicamente y tecnológicamente las bacterias ácido-lácticas aisladas del queso tradicional Oaxaca elaborado con

leche cruda en diferentes etapas de su elaboración, así como evaluar la aptitud de dichas bacterias para su uso potencial como cultivos iniciadores, prestando especial atención a aspectos relacionados con su inocuidad.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3. EVOLUCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS, QUÍMICAS, FUNCIONALES Y ORGANOLÉPTICAS DEL QUESO OAXACA ELABORADO CON LECHE CRUDA DURANTE SU ALMACENAMIENTO REFRIGERADO (8 °C)

3.1. Introducción

A medida que transcurre el tiempo de almacenamiento o maduración se producen cambios significativos en las características sensoriales de los quesos. En el caso de los quesos no madurados los cambios que ocurren con el tiempo pueden significar una pérdida en su calidad sensorial. Los cambios en las características de calidad de muchas variedades de los quesos de “pasta filata” no madurados o de corta maduración durante su almacenamiento a refrigeración han sido objeto de diversos estudios.

La microflora de los quesos experimenta cambios dramáticos y continuos durante su elaboración y maduración que dependen en gran medida de las condiciones en que estas se producen (Montel *et al.*, 2014). En los quesos de “pasta filata” también evoluciona con el tiempo de almacenamiento (Villani *et al.*, 1991). Los recuentos de microflora aerobia mesófila viable en el día de elaboración de los quesos de “pasta filata” suelen ser bajos (10^6 ufc/g) en comparación con los hayados en otros quesos, debido al efecto termodestructor sobre los microorganismos del proceso de malaxado (Kindstedt, 1993b), que implica un calentamiento de la cuajada durante varios minutos a temperaturas normalmente comprendidas entre 60 y 70°C. No obstante, una cantidad considerable de microorganismos mesófilos (termodúricos) y termófilos presentes en la cuajada antes del malaxado sobreviven y soportan el tratamiento térmico que lleva implícito este proceso. Posteriormente, se ha descrito por varios autores un incremento de las bacterias ácido-lácticas (BAL) asociado a un

aumento en el número de lactobacilos (Papademas y Robinson, 2000; Gobbetti *et al.*, 2002; Piraino *et al.*, 2005).

El color es otra propiedad de los quesos de “pasta filata” sujeto a cambios durante el almacenamiento. Una de las causas más referidas en la bibliografía del cambio de color es la oxidación de la grasa que trae consigo la pérdida de color amarillo, además de una modificación negativa en el sabor (Juric *et al.*, 2003; Mortensen *et al.*, 2004). Esta oxidación viene dada por la exposición del queso a la luz (generalmente se produce una fotooxidación catalizada por la riboflavina) y está favorecida por el contacto con el oxígeno (Belestrieri *et al.*, 2002; Dalsgaard *et al.*, 2010). Por otra parte, el periodo de almacenamiento influye sobre el pardeamiento que tiene lugar en el queso durante su horneado, en su preparación culinaria (pizzas, gratinados, etc.) (Kinstedt, 1993). Con el tiempo de almacenamiento normalmente disminuye la coloración marrón del queso horneado, pues en su transcurso disminuye la cantidad de azúcares simples. Sin embargo, también la coloración puede verse aumentada cuando durante la maduración aumentan los otros sustratos de la reacción de Maillard (moléculas con grupos amino libres). Todo depende de qué factor sea el predominante.

La textura del queso se ve modificada durante el almacenamiento de los quesos no madurados o de corta maduración debido a fenómenos proteolíticos. La proteólisis catalizada por enzimas del cuajo, de la leche (plasmina, proteínas de las células somáticas, catepsina-D) y de los microorganismos presentes en el queso (Sousa *et al.*, 2001) se asocia a un ablandamiento de los quesos debido la ruptura molecular de la red proteica formada por las caseínas (Fox y McSweeney, 1996). Durante el almacenamiento del queso Mozzarella, aún a temperaturas de refrigeración, se ha observado una disminución de la dureza, elasticidad, gomosidad y masticabilidad, atribuida principalmente a la proteólisis (Tunick *et al.*, 1991; Kindsedt, 1993b; Imm *et al.*, 2003; Zisu y Shah, 2005). Una mayor temperatura de almacenamiento y una mayor humedad del queso favorece la velocidad de la proteólisis, que se desarrollará más cuanto más tiempo se mantenga almacenado. También se ha observado

que, dentro de los rangos típicos de pH del queso, a menor pH en el queso más intensa será la proteólisis (Pastorino *et al.*, 2003).

Las propiedades funcionales del fundido de los quesos también se ven afectadas cuando la estructura de la cuajada sufre alteraciones debido a los fenómenos proteolíticos ya comentados. Igualmente, se han descrito cambios en pH (disminución) y la estructura de las fibras de paracaseína durante el almacenamiento de los quesos de pasta filata. Todos estos cambios han sido atribuidos a cambios químicos como la proteólisis, fermentación de los carbohidratos residuales, solubilización del Ca e hidratación de la matriz proteica. La magnitud de los cambios en los quesos de “pasta filata” durante su almacenamiento viene dada por las distintas características del proceso de elaboración, entre las que cabe destacar la composición de la leche o las condiciones de malaxado (Yun *et al.*, 1993b; Rudan *et al.*, 1999; Kindsedt *et al.*, 2010).

En el queso Mozzarella de baja humedad se ha encontrado que el tiempo de almacenamiento ejerce un efecto relevante sobre la textura y las propiedades del fundido (Kindstedt, 1993a; Costabel *et al.*, 2007; Kindstedt *et al.*, 2010). Estos estudios han mostrado que la calidad del queso mejora durante las primeras semanas de almacenamiento y después disminuye, debido a que los quesos se ablandan y fluyen al fundir en exceso, más de lo deseable, y aumenta la separación de grasa durante el fundido (Lucey y Fox, 1993; Kindsedt, 1993b). Tanto tiempos de almacenamiento insuficientes como excesivos pueden perjudicar a la propiedad de estirado.

El sabor de los quesos de “pasta filata” también puede experimentar cambios durante el almacenamiento. La proteólisis puede dar lugar a la aparición de sabores amargos debido a la formación de péptidos con sabor amargo (Smit *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2001). La oxidación de la grasa puede dar lugar a sabores rancios (Juric *et al.*, 2003). Otro de los cambios bioquímicos que ocurren en el queso y que determinan su sabor es la lipólisis. Los ácidos grasos que se liberan afectan, junto con los productos derivados de la proteólisis, al sabor del queso de forma directa e indirecta, ya que son los principales precursores de los compuestos aromáticos presentes en el mismo (McSweeney y

Sousa, 2000). Los ácidos grasos libres y sus productos derivados generan aromas peculiares y sabor picante. La extensión de la lipólisis varía enormemente entre tipos de quesos, dependiendo del tiempo y condiciones de maduración/almacenamiento y de la concentración de lipasas, del pH y de la humedad de la pasta. Las lipasas o enzimas lipolíticas pueden proceder de la leche, del cuajo y de la microflora que se desarrolla en el queso. La contribución de las lipasas de la leche se ve muy disminuida cuando ésta se pasteurizada (Collins *et al.*, 2003).

El queso Oaxaca es un queso de “pasta filata” fresco o de corta maduración muy popular en México. Es ampliamente utilizado como ingrediente en distintas preparaciones culinarias donde usualmente se funde (Domínguez-López *et al.*, 2010). Este queso semiblando se caracteriza por su textura fibrosa, que a la vista se asemeja con la de la pechuga de pollo, y un sabor suave característico (Villanueva-Carvajal *et al.*, 2012). El queso Oaxaca tradicionalmente ha sido elaborado con leche cruda. Actualmente sigue siendo elaborado con leche cruda en algunas plantas de lácteos de pequeña escala, aunque se produce a mediana y gran escala por lo general se elabora con leche pasteurizada (Dominguez-López *et al.*, 2011). A pesar de que los efectos de almacenamiento sobre la calidad de una gran variedad de quesos de “pasta filata” han sido ya objeto de estudio, no se han estudiado los cambios que se producen en calidad del queso Oaxaca durante su almacenamiento.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Toma de muestras y diseño del experimento

Se tomaron muestras de 6 lotes de quesos Oaxaca elaborados con leche cruda procedentes de 3 industrias artesanales del Valle de Tulancingo de Bravo en el estado de Hidalgo (2 lotes por industria, de distinto día de elaboración). Los quesos se habían elaborado el día

anterior a la toma de muestras. La muestra tomada consistió en 4 quesos de aproximadamente 1 kg de peso cada uno, elegidos al azar entre los producidos en cada lote. Todos los quesos fueron envasados al vacío antes de la toma de muestras con el equipo y película plástica utilizada por cada fabricante.

Los quesos se llevaron al laboratorio y se conservaron en su envase original a 8°C en una cámara de refrigeración en oscuridad, en un intento de imitar las condiciones de almacenamiento de los vendedores del mercado local en la zona Centro de México. Los quesos fueron analizados en los días 1, 8, 16 y 24 de almacenamiento. Cada uno de los días seleccionados para el muestreo se tomó un queso de cada lote. Los análisis se realizaron en el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, dependiente del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en México, o en los laboratorios del área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León en España.

Sobre los quesos, en cada día de muestreo, se llevaron a cabo análisis microbiológicos de los grupos microbianos relevantes, análisis químicos (pH, azúcares, ácidos orgánicos de cadena corta e índices de lipólisis y proteólisis), análisis de las propiedades funcionales (color, textura y extensión durante el fundido) y análisis sensoriales descriptivos (olor, sabor y textura). Además, en los quesos del día 1 de almacenamiento se determinaron los componentes químicos mayoritarios.

3.2.2. Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos se realizaron en el momento de la toma de muestras y la preparación de muestras y diluciones se llevaron a cabo tal y como se indica a continuación. Se disolvió 1 g de peptona y 8,5 g de cloruro de sodio por l de agua destilada, distribuyendo cantidades de 90 ml y 9 ml en frascos y tubos, respectivamente. Se procedió a la esterilización de las disoluciones preparadas, a 121°C durante 15 min. Posteriormente, se tomaron asépticamente 10 g de queso Oaxaca, se

colocaron en una bolsa de Stomacher estéril junto con 90 ml de agua peptonada diluyente estéril y la mezcla se homogeneizó en un Stomacher (Seward Stomacher 80, Londres) durante 2 min. A partir de esta solución se realizaron las diluciones decimales necesarias para el recuento (NOM 243-SSA1-2010) que se usaron para sembrar en placas con el medio adecuado según el grupo microbiano a cuantificar.

3.2.2.1. Recuento de flora aerobia mesófila viable (FAMV)

El recuento de FAMV se llevó a cabo por duplicado a partir de 1 ml de cada tubo de la serie de diluciones decimales que se indicaron anteriormente en placas de Petri, a las cuales se les agregó aproximadamente 15 ml de medio Plate Count Agar (PCA; Oxoid Ltd., UK) atemperado a unos 40°C. Se mezcló el contenido de la placa y se dejó solidificar. Posteriormente, las placas con el medio inoculado se incubaron a 30°C durante 48 h.

3.2.2.2. Recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL)

La cuantificación de *Lactobacillus* spp. se llevó a cabo tomando por duplicado 1 ml de cada serie de diluciones decimales y depositándolos en cajas de Petri sobre las cuáles a su vez se vertió medio atemperado de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Oxoid) acidificado a un pH de 5,4. Una vez solidificado, al medio atemperado se le añadió una sobrecapa de 4 ml del mismo medio para conseguir anaerobiosis. Las placas se incubaron a 30°C para cuantificar lactobacilos mesófilos y a 45°C para los termófilos, durante 48 h. Para los recuentos de *Lactococcus* se sembró 1 ml de cada dilución, por duplicado, en placas de Agar M17 (Oxoid) atemperado a 45°C. A continuación se mezcló el medio con el inóculo y se añadió una capa superficial de 4 ml del mismo medio. Posteriormente las placas se incubaron a 30°C para el crecimiento de lactococos mesófilos y a 45°C para los termófilos, durante 72 y 48 h, respectivamente. Finalmente, el recuento de enterococos se realizó sembrando por duplicado las diluciones en Agar *Streptococcus* KF (Oxoid) mediante la técnica de

siembra en profundidad e incubando a 35°C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis. El uso de los anteriormente mencionados medios de cultivo y temperaturas y tiempos de incubación, así como la interpretación de los resultados para los correspondientes grupos de BAL se hizo de acuerdo a las indicaciones de Fox *et al.* (2000).

3.2.2.3. Recuento de bacterias coliformes y *Escherichia coli*

Estos recuentos se realizaron en placas deshidratadas listas para usar comercializadas por Petrifilm™ (Laboratorios 3M Sante Cergy Pontoise Cedex, Francia), específicas para la determinación de Coliformes/*E. coli*. Las placas se incubaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se consideran como coliformes aquellas colonias que mostraron color rojo o color azul-violeta y que además estuvieran acompañadas de la presencia de burbujas de gas. Se consideraron colonias de *E. coli* las de color azul-violeta.

3.2.2.4. Recuento de cocos Gram-positivos/catalasa-positivos

Los recuentos de cocos Gram-positivos/catalasa-positivos se realizaron en medio sólido Mannitol Salt Agar (MSA, Oxoid) incubando las placas previamente sembradas en superficie con 0,1 ml de dilución de muestra durante 48 horas a 30°C en aerobiosis.

3.2.2.5. Recuento de mohos y levaduras

Los recuentos de mohos y levaduras se realizaron en placas con el medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA; Oxoid) acidificado a pH 3,5 con una solución de ácido láctico al 10% (p/v). Se sembró en superficie. Las placas con la muestra se incubaron a 25°C durante 4 días.

3.2.3. Determinación de los componentes mayoritarios de los quesos

Para realizar los análisis de componentes mayoritarios se tomó una muestra representativa de aproximadamente 150 g de cada queso que se homogenizó con una picadora doméstica. El homogeneizado se mantuvo a temperatura de congelación hasta el momento de su análisis.

3.2.3.1. Humedad

La determinación del contenido en humedad se realizó por desecación en estufa de aire caliente forzado hasta peso constante, siguiendo el procedimiento descrito por Serres *et al.* (1973).

Reactivos

Alcohol etílico al 96% (v/v).

Arena de mar lavada de grano fino.

Procedimiento

Se tomaron unas cápsulas de acero inoxidable y se secaron durante 1 hora a 100°C. Luego se pesaron aproximadamente 15 g de arena de mar de grano fino en cada cápsula, colocando a continuación, en su interior, una varilla de vidrio. El conjunto (cápsula, arena y varilla) se introdujo en una estufa, donde se calentó durante 30 min a 102±2°C, trasladándose seguidamente a un desecador donde se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, pesándose a continuación con una precisión de ±0,01 g.

Posteriormente, se colocaron en la cápsula aproximadamente 5 g de muestra y se pesó el conjunto (cápsula, arena, varilla y muestra). Se añadieron 5 ml de alcohol etílico 96% y se mezcló el contenido con la arena con la ayuda de la varilla de vidrio. Las cápsulas se colocaron en baño de arena caliente hasta la evaporación del alcohol, agitando periódicamente el contenido para evitar la formación de costras y las proyecciones de materia debidos al calentamiento a alta temperatura. Finalmente, se sometió el conjunto a calentamiento a 102±2°C durante 4 h. Transcurrido este tiempo, se procedió a su enfriamiento en el desecador y su pesado. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

La humedad se expresó como porcentaje en peso y se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_1 - P_2}{P_1 - P_0} \times 100$$

P_0 = Peso, en gramos, de la cápsula, varilla y arena.

P_1 = Peso, en gramos, de la cápsula, varilla, arena y muestra, antes de desecar.

P_2 = Peso, en gramos, de la cápsula, varilla, arena y muestra, después de desecar.

3.2.3.2. Grasa

Para determinar el contenido de materia grasa de los quesos se empleo la técnica butirométrica Van Gulik, que consiste en una digestión de los componentes proteicos con ácido sulfúrico y separación de la grasa por centrifugación (Serres *et al.*, 1973).

Reactivos

Ácido sulfúrico ($\rho = 1525$ g/l)

Alcohol isoamilico

Procedimiento

Se colocaron 3 g de queso y se adicionó ácido sulfúrico ($\rho = 1525$ g/l) hasta cubrir la muestra en el butirómetro Van Gulik, diseñado para tal fin. Los butirómetros se colocaron en un baño de agua a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta la digestión total de la muestra. Posteriormente se adicionó 1 ml de alcohol isoamílico y ácido sulfúrico hasta el 35% de la escala del butirómetro. Los butirómetros se taparon y se centrifugaron a 1250 rpm (Centrifuga Gerber modelo M80A) durante 5 min. Transcurrido este tiempo, los butirómetros se colocaron en un baño de agua a 65°C previamente a la lectura del % p/p de grasa en la muestra. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

3.2.3.3. Proteína

Para la determinación del contenido en proteína se siguió el método oficial de la AOAC (AOAC, 1999), que cuantifica el nitrógeno total por el método Kjeldahl. Para ello se utilizó un digestor modelo 1007 (Tecator, Suecia) y una unidad de destilación modelo Kjeltex System 1002 Distilling Unit (Tekator).

Reactivos

Ácido sulfúrico al 98% (v/v)

Solución acuosa de NaOH al 40% (p/v)

Disolución valorada de HCl 0,1 M

Pastillas catalizadoras "Special Kjeltabs S 3,5" (3,5 g de sulfato potásico y 0,0035 g de selenio por pastilla) (Panreac Química S.A., Barcelona)

Disolución acuosa de ácido bórico al 4% con verde de bromocresol y rojo de metilo como indicadores. Se preparó disolviendo 40 g de ácido bórico en aproximadamente 600 ml de agua destilada caliente. Una vez disuelto, se añadió más agua destilada hasta un volumen de 900 ml. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 10 ml de una disolución de verde de bromocresol (100 mg en 100 ml de alcohol etílico) y 7 ml de una disolución de rojo de metilo (100 mg en 100 ml de alcohol etílico). Se enrasó a un volumen final de 1 l con agua destilada y se mezcló hasta conseguir una disolución homogénea.

Procedimiento

Se pesó con exactitud de $\pm 0,01$ g una cantidad de 1 g de muestra en el tubo de digestión, añadiendo unas perlas de vidrio y una pastilla de catalizador. Seguidamente se añadieron 12 ml de ácido sulfúrico concentrado, se agitó suavemente por rotación y se introdujo en la unidad de digestión, a una temperatura de unos 420°C a la que se llegó progresivamente. Se mantuvo la digestión durante 3 horas, hasta la total clarificación de la muestra, transformándose el nitrógeno en amoníaco y quedando éste en forma de sulfato amónico. Una vez realizada la digestión, se liberó el amoníaco mediante la alcalinización del medio con 25 ml del reactivo de NaOH al 40% después de haber añadido 100 ml de agua Mili-Q.

El amoniaco se arrastró en una corriente de vapor durante aproximadamente 7 min en la unidad de destilación hasta alcanzarse un volumen de destilado de 150 ml, que se recogió sobre un matraz con 40 ml de la disolución de ácido bórico. El contenido se valoró con ácido clorhídrico 0,1 M hasta el viraje del indicador, midiendo el volumen gastado con una bureta graduada. Las determinaciones se hicieron por duplicado. Además de las muestras se realizaron dos blancos. El porcentaje de nitrógeno total se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno Total} = \frac{1.4 f \times (V_f - V_0)}{P} \times M$$

f = Factor del HCl

V_f = ml de HCl gastados en la valoración de la muestra

V_0 = ml de HCl gastados en la valoración del blanco

P = Peso en g de la muestra.

M = Molaridad del ácido clorhídrico.

El porcentaje de proteína se calculó a partir del porcentaje de nitrógeno del modo siguiente:

$$\% \text{ Proteína Bruta} = \% \text{ Nitrógeno Total} \times 6.25$$

3.2.3.4. Cenizas

Para la determinación de las cenizas se siguió el método descrito por Serres *et al.* (1973) consistente en la calcinación en mufla.

Reactivos

Agua Mili-Q.

Acetato de magnesio anhidro al 15% (p/v).

Procedimiento

Se introdujeron cápsulas de porcelana en una estufa a $102 \pm 2^\circ\text{C}$ durante al menos 30 min para su desecación. Se sacaron y se enfriaron en el desecador durante otros 30 min y se anotó su peso. En dichas cápsulas se pesaron 5 g de muestra a la que se añadió 1 ml de solución

de acetato de magnesio. Las cápsulas con muestra se introdujeron en la mufla a 100°C para ir subiendo la temperatura 50°C cada 30 min hasta llegar a 250°C. Posteriormente se subió a 550°C y se mantuvo a esa temperatura 1 h más. Se comprobó que las cenizas tenían un color blanco o ligeramente gris – en caso contrario se añadieron 2 ml de agua Mili-Q y se repitió el proceso de calcinación. Finalmente, se enfriaron las cápsulas con las cenizas y se mantuvieron en el desecador hasta pesarse. Paralelamente al análisis descrito se realizó un blanco por duplicado, incinerando una cápsula con 1 ml de acetato de magnesio, sin muestra, y se anotó el incremento de peso. Las cenizas se expresaron como porcentaje en peso según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(P_2 - P_0 - P_3)}{(P_1 - P_0)} \times 100$$

P_0 = Peso en g de la cápsula

P_1 = Peso en g de la cápsula conteniendo la muestra

P_2 = Peso en g de la cápsula y el residuo después de la incineración

P_3 = Peso en g del óxido de magnesio proveniente de la disolución de acetato de magnesio añadido (blanco)

3.2.4. Determinación de marcadores o índices de acidificación, lipólisis y proteólisis de los quesos

Además de los componentes mayoritarios, a partir de las muestras de queso homogeneizadas referidas en el apartado 3.2.3, se llevaron a cabo otros análisis químicos relacionados con la acidificación, lipólisis y proteólisis del queso durante su almacenamiento.

3.2.4.1. Azúcares

La extracción de los azúcares del queso se realizó siguiendo el método de Bruna *et al.* (2003). Se partió de 10 g de muestra, pesados con una precisión de $\pm 0,01$ mg. Se adicionó 50 ml de una solución de ácido sulfúrico 4,5 mM y se homogeneizó con un homogeneizador Ultra-turrax

(IKA, Alemania) a alta velocidad (posición 5) durante 1 min. El homogeneizado se mantuvo durante 1 h en cámara fría a 5°C. Después se filtró la mezcla a través de papel de filtro Whatman 54. A partir del filtrado obtenido se llevó a cabo la cuantificación de los azúcares por HPLC según el método descrito por Van Riel *et al.* (1986) con ligeras modificaciones. Previamente a la inyección, las muestras fueron filtradas a través de un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro. 15 µl de esta solución fueron inyectados en un cromatógrafo modelo Alliance–Waters 2690, equipado con un detector de refractometría Waters 410 y una columna de separación de intercambio iónico Aminex HPX-87H de dimensiones 300 mm x 7,8 mm, protegida con una precolumna Micro-Guard H+ (Bio-Rad Laboratories, EEUU) de 3 cm x 4,6 mm. Las condiciones del análisis cromatográfico fueron: fase móvil, ácido sulfúrico 5 mM; régimen isocrático; velocidad de flujo, 0,6 ml/min; temperatura de la columna, 60°C y duración de la carrera, 30 min.

Para la identificación de los azúcares se inyectaron patrones (glucosa, lactosa y galactosa; Fluka, EEUU) para la comparación de los tiempos de retención obtenidos para los patrones con los de las muestras. La cuantificación de los azúcares identificados se realizó mediante una curva de calibración, usando soluciones con cantidades crecientes de azúcares e interpolando el valor del área obtenida para cada azúcar identificado en la recta de regresión respectiva. El contenido final de azúcares se expresó en g/100 g de producto.

3.2.4.2 Ácidos orgánicos de cadena corta

La determinación del contenido en ácidos orgánicos de cadena corta se llevó a cabo mediante su extracción siguiendo el mismo método que el descrito para los azúcares (3.2.3.5.) y mediante un análisis cromatográfico similar al descrito para los azúcares y basado en el trabajo de Bruna *et al.* (2003). Las diferencias con respecto al método empleado por los mencionados autores consistieron en el volumen de inyección que fue de 30 µl, la fase móvil que fue ácido sulfúrico 3 mM. Se empleó un

detector de 'Diode Array' Waters 996 y se trabajó con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min los primeros 30 min, subiendo el flujo hasta 0,8 ml/min durante los diez min siguientes hasta completar los 40 min, posteriormente el flujo se redujo hasta 0,5 ml/min durante los últimos 5 min, con la columna a una temperatura de $65\pm 1^{\circ}\text{C}$. La detección se llevó a cabo a una longitud de onda 210 nm. Para la identificación de los ácidos orgánicos presentes en las muestras, se inyectaron previamente patrones de diferentes ácidos (ácido láctico y acético) y los tiempos de retención obtenidos para los patrones fueron comparados con los tiempos de retención de los picos obtenidos de las muestras. Así mismo, se comparó el espectro obtenido para cada pico patrón frente al respectivo espectro del pico problema para confirmar la pureza de los compuestos. Finalmente, para la cuantificación de los ácidos orgánicos se realizó una curva de calibración para cada ácido identificado con cantidades crecientes del mismo, ajustando los valores con una regresión lineal e interpolando el valor del área obtenida para cada ácido identificado. El contenido en los distintos ácidos orgánicos se expresaron en mg/100 g de producto.

3.2.4.3. Ácidos grasos libres

El contenido en ácidos grasos libres de las muestras se determinó previa extracción de la grasa y de ésta la de los ácidos grasos libres con posterior análisis cromatográfico siguiendo las indicaciones de Soriano *et al.* (2006).

Se pesaron 3,5 g de muestra y se homogeneizaron con 5 ml de metanol en un homogeneizador Ultra-turrax (modelo T-18; IKA) durante 5 min a 1200 rpm. Se añadieron 10 ml de cloroformo y la mezcla se homogeneizó durante 1,5 min más. Posteriormente el contenido se transfirió a un tubo de centrífuga de 50 ml y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min. La parte líquida así obtenida se filtró a través de papel de filtro Whatman número 1, lo que constituyó el primer filtrado. Al residuo sólido resultante se le añadieron 5 ml de metanol y 10 ml de cloroformo, y

la mezcla se homogeneizó mediante agitación con varilla de vidrio. Después se filtró la parte líquida resultante utilizando el mismo filtro y juntándolo con el sobrenadante de la primera filtración. El conjunto se colocó en un embudo de decantación y se lavó con 11 ml de una solución acuosa de cloruro potásico (0,88%, m/v) y 11 ml de metanol acuoso (1/1, v/v). Finalmente, se separó la fase orgánica y los solventes se evaporaron, bajo vacío, a 40°C.

Los ácidos grasos libres fueron separados del resto de los lípidos por extracción en fase sólida usando minicolumnas de aminopropilsilicato (500 mg, Sigma-Aldrich, Alemania). Una alícuota de 100 µl de grasa extraíble fue disuelta en 4 ml de hexano con 0,02% de BHT (m/v). Se añadieron 50 µl de una solución de ácido pentanoico en hexano a las muestras como estándar interno. La mezcla se vertió sobre las minicolumnas previamente acondicionadas con 5 ml de hexano y el primer eluyente se desechó. El retenido fue eluído con 5 ml de dietil-éter con 2% (v/v) de ácido acético glacial. La fracción que contenía los ácidos grasos libres que fue evaporada con una corriente de N₂.

Los ácidos grasos libres de las muestras y las soluciones de calibración fueron derivatizados con 1 ml de trifloruro de boro en metanol al 10% durante 20 min a 50°C. Los metil ésteres de los ácidos grasos fueron extraídos con 2 ml de hexano y colocados en un vial cromatográfico. La separación e identificación de los ácidos grasos libres se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard-6890 Series GC system) acoplado a un detector de masas (Hewlett Packard-5973 Inert MSD Mass Selective Detector), equipado con un inyector automático (HP 7683 series inyector) y con una columna capilar Supelco 2-4136 OmegawaxTM 250 Fused Silica, de longitud 30 m, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de relleno. Las condiciones de trabajo utilizadas fueron las siguientes: gas portador, helio; velocidad de flujo inicial, 1 ml/min; temperatura del inyector, 200°C; programación de temperatura del horno inicial, 50°C y final, 250°C, de acuerdo a las especificaciones de la Tabla 3.1; volumen de inyección, 1 µl; inyección en modo split (con división de flujo), con relación de split 60:1; temperatura de transferencia en el detector, 300°C.

La identificación de los ácidos grasos libres se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención con los de los patrones externos (Sigma-Aldrich) y posterior confirmación con los espectros de masas obtenidos de los picos con los espectros de los ácidos grasos de la base de datos HP Willey 275.L Mass Spectral Library (Hewlett Packard, revisión D 01.00, de Nov de 1998), proporcionada por el fabricante con el equipo. En el caso de los picos con tiempos de retención diferentes a los de los patrones, se llevó a cabo su identificación tentativa mediante la comparación de su espectro con los espectros que figuran en la base de datos (a través de los cuales se obtuvo la longitud de la cadena y el número de dobles enlaces) y teniendo en cuenta, además, el orden de elución consultado en la bibliografía disponible.

Tabla 3.1. Condiciones del horno durante el análisis cromatográfico de los ácidos grasos libres

Rampas	°C/min	T ^a (°C)	Tiempo (min) de mantenimiento	Tiempo (min) transcurrido
Inicial	---	50	1,00	1,00
Rampa 1	10,00	150	1,00	12,00
Rampa 2	12,00	180	0,00	14,50
Rampa 3	2,00	188	6,00	24,50
Rampa 4	2,00	220	2,00	42,50
Rampa 5	20,00	260	7,00	51,50

La cuantificación se realizó a partir de los factores respuesta obtenidos por regresión lineal de las áreas de los picos de los cromatogramas de los patrones, que fueron inyectados a tres concentraciones diferentes por duplicado, y del área de estándar interno de cada muestra. En aquellos casos en los que no se dispuso de patrones de metil-ésteres para la cuantificación, se tomó como factor respuesta el del isómero correspondiente.

3.2.4.4. Nitrógeno soluble en agua y nitrógeno no proteico

Para la extracción del nitrógeno soluble y del nitrógeno no proteico de los quesos se usó como modelo el protocolo de Díaz *et al.* (1992) al que se realizaron algunas modificaciones. Se partió de 10 g de muestra que se homogeneizaron con 80 ml de agua milliQ durante 2 min con un Ultra Turrax T18 a 9500 revoluciones por min. El homogeneizado se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. Posteriormente, se lavó el residuo con 70 ml de agua y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se juntaron los sobrenadantes de ambas centrifugaciones y se anotó el volumen obtenido. A partir de 25 ml de sobrenadante se procedió a la determinación del nitrógeno soluble en agua procediendo de la misma forma que lo descrito para la cuantificación de nitrógeno total (método de Kjeldhal; apartado 3.2.3.3.). Para obtener el nitrógeno no proteico a 25 ml del sobrenadante se le agregaron 25 ml de ácido tricloroacético al 25% y se dejó reposar la mezcla durante 30 min a 4°C. Seguidamente, el conjunto se filtró con papel Whatman N° 2 y al filtrado se le analizó el contenido en nitrógeno según el procedimiento descrito para el nitrógeno total (método de Kjeldhal). Los resultados se expresaron como porcentaje de nitrógeno soluble en agua o nitrógeno no proteico sobre nitrógeno total.

3.2.4.5 Nitrógeno aminoacídico (α -amínico)

La determinación del nitrógeno α -amínico se llevó a cabo por el método de la ninhidrina, según la técnica de Moore y Stein. (1948), usando como reactivos HClO₄ 0,6 M; KOH al 30% (p/v); propanol al 50% (v/v); soluciones acuosas de leucina para preparar la recta patrón y reactivo de ninhidrina preparado a partir 2 g de ninhidrina y 0,3 g de hidridantina disueltos en 75 ml de etilenglicol monometil éter exento de peróxidos y una vez disuelta la mezcla se añaden 25 ml de tampón acético/acetato 4 N a pH 5,5. Se homogeneizaron 5 g de queso Oaxaca con 50 ml de HClO₄ 0,6 M en un modelo Omnimixer (Sorvall). El extracto

se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min; una vez centrifugado el sobrenadante se recogió y el residuo fue nuevamente extraído con 25 ml HClO_4 0,6 M y posteriormente filtrado. La mezcla del sobrenadante y filtrado se neutralizó con KOH al 30%. El precipitado se eliminó por filtración a través de papel de filtro. El extracto obtenido fue conservando a congelación (-18°C) para el posterior análisis.

Por otro lado, se prepararon varias disoluciones acuosas de leucina con concentraciones comprendidas entre 1 y 10 mg/l. Se llevaron 0,5 ml de cada disolución a los correspondientes tubos de ensayo y se añadieron a cada uno 1,5 ml del reactivo de la ninhidrina, se agitaron y se calentaron en agua hirviendo durante 20 min. Transcurrido ese tiempo, se enfriaron con agua corriente y se adicionaron 8 ml de propanol a cada tubo, se agitaron los tubos y después de 10 min se leyeron las absorbancias a 570 nm frente a un blanco sin leucina. Para el análisis de las muestras se siguieron los mismos pasos dados en la preparación de los patrones, solo que en vez de disoluciones de leucina se añadieron disoluciones de los extractos perclóricos obtenidos, según se ha descrito anteriormente, que antes del análisis fueron diluidos en agua 10 veces.

3.2.5. Evaluación de propiedades funcionales de los quesos

3.2.5.1. Extensión durante el fundido

El porcentaje de extensión del queso durante el fundido se determinó a partir de una muestra representativa de cada queso de aproximadamente 150 g que se homogenizó con una picadora (Moulinex, Francia) procediéndose de inmediato al análisis. Este análisis se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Guinee *et al.* (2000). Se colocó sobre un trozo de papel de aluminio una cantidad de queso homogeneizado en forma de cilindro de 4,5 cm de diámetro y 0,6 cm de altura, con un peso aproximado de 11,7 g. Se marcó con un rotulador el diámetro del cilindro (D1). Posteriormente, las muestras se metieron en un horno (previamente calentado) a una temperatura de 280°C

permaneciendo dentro durante 4 min. Transcurrido ese tiempo se procedió a retirar la muestra del horno y se marcó el diámetro final (D2).

Para determinar el porcentaje de extensión durante el fundido, primero se quitó el queso del papel aluminio, se cortó en el papel el diámetro D2 y se pesó con balanza de precisión. Posteriormente se cortó el círculo que marcaba el diámetro inicial y se pesó (D1). Por último se calculó el porcentaje de extensión durante el fundido mediante la siguiente operación:

$$\% \text{ de fundido} = 100 \times [D2(g) - D1(g)] / D1(g)$$

3.2.5.2. Color antes y después del fundido

El estudio del color de los quesos se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de Wang y Sun (2001) con algunas modificaciones, tal y como se describe a continuación. Después de la toma de muestras se colocaron 15 g de queso previamente homogeneizado con la ayuda de una picadora doméstica (Moulinex). A partir del homogeneizado se moldeó un cilindro de queso con un diámetro de 4,5 cm y una altura de 0,6 cm sobre una tortilla de harina y se procedió a la determinación del color. Las muestras de queso se introdujeron en un horno de convección (Whirpool), previamente calentado a la temperatura de trabajo (280°C) durante 4 min y después se dejaron enfriar durante aproximadamente 15 min y se volvió a medir el color.

El color se determinó usando un espectrofotómetro de reflectancia (CR-300; Minolta, Japón). Los parámetros que se midieron fueron L* (luminosidad), a* (índices rojos y verdes) y b* (índices amarillos y azules). Antes de la medición de estos parámetros, el instrumento fue calibrado usando una superficie de color blanco estándar. Las mediciones se realizaron por triplicado con un ángulo del observador de 10° y el iluminante de D65 sobre la superficie de cada una de las muestras de

queso colocadas sobre la tortilla de harina anteriormente mencionada y, a su vez, sobre una base plana de polietileno blanco de 1 cm de grosor.

3.2.5.3. Textura del queso no fundido

La textura del queso se determinó de una manera objetiva por triplicado sobre la muestra de queso (un cubo de 2 cm³) mediante un método mecánico de compresión realizado con un texturometro TA.XTPlus (Stable Micro Systems, Reino Unido) equipado con una sonda cilíndrica de 30 mm de altura de 25 mm de diámetro, con una velocidad de análisis de 1 mm s⁻¹ por una distancia de 80 mm siguiendo los métodos descritos por Szczesniak (1963 y 1966); Bourne (1978) y Van Villet (1991). Como parámetros de textura se calcularon la dureza, la adherencia, la elasticidad y la cohesividad.

3.2.5.4. Análisis sensorial

El análisis sensorial se llevó a cabo con un grupo de 9 personas (7 mujeres y 2 hombres) con una edad promedio de 24 años. Todos ellos estudiantes o profesores del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. Los jueces recibieron un entrenamiento previo a la evaluación de las muestras de queso. Para el entrenamiento y el análisis sensorial de los quesos se dispuso de una sala de cata con cabinas individualizadas de 147 cm x 109 cm x 313 cm, equipadas con focos de luz blanca y una llave de agua con sumidero. El entrenamiento, presentación y procedimientos en general del análisis sensorial se realizaron, en general, según lo descrito por Poste *et al.* (1991).

3.2.5.5. Entrenamiento de catadores

Se entrenó a 12 voluntarios estudiantes y profesores del Instituto de Ciencias Agropecuarias mencionado anteriormente. La fase de entrenamiento se desarrolló en 10 sesiones, cada una de ellas tuvo una

duración de 30 min. Después de una sesión introductoria, los catadores fueron entrenados en el reconocimiento y evaluación de la intensidad de los sabores, los olores y los atributos de textura evaluados en el análisis, con patrones y muestras de queso (3 sesiones por cada tipo de atributo).

Los atributos sensoriales seleccionados fueron aquellos más característicos y notorios en este queso de acuerdo con un estudio anterior (Monroy, 2007) en el que se valoraron sensorialmente diversos quesos mexicanos, entre ellos el queso Oaxaca. Los atributos valorados en dicho estudio fueron los siguientes: sabor a leche fresca, a leche cocida, a leche fermentada, a mantequilla, a establo; gusto dulce, ácido, picante, salado y amargo; textura húmeda, friable y fundente en boca. Estos descriptores, a su vez, fueron elegidos tomando como referencia el trabajo de Drake *et al.* (2001).

Las sesiones de entrenamiento antes descritas se realizaron de la siguiente manera:

- Sesión 1. Pruebas de reconocimiento para la memorización de los sabores, los olores y los atributos de textura evaluados, utilizando muestras de referencia.
- Sesión 2. Utilización de muestras de trabajo o estándares, para memorizar y, además, para establecer los valores de referencia sobre la intensidad de los mismos, utilizando una escala estructurada de 9 puntos, donde 1 fue ausencia total del atributo y 9 el valor más elevado.
- Sesión 3. Puntuación de los parámetros estudiados en un queso Oaxaca obtenido en el mercado usando una escala estructurada de 9 puntos, en presencia de los estándares.

El entrenamiento del sentido del gusto se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de Chamorro y Losada. (2002), según se indica a continuación. Se prepararon soluciones acuosas de 2 g/100 ml de ácido cítrico para el sabor ácido y 4,7 g/100 ml de cafeína para el sabor amargo. A partir de las soluciones anteriormente mencionadas, se prepararon dos muestras de trabajo para cada atributo, una de concentración baja y otra de concentración alta, mezclando las cantidades indicadas en la Tabla 3.2. con requesón (Chamorro y Losada, 2002). Las muestras anteriores

de cada atributo fueron etiquetadas con el sabor que contenían y presentadas a los jueces. Una vez que los jueces identificaron los sabores, se presentaron las dos muestras de concentración baja en un plato sin identificación y se solicitó a los jueces que clasificaran las muestras según el sabor.

Tabla 3.2. Volumen de solución y peso de requesón mezclados para obtener las muestras estándar de concentración baja y alta

	Baja		Alta	
	ml de solución	g de requesón	ml de solución	g de requesón
Ácido	7,5	200	30	200
Amargo	15	200	25	200

En la segunda sesión de entrenamiento de sabores se volvieron a presentar las muestras de requesón de concentración baja y alta preparadas tal y como se indicó anteriormente. Se pidió a los jueces que evaluaran la intensidad del sabor, marcando en una escala estructurada de 9 puntos el valor percibido para la muestra de baja concentración. A la muestra de mayor concentración se le asignó la puntuación de 9. A la muestra de menor concentración se le asignó el valor de 2, debido a que este valor fue el valor promedio de las puntuaciones atorgadas por los jueces para dicha muestra (la de menor concentración). En la última sesión, se volvieron a probar las muestras de requesón con concentraciones alta y baja y se pidió a los catadores que probaran un queso Oaxaca del mercado y lo puntuaran.

El entrenamiento de los caracteres aromáticos también se dividió en tres partes, las cuales fueron realizadas en diferentes sesiones de forma paralela a la descrita para los sabores. La primera sesión de entrenamiento de olores consistió en el reconocimiento de los mismos, la segunda en la asignación de valores en la escala a los estándares utilizados y la tercera a la evaluación de un queso en presencia de los estándares aromáticos. Para la preparación de los estándares se siguieron las indicaciones de Chamorro y Losada. (2002). Las alícuotas de los estándares que se ofrecieron a los jueces consistieron en

pequeños vasos de plástico con tapadera con unos pocos ml de los compuestos o sustancias mostradas en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Olores que fueron objeto de entrenamiento y referencias o estándares utilizados

Familias y subfamilias	Olor	Referencia o preparación
Lácteo acidificado	Fermentación láctica	Cultivo, leche acidificada con cultivos mesófilos homofermentativos
Mantequilla	Olor a mantequilla	Mantequilla comercial mezclada con leche en proporción 1/10 (peso/volumen)
Intensidad olor	Aroma a queso	Aroma a Cheddar 1ml/300 ml de leche para la concentración baja 5 ml/300 ml para la alta

El entrenamiento de los catadores para los caracteres de textura se dividió en tres sesiones al igual que para los caracteres de sabor y olor. El carácter o atributo de textura evaluado fue el carácter fundente (pastosidad) y la definición y estándar utilizados para el entrenamiento fueron los descritos por Chamorro y Losada. (2002). Para evaluar la característica de fundente se colocó la muestra en la boca y se presionó con la lengua y el paladar. Se evaluó la capacidad de formar una pasta, la facilidad de licuar y fundir la muestra sin necesidad de mucha saliva. Los ensayos se realizaron con los siguientes estándares.

Clara de huevo —► Nada fundente

Queso fundido—► Muy fundente

3.2.5.6. Evaluación del sabor, olor y textura

Las pruebas de evaluación del sabor, olor y textura del queso, se llevaron a cabo en una sesión para cada queso y cada día de muestreo. Las muestras de queso a evaluar se presentaron en 3 flaneras de vidrio codificadas con una clave de 3 dígitos. Cada una contenía 3, 2, 1 cubos de 1,5 x 1,5 cm de queso para los atributos de olor, sabor y textura

respectivamente, cubiertas con plástico de polietileno transparente. Los análisis se realizaron en el siguiente orden: primero se evaluó el olor de las muestras presentadas. El procedimiento para evaluar el olor consistió en romper la muestra en dos y aspirar rápidamente el olor. Para la prueba de sabor se pidió a los jueces que distribuyeran la muestra uniformemente en la boca y la dejaran allí por un pequeño tiempo para que pudieran percibir mejor los sabores de cada muestra. La textura se evaluó manteniendo la muestra en la boca, presionándola entre la lengua y el paladar y haciendo movimientos para formar una pasta con ella, y si fuera necesario con ayuda de masticación. Las fichas de cata para los distintos atributos se muestran en las Fig. 3.1, 3.2 y 3.3. Además de estas evaluaciones, al final de la prueba sensorial se pidió a los catadores que utilizaran la muestra sobre la que se evaluó el olor para decidir si el queso por su olor, sabor y textura era o no aceptable para su consumo y en caso de no ser aceptable se indicara el por qué.

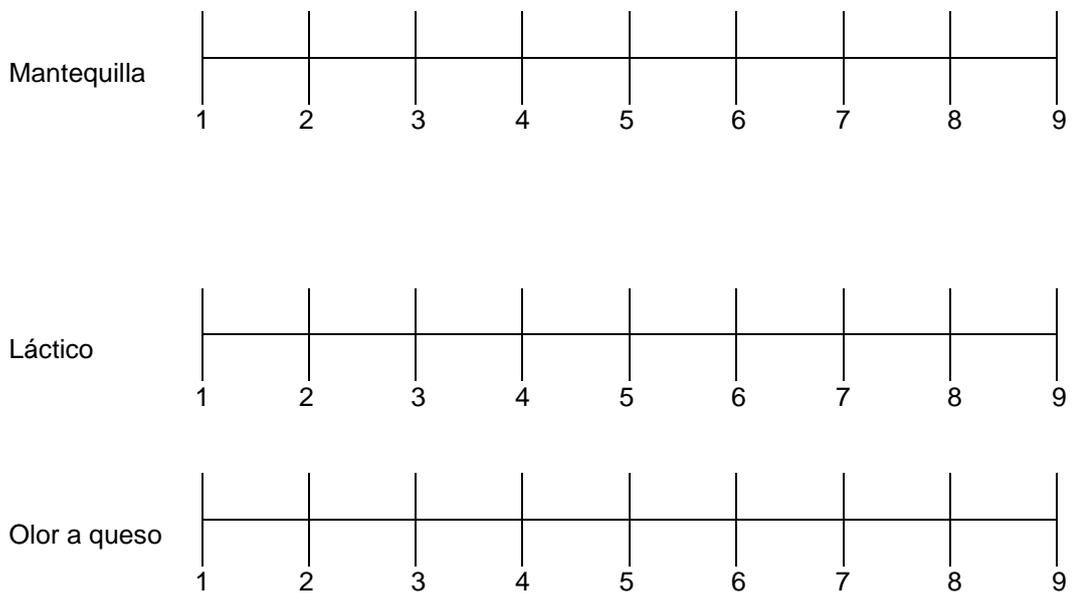
OLOR

NOMBRE: _____

FECHA: _____

Ante usted se encuentran 3 muestras codificadas de queso Oaxaca, de las cuales deberá partir un trozo de queso de cada una y evaluar la intensidad de olor del primer atributo indicado en la ficha, anotando el código de la muestra en la escala. Continúe con los siguientes atributos tomando otro trozo de cada una de las muestras.

Por favor **NO** pruebe las muestras.



Observaciones: _____

Muchas gracias

Fig. 3.1. Ficha utilizada en la evaluación de los atributos de olor del queso Oaxaca.

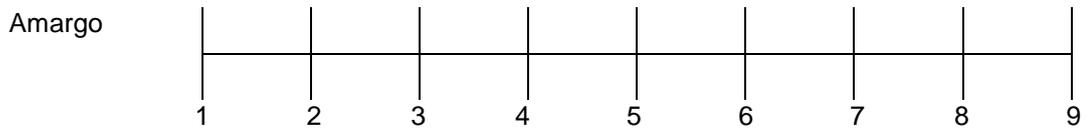
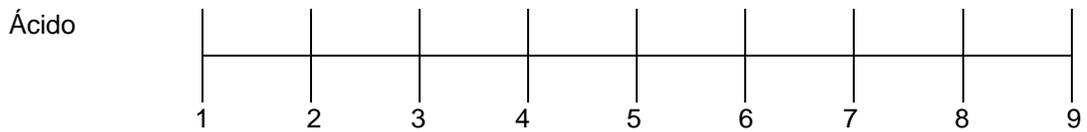
SABOR

NOMBRE _____

FECHA _____

Ante usted se encuentran 3 muestras codificadas de queso Oaxaca. Pruebe un trozo de queso de cada muestra y evalúe la intensidad de sabor del primer atributo indicado en la ficha. Posteriormente, anote el código en la escala. Continúe con los siguientes atributos tomando otro trozo de cada una de las muestras.

Por favor **NO** trague la muestra, **enjuague su boca** antes de iniciar su prueba y entre cada muestra.



Observaciones: _____

Muchas gracias

Fig. 3.2. Ficha utilizada en la evaluación de los atributos de sabor del queso Oaxaca.

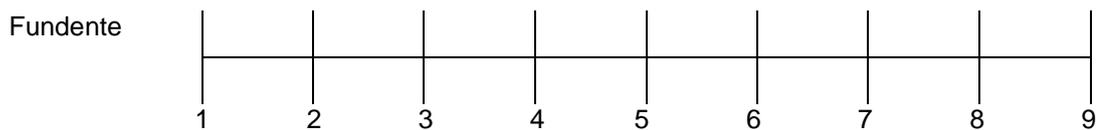
TEXTURA

NOMBRE _____

FECHA _____

Ante usted se encuentran 3 muestras codificadas de queso Oaxaca. Pruebe un trozo de queso de cada muestra y evalúe la textura fundente, indicado en la ficha, anotando a continuación el código de la muestra en la escala:

Fundente: Coloque la muestra en la boca y presiónela entre la lengua y el paladar, evaluando la capacidad de tomar una pasta, la facilidad de licuar y fundir la muestra sin la necesidad de mucha saliva.



Observaciones: _____

Muchas gracias

Fig. 3.3. Ficha utilizada en la evaluación de los atributos de textura del queso Oaxaca.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Componentes mayoritarios de los queso

La composición de los quesos utilizados en el presente estudio se muestra en la Tabla 3.4. Hubo gran similitud en la composición de dichos quesos excepto en lo relativo al contenido en sal, que fue más abundante en la muestra 1 que en el resto. De acuerdo con Eck (1990), el queso Oaxaca, siguiendo la clasificación de los quesos propuesta por Eck (1990), es semigraso debido a que su porcentaje de grasa sobre extracto seco se sitúa entre 45 y 62%. Además, siguiendo el Codex Alimentarius (FAO, 2013), el queso Oaxaca es semiduro, debido a que el porcentaje de humedad sobre materia no grasa estuvo dentro del rango característico para este tipo de quesos (54-69%). La composición de los quesos Oaxaca del presente estudio está dentro de los rangos de composición encontrado en otros estudios que también analizaron este tipo de queso (De Oca-Flores *et al.*, 2009; Caro *et al.*, 2014).

Tabla 3.4. Composición química (g /100g) del queso Oaxaca *

	Fábrica			Media
	1	2	3	n = 3
Humedad	47,1 ± 2,5	50,6 ± 0,1	48,9 ± 0,4	48,9 ± 1,3
Proteína	22,2 ± 0,5	22,1 ± 0,9	22,8 ± 2,4	22,4 ± 1,0
Grasa	18,2 ± 6,0	19,0 ± 1,4	20,5 ± 1,4	19,3 ± 2,7
Cenizas	3,8 ± 0,1	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,2	2,9 ± 0,1
Sal	1,8 ± 0,1	1,0 ± 0,4	0,8 ± 0,0	1,3 ± 0,2
Extracto seco	52,9 ± 2,5	49,4 ± 0,1	51,1 ± 0,4	51,1±1,3
Humedad/Materia no grasa	57,6 ± 2,5	62,5 ± 1,4	61,5 ± 1,4	60,6 ± 2,1
Proteína/Extracto seco	42,0 ± 0,2	44,7 ± 0,9	44,6 ± 0,6	43,8 ± 0,8
Grasa/Extracto seco	34,4 ± 2,4	38,5 ± 1,4	40,1 ± 1,4	37,8 ± 2,1
Sal/Humedad	4,7 ± 0,1	2,0 ± 0,7	1,5 ± 0,1	2,7 ± 0,3

* Los resultados de cada fábrica son la media y desviación estándar de dos réplicas de queso de la misma industria pero recogidas en dos días de elaboración diferentes.

3.3.2. Variación cuantitativa de los principales grupos microbianos en el queso durante el almacenamiento a refrigeración

3.3.2.1. Evolución de la microflora aerobia mesófila viable y de las bacterias ácido-lácticas

Los resultados de los recuentos de la microflora aerobia mesófila viable y de las BAL encontrados en el queso Oaxaca durante su almacenamiento se recogen de forma conjunta en Tabla 3.5 y de forma individualizada en las figuras 3.4 a 3.9.

Tabla 3.5. Cambios en los recuentos de los diferentes grupos microbianos (\log_{10} cfu/g) en el queso Oaxaca durante su almacenamiento a vacío y 8°C

	Días de almacenamiento			
	1	8	16	24
Flora aerobia mesofila viable	7,46 ± 0,21 ^{bc}	7,69 ± 0,16 ^b	8,32 ± 0,35 ^a	7,34 ± 0,12 ^c
Bacterias ácido lácticas				
Lactococos mesofilos	8,13 ± 0,39	8,53 ± 0,52	8,46 ± 0,40	8,42 ± 0,16
Lactococos termofilos	7,67 ± 0,22 ^a	7,46 ± 0,51 ^a	7,89 ± 0,46 ^a	6,37 ± 0,26 ^b
Lactobacilos mesofilos	6,34 ± 0,16 ^b	6,72 ± 0,18 ^b	8,22 ± 0,23 ^a	6,80 ± 0,23 ^b
Lactobacilos termofilos	6,74 ± 0,29	6,87 ± 0,49	7,02 ± 1,03	7,21 ± 0,69
Enterococos	6,53 ± 0,37 ^a	6,64 ± 0,26 ^a	6,06 ± 0,31 ^a	5,13 ± 1,09 ^b

^{a-c} Los promedios en la misma fila con diferente superíndice mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$).

En la Figura 3.4 se muestra la evolución de los recuentos de la FAMV en el queso Oaxaca durante los 24 días de almacenamiento a 8°C. Se observó un incremento paulatino de dichos recuentos hasta la semana 16 y un descenso posterior ($P < 0,05$). El error estándar medio (EEM) del análisis de varianza fue 0,08.

De los recuentos de BAL realizados, los obtenidos en medio M17 a 30°C (lactococos mesófilos; Fig. 3.5) fueron los más elevados durante todo el almacenamiento, mostrando niveles superiores a 8 log UFC/g, que fueron valores equiparables a los recuentos de FAMV. Los recuentos en M17 a 45°C (lactococos termófilos) fueron inferiores a los de 30°C en

aproximadamente una unidad logarítmica hasta el día 16 y dos log UFC/g en el día 24 cuando experimentaron un descenso significativo (Fig. 3.6).

Los recuentos de BAL en MRS (lactobacilos), fueron los segundos en importancia después de los lactococos mesófilos, observándose cantidades iniciales próximas a 7 log UFC/g tanto a 30°C como a 45°C. Los recuentos a 30°C subieron en el día 16 de almacenamiento ($P < 0,05$), hasta llegar a 8-9 log UFC/g y en el día 24 bajaron hasta los niveles iniciales (Fig. 3.7). Los recuentos a 45°C no cambiaron significativamente con el tiempo (Fig. 3.8).

Por otra parte, los recuentos en medio KF Streptococcus (enterococos) (Fig. 3.9), inicialmente fueron similares a los de MRS (lactobacilos mesófilos). Posteriormente, durante el almacenamiento de los quesos, los recuentos de enterococos descendieron ($P < 0,05$). A partir del día 16 de almacenamiento los niveles de enterococos fueron inferiores a los de lactobacilos mesófilos.

Los niveles de BAL y la tendencia en los mismos durante el almacenamiento, en sentido general, coincidieron en gran medida con los observado para la FAMV. Esto indica que las BAL fueron el grupo microbiano dominante en el queso a lo largo de todo el almacenamiento. Los descensos encontrados al final del almacenamiento en los recuentos de FAMV y de algunos grupos de BAL (lactococos termófilos, lactobacilos mesófilos y enterococos) podrían deberse a un cambio en los factores que influyen el crecimiento microbiano. En este sentido, se podría haber alcanzado la fase de decaimiento en la curva de crecimiento microbiano.

Al igual que en el presente estudio, Saxer *et al.* (2013) encontraron que las BAL fueron el grupo microbiano dominante en el queso Oaxaca, con un claro predominio de los lactococos sobre los lactobacilos. El predominio de lactococos sobre lactobacilos ha sido también descrito en queso Mozzarella (Conte *et al.*, 2007; Yazici *et al.*, 2010). Estos autores, coincidiendo con lo observado en el presente estudio, encontraron cierto incremento en los niveles de los lactobacilos durante el almacenamiento del queso a refrigeración, mientras que los niveles de lactococos permanecieron constantes o decrecieron según las condiciones de almacenamiento. Sin embargo, en el queso argentino de

“pasta filata” no madurado llamado Quesillo, Oliszewsky *et al.* (2007) encontraron que los recuentos en MRS y M17 fueron similares y que ambos disminuyeron con el tiempo de almacenamiento.

En relación a los enterococos, los niveles encontrados en el presente estudio fueron más elevados que los encontrados por Saxer *et al.* (2013) o De Angelis *et al.* (2008) en queso Oaxaca y Mozzarella (ambos elaborados con leche pasteurizada), respectivamente, quienes observaron en los respectivos quesos cantidades próximas a 5 log UFC/g por g. No obstante, la presencia de enterococos en cantidades de 7 log UFC/g es frecuente en quesos tradicionales elaborados con leche cruda (Wessels *et al.*, 1990), como son los utilizados en este estudio. De acuerdo a Giraffa (2003), la concentración de enterococos en los quesos se mantiene constante o se incrementa durante su almacenamiento o maduración. Además, ese autor considera que estos microorganismos juegan un papel importante en el desarrollo del sabor de los quesos. En el presente estudio, por el contrario, se observó un descenso en la concentración de los enterococos hacia el final del almacenamiento.

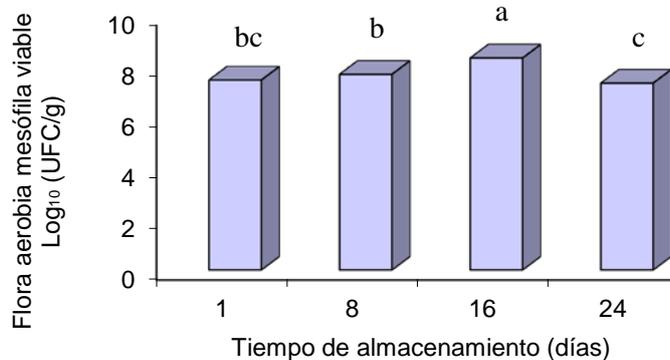


Fig. 3.4. Evolución en la flora aerobia mesófila viable en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. ^{a,b,c} Valores medios de las barras con ninguna letra en común presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

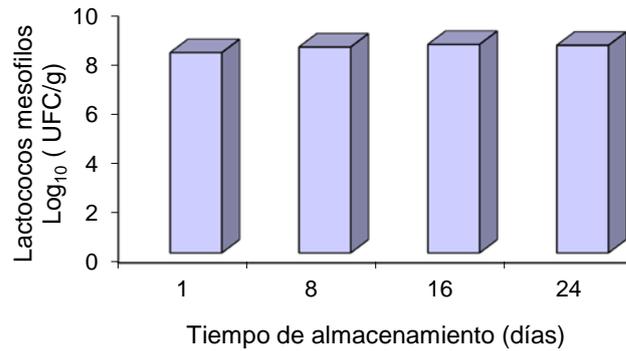


Fig. 3.5. Evolución de los recuentos de lactococos mesófilos en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

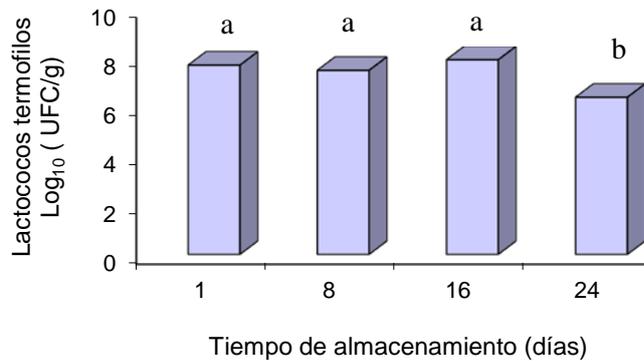


Fig. 3.6. Evolución de los recuentos de lactococos termófilos en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. ^{a,b,c} Valores medios de las barras con ninguna letra en común presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

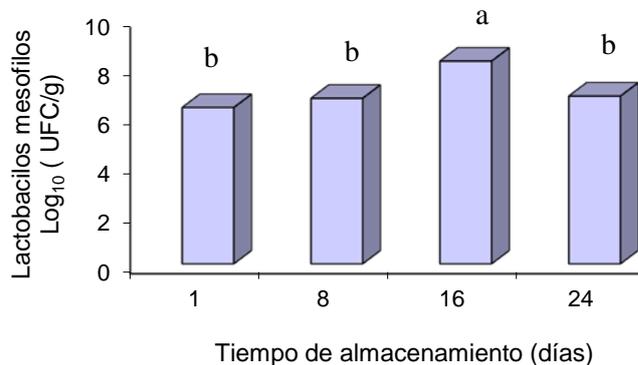


Fig. 3.7. Evolución de los recuentos de lactobacilos mesófilos en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. ^{a,b,c} Valores medios de las barras con ninguna letra en común presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

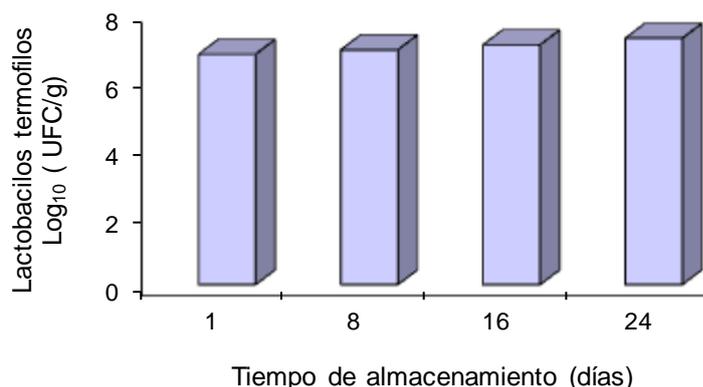


Fig. 3.8. Evolución de los recuentos de lactobacilos termófilos en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

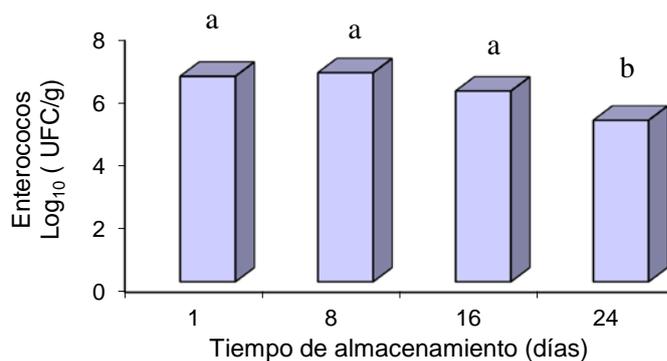


Fig. 3.9. Evolución de los recuentos de enterococos en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. ^{a,b,c} Valores medios de las barras con ninguna letra en común presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

3.3.2.2. Evolución de coliformes, *Escherichia coli*, cocos Gram-positivos/catalasa-positivos y mohos y levaduras

Los recuentos de bacterias coliformes, *E. coli*, mohos y levaduras, cocos Gram-positivos y catalasa positivos se muestran en la Tabla 3.6 de forma conjunta y en las figuras 3.10 a 3.13.

Tabla 3.6. Cambios en los recuentos de los diferentes grupos microbianos (\log_{10} cfu/g) en el queso Oaxaca durante su almacenamiento a vacío y 8°C

	Días de almacenamiento			
	1	8	16	24
Coliformes	5,87 ± 0,41 ^a	5,65 ± 0,50 ^a	4,60 ± 0,76 ^b	2,86 ± 0,59 ^c
<i>Escherichia coli</i>	2,88 ± 2,49	2,48 ± 2,27	2,89 ± 2,68	1,63 ± 1,43
Mohos y levaduras	5,05 ± 0,80 ^a	5,52 ± 0,17 ^a	5,20 ± 0,17 ^a	4,35 ± 0,14 ^b
Cocos Gram y catalasa positivos	5,89 ± 0,47 ^{ab}	6,21 ± 0,36 ^a	5,91 ± 0,26 ^{ab}	5,39 ± 0,62 ^b

^{a-c} Los promedios en la misma fila con diferente superíndice mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$).

Los coliformes en el queso Oaxaca (Figura 3.10) presentaron unos recuentos iniciales de 6 log UFC/g y descendieron durante el almacenamiento ($P < 0,05$). En cuanto a *Escherichia coli* (*E. coli*) (Figura 3.11), los recuentos iniciales fueron de aproximadamente 3 log UFC/g y no se encontraron cambios significativos durante el almacenamiento, aunque en el día 24 se encontraron valores medios inferiores a 2 log UFC/g.

En un estudio previo sobre queso Oaxaca elaborado con leche cruda (Caro *et al.*, 2013) encontraron cantidades de coliformes y *E. coli* más bajas (4 y 3,6 log UFC/g, respectivamente) que en este estudio. Estos microorganismos se utilizan como índice de higiene en los quesos (Ganesan *et al.*, 2012) y se relacionan con contaminación fecal. La presencia de cantidades elevadas de los mismos en los quesos estudiados se puede atribuir a deficiencias en la higiene en el ordeño y manipulación de la leche (Zarate *et al.*, 1997). Estos recuentos elevados podrían tener repercusión sobre la vida útil de los quesos, porque los coliformes son considerados una de las bacterias alterantes más importantes en quesos como el queso Mozzarella (Altieri *et al.*, 2005 y De Angelis *et al.*, 2008).

Los coliformes son sensibles a valores de pH bajos y son afectados por el crecimiento de BAL (De Angelis *et al.*, 2008 y Moschopoulou *et al.*, 2010). Esto explicaría la disminución significativa en

los recuentos de coliformes observada a partir del día 8 de almacenamiento.

Los recuentos de mohos y levaduras (Fig. 3.12) en el queso Oaxaca recién elaborado estuvieron próximos a 5 log UFC/g por g de queso, sin que se observaran diferencias significativas hasta día 24 de almacenamiento, cuando descendieron ligeramente ($P < 0,05$). El EEM del análisis de varianza fue 0,16. En un estudio previo realizado por este grupo de investigación a partir de queso Oaxaca elaborado con leche cruda, se encontró una cantidad similar de microorganismos correspondientes a esta categoría (Caro *et al.*, 2013). Cantidades entre 4-6 log UFC/g de mohos y levaduras son frecuentes en quesos de “pasta filata” no madurados (Romano *et al.*, 2001). Sin embargo, en queso Oaxaca o queso Mozzarella elaborado con leche pasteurizada las cantidades encontradas por diversos autores (Saxer *et al.*, 2013; Yazici *et al.*, 2010) fueron algo menores (2-4 log UFC/g), lo que se podría atribuir, al menos en parte, al uso de leche pasteurizada y cultivos iniciadores. Las levaduras se consideran, en general, una microbiota no deseada en los quesos frescos, pues pueden ser responsables de su alteración (Fleet, 1990; Jackobsen y Narvhus, 1996). No obstante, también podrían tener un efecto positivo sobre el aroma de los quesos tradicionales elaborados con leche cruda que convendría establecer (Jackobsen y Narvhus, 1996; Romano *et al.*, 2001).

Los recuentos de cocos Gram-positivos y catalasa positivos en el queso Oaxaca a lo largo del almacenamiento se observan en la Fig. 3.13. Este grupo microbiano está presente en cantidades moderadas (5-6 log UFC/g, con un EEM de 0,21). Hubo diferencias significativas entre los valores del día 8 y el 24, siendo los recuentos más elevados en el día 8. Los cocos Gram-positivos y catalasa-positivos, debido a su actividad lipolítica, puede contribuir al desarrollo del sabor de algunos quesos madurados (Zarate *et al.*, 1997). En queso fresco o de corta maduración su significado tecnológico no está claro.

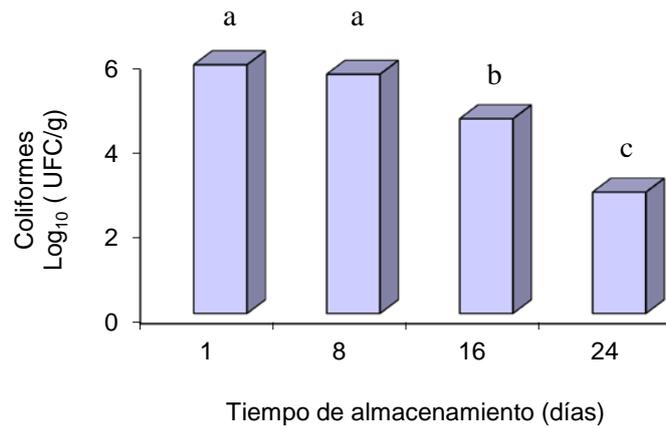


Fig. 3.10. Evolución en los recuentos de microorganismos coliformes en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P<0,05$).

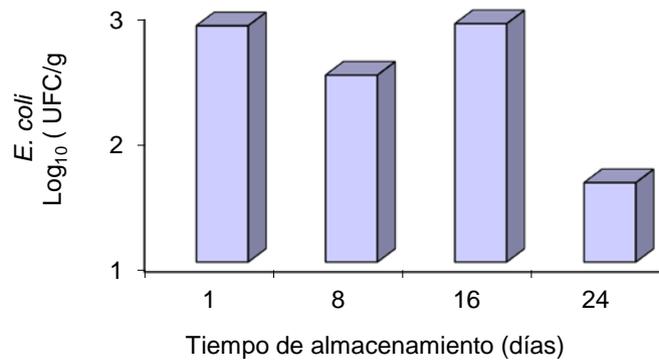


Fig. 3.11. Evolución en los recuentos de *Escherichia Coli* (*E. coli*) en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P<0,05$).

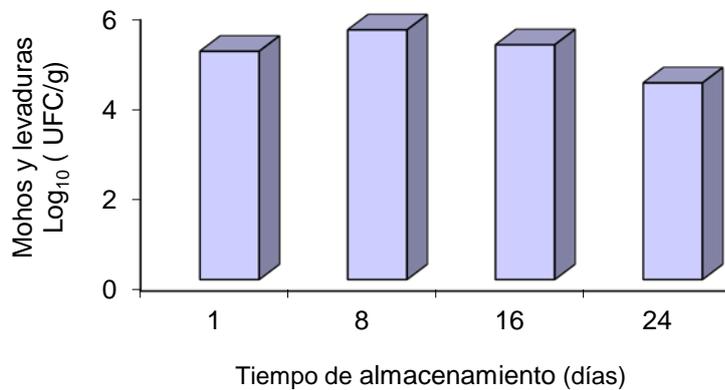


Fig. 3.12. Evolución en los recuentos de mohos y levaduras en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P<0,05$).

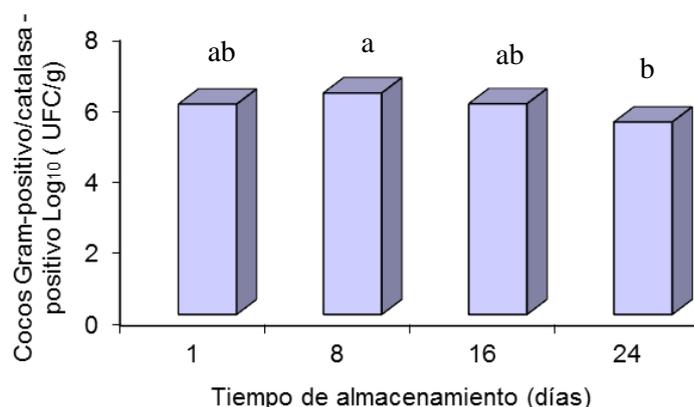


Fig. 3.13. Evolución en los recuentos de cocos Gram-positivo/catalasa-positivo en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. ^{a,b,c} Valores medios de las barras con ninguna letra en común presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

3.3.3. Variación cuantitativa de los índices o marcadores de acidificación, lipólisis y proteólisis de los quesos durante su almacenamiento a refrigeración

En la presente sección se describe la evolución de diversos compuestos implicados en los principales cambios químicos que tienen lugar en el queso durante su almacenamiento, derivados del metabolismo de la lactosa residual, la lipólisis y la proteólisis (McSweeney y Fox, 2004). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.7. donde se incluyen todos los análisis realizados y en las figuras 3.14 a 3.27 donde se muestran los resultados de cada análisis.

Tabla 3.7. Cambios en las características químicas de queso Oaxaca durante su almacenamiento a vacío y 8°C

	Días de almacenamiento			
	1	8	16	24
<i>Azúcares y ácidos orgánicos de</i>				
<i>cadena corta (mg/100g)</i>				
Galactosa	314,0 ± 115,9	325,4 ± 91,7	340,3 ± 66,3	271,9 ± 95,4
Ácido láctico	513,2 ± 139,8 ^c	771,4 ± 180,7 ^{ab}	918,0 ± 290,2 ^a	688,4 ± 186,0 ^{bc}
Ácido acético	1,86 ± 1,40	1,89 ± 1,38	3,08 ± 1,81	0,80 ± 0,73
pH	5,33 ± 0,08 ^a	5,28 ± 0,03 ^{ab}	5,18 ± 0,03 ^b	5,0 ± 0,03 ^c
<i>Índices de lipólisis y proteólisis¹</i>				
AGL	428,4 ± 57,8	416,1 ± 8,2	461,6 ± 8,1	449,1 ± 7,3
NSa	11,19 ± 3,04	13,33 ± 4,14	13,36 ± 3,21	14,04 ± 5,61
NNP	4,22 ± 0,62	5,78 ± 0,85	6,63 ± 1,68	5,71 ± 1,27
α-NH ₂ -N	0,19 ± 0,10	0,22 ± 0,11	0,28 ± 0,03	0,27 ± 0,06

^{a-c} Los promedios en la misma fila con diferente superíndice mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$).

¹AGL: ácidos grasos libres expresado como porcentaje sobre grasa total; NSa, NNP y α-NH₂: nitrógeno soluble en agua, nitrógeno no proteico y nitrógeno α-amino, expresados como porcentaje sobre nitrógeno total, respectivamente.

3.3.3.1. Evolución del contenido de azúcares (lactosa, glucosa y galactosa)

No se encontraron cantidades cuantificables de lactosa y glucosa en el queso (límite de cuantificación: 50 mg/100 g de queso). Otros autores (García, 2006; Mukherjee y Hutkins, 1994; Upreti y Metzger, 2006) han encontrado en el queso Cheddar o Manchego mexicano, que al igual que el queso Oaxaca presentan una acidificación media (pH en la cuajada de aproximadamente 5,2) y corta maduración, un contenido de lactosa en el rango de 110 a 490 mg por 100 g de queso. Esta lactosa es considerada como lactosa residual, que queda en el queso después del proceso de fermentación microbiana que tiene lugar durante la acidificación de la cuajada. En los quesos de “pasta filata”, como es el

caso del queso Oaxaca, con un pH similar al de los quesos anteriores, es de esperar un contenido en azúcares (glucosa y lactosa) aun inferior al de los quesos antes mencionados, debido a la lixiviación o pérdida de azúcares solubles durante la etapa de malaxado de la cuajada (en agua caliente a 75°C durante 10 a 15 min) posterior a la acidificación. En relación a este último aspecto, Gernigon *et al.* (2009) encontraron que la concentración de azúcares en el agua de malaxado del queso Mozzarella procedente de la cuajada fue de aproximadamente 3,5 mg/kg, siendo esta cantidad comparable (aunque ligeramente inferior) a la encontrada en el suero (después de la acidificación). No obstante, no se han encontrado en la bibliografía datos sobre el contenido de lactosa y glucosa en quesos de “pasta filata” no madurados que sirvan para tener una referencia de comparación con lo obtenido en el queso Oaxaca en este estudio.

A diferencia de los anteriores azúcares, la galactosa sí que fue cuantificada en los quesos Oaxaca. En la figura 3.14 se muestra la evolución de la cantidad de galactosa durante los 24 días de almacenamiento del queso. El EEM del análisis de varianza fue 50,4 mg. El contenido de galactosa del queso Oaxaca al inicio del almacenamiento estuvo entorno a los 300 mg por 100 g de queso y no se observaron diferencias significativas entre los distintos tiempos de muestreo. Ese contenido fue similar al encontrado en el queso Mozzarella de baja humedad tras la etapa de estiramiento (Mukherjee y Hutkins, 1994). La galactosa procede de la hidrólisis de la lactosa y es un azúcar de fermentación más “complicada” que la glucosa, ya que muchas cepas de bacterias lácticas no disponen de rutas metabólicas para su utilización (Mukherjee y Hutkins, 1994; Bettenbrock y Alpert, 1998). No obstante, de acuerdo a McSweeney y Fox (2004), algunas cepas *L. lactis subs. cremoris* utilizan la galactosa por la ruta de la tagatosa y algunas de lactobacilos pueden transformar la galactosa en glucosa-6-fosfato por la vía de Leloir, que a su vez es transformada en lactato por la vía de Embden-Meyerhof. En este contexto, Mukherjee *et al.* (1994) y Gopal y Richardson (1996) encontraron en su trabajo que la cantidad de galactosa en el queso estaba en función de las cepas de las bacterias lácticas presentes. La galactosa puede acumularse en el queso y alcanzar

cantidades elevadas cuando la velocidad de su formación (a partir de la hidrólisis de la lactosa) es mayor a la de su degradación lo que, a su vez, ocurre cuando la microbiota del queso no utiliza la galactosa con facilidad. De esta forma, en el queso se pueden alcanzar cantidades de este azúcar que pueden afectar a la calidad del queso, concretamente a la apariencia, ya que se le responsabiliza de generar color marrón intenso por reacción de Maillard durante el cocinado del queso. Mukherjee *et al.* (1994) y Gopal y Richardson. (1996) encontraron que la cantidad de galactosa en el queso tuvo influencia sobre el color que adquiere en superficie cuando se somete a un calentamiento. Por este motivo, consideran importante seleccionar cultivos iniciadores de acuerdo a su capacidad para fermentar la galactosa. El queso Oaxaca presentó mayor cantidad de galactosa que la encontrada por los autores antes mencionados.

En el estudio de Caro *et al.* (2011) se ha observado y descrito cómo se pardea la superficie del queso Oaxaca durante su calentamiento en horno a temperaturas comprendidas entre 125°C a 200°C, constatándose un considerable aumento en el pardeamiento al aumentar la temperatura del horno, lo que podría atribuirse a la presencia de galactosa. No obstante, en la práctica habitual, la preparación culinaria del queso Oaxaca consiste principalmente en su fundido a temperatura que no suele superar los 100°C (quesadillas o queso fundido) en el que no se genera color marrón, y el aspecto del queso en estos casos es amarillento, sin pardeamiento. Sin embargo, si este queso se utiliza para preparar pizzas o para gratinar, el pardeamiento tendría lugar y sería, por tanto, la cantidad de galactosa un aspecto de calidad a tener muy en cuenta.

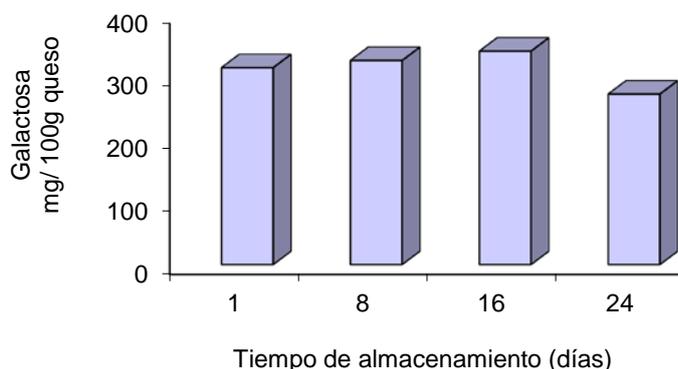


Fig. 3.14. Evolución del contenido de galactosa del queso tipo Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

3.3.3.2. Evolución del contenido de los ácidos láctico y acético

En la figura 3.15 se puede observar la evolución del ácido láctico a lo largo de los 24 días de almacenamiento del queso (el EEM fue de 67,9). Como se puede apreciar, el contenido de ácido láctico se incrementó durante los primeros 16 días de almacenamiento, alcanzándose valores medios de 900 mg por 100 g, para después mostrar un descenso en la última semana. El incremento entre día 1 y 8 y la disminución entre los días 16 y 24, fueron estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

El contenido de ácido láctico (o lactato), el principal compuesto obtenido por las BAL debido a la fermentación de la lactosa, es variable en función a los diferentes tipos de queso. A este respecto se puede decir que la cantidad de ácido láctico está correlacionada con el pH, de forma que, a *grosso modo*, quesos con menor pH muestran mayores niveles de ácido y *viceversa*. Además de la intensidad de la fermentación, otros factores como el lavado de la cuajada, el malaxado de quesos de “pasta filata” o el tiempo de almacenamiento o maduración, pueden influir en la concentración de ácido láctico. En quesos de acidificación media (pH de 5,1-5,4) que no son de “pasta filata” se han encontrado concentraciones de ácido láctico entorno a 1500-2200 mg/100 g: entre 1200 y 2200 mg/100 g en queso Cheddar (Mullin y Emmons, 1997; Ong *et al.*, 2006;

Ong y Shah, 2009); entre 1716 y 1947 mg/100 g en queso Colby (Mullin y Emmons, 1997); entre 1095 y 1465 mg/100 g en queso Brick (Mullin y Emmons, 1997). Por su parte, en los quesos de “pasta filata” el contenido de ácido láctico parece ser algo inferior al de los quesos arriba mencionados, probablemente debido a la pérdida de ácido por lixiviación durante el malaxado, habiéndose descrito cantidades entorno a 1000-1100 mg/100 g de queso (Califano y Bevilacqua, 1999; Mullin y Emmons, 1997). La pérdida de ácido láctico en el agua de malaxado del queso Mozzarella ha sido estudiada por Gernigon *et al.* (2009), quienes observaron que la cantidad de lactato en el agua de malaxado fue elevada. En el queso Oaxaca, las cantidades de ácido láctico (Figura 3.15) fueron aún inferiores a las descritas para el queso Mozzarella, lo que tal vez sea atribuible a que el proceso de malaxado es más intenso en el queso Oaxaca que en el Mozzarella, y por lo tanto mayor es la pérdida de lactato en esta etapa.

En relación a la evolución del ácido láctico durante el periodo de almacenamiento del queso a 8°C, era de esperar el incremento observado en la concentración en la primera mitad de dicho periodo. El incremento en la cantidad de ácido láctico durante las primeras semanas de almacenamiento o maduración ha sido descrito en otros quesos como el Mozzarella o Cheddar (Califano y Bevilacqua, 1999; Ong y Shah, 2009; Rynne *et al.*, 2007) y se ha atribuido principalmente al metabolismo de la lactosa y glucosa residuales producido por las BAL en dicha etapa (Fox *et al.*, 1993), y también, aunque en menor medida, al metabolismo de azúcares procedentes de otros sustratos como los azúcares liberados del glicomacropéptido de caseína y de las glicoproteínas asociadas al glóbulo graso (Beresford y Williams, 2004; Rynne *et al.*, 2007). En segundo lugar, el descenso en la concentración de ácido láctico hacia el final del almacenamiento, también ha sido descrito en el almacenamiento del queso Mozzarella (a 4°C) por Califano y Bevilacqua (1999), aunque este descenso fue más tardío (a partir del día 27 de almacenamiento). El descenso de ácido láctico en los quesos durante su almacenamiento o maduración, producido una vez que los azúcares residuales se han consumido, puede atribuirse a la oxidación del lactato, que genera acetato

y CO₂ (Fox *et al.*, 1993). De acuerdo a estos autores los responsables de la oxidación del lactato son algunas BAL, mohos o levaduras de los quesos.

En la Fig. 3.16 se observa la evolución del ácido acético a lo largo de los 24 días de almacenamiento. El EEM fue de 0,75 mg/100 g. El contenido de este ácido en el queso Oaxaca durante el almacenamiento, a pesar de mostrar valores medios variables en función del día de medida, no mostró diferencias significativas. La cantidad de ácido acético en el queso durante su almacenamiento osciló entre 1 a 3 mg por 100 g de queso.

El ácido acético en el queso tiene varios orígenes: puede proceder del metabolismo de la lactosa; también del metabolismo del citrato desarrollado por un grupo determinado de BAL que tienen esa capacidad (*Leuconostoc* spp. y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*), del metabolismo de ciertos aminoácidos y de la oxidación microbiana del lactato durante el almacenamiento y maduración (Fox *et al.*, 1993; Izco *et al.*, 2002; Walstra *et al.*, 2001; Ong y Shah, 2009).

Las concentraciones de ácido acético encontradas en queso Oaxaca fueron bajas en comparación con las encontradas en otros quesos de acidificación media. Así, se han descrito concentraciones de ácido acético en el queso Colby entre 119 y 385 mg/100 g, en el queso Brick entre 105 y 291 mg/100 g (Mullin y Emmons, 1997) y en el queso Cheddar entre 19 y 100 mg/100 g (Lues *et al.*, 1998; Ong y Shah, 2009). En dichos quesos el ácido acético es considerados como un compuesto con importancia sobre su sabor, tal y como describe Fox *et al.* (1993) y Smit *et al.* (2005) para el queso Cheddar. Por el contrario, en el queso Mozzarella, las concentraciones de ácido acético descritas, en concordancia con lo observado en el queso Oaxaca, fueron más bajas. Califano y Bevilacqua (1999) en el queso Mozzarella de baja humedad encontraron cantidades no cuantificables de ácido acético (trazas) y Mullin y Emmons (1997) entre cantidades traza de 80 mg/100 g.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto y teniendo en cuenta las bajas cantidades encontradas en el queso Oaxaca, se puede indicar que probablemente las principales LAB responsables de la fermentación

de este queso produjeron poco acetato y/o no utilizar los citratos como fuente de energía; hecho que, junto con la lixiviación de ácido acético durante el malaxado en agua, explicaría la baja concentración de este ácido en el queso.

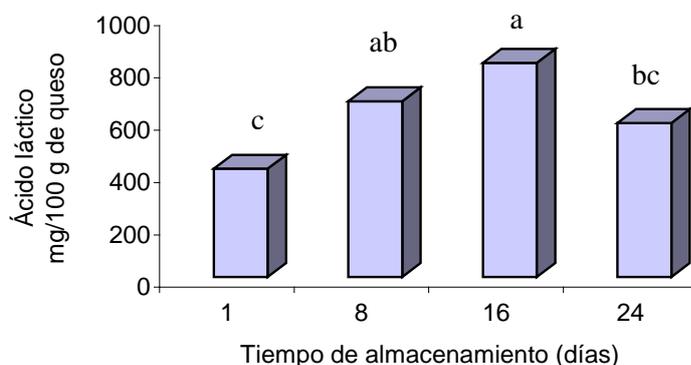


Fig. 3.15. Evolución del contenido de ácido láctico del queso Oaxaca almacenado a 8°C. ^{a,b,c} Los valores medios de las barras con ninguna letra diferente presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

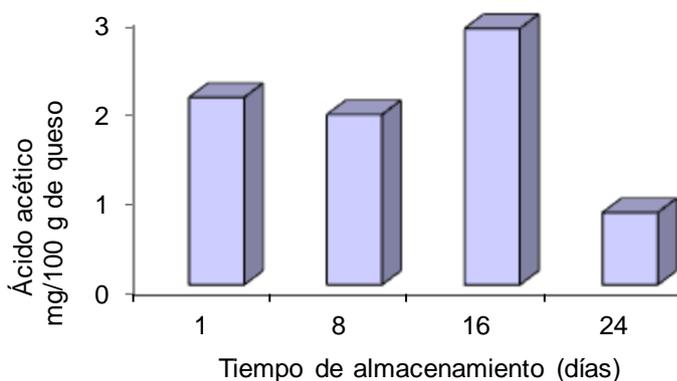


Fig. 3.16. Evolución del contenido de ácido acético del queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

3.3.3.3. Evolución del contenido de ácidos grasos libres

En la Figura 3.17 se muestra la evolución del contenido de ácidos grasos libres (AGL) totales durante los 24 días de almacenamiento del queso Oaxaca. Se observó que el promedio de AGL totales se mantuvo constante en el tiempo ($P > 0,05$). El contenido medio de AGL totales en el queso Oaxaca estuvo entorno a los 500 mg por cada kg de queso. El EEM fue de 21,43.

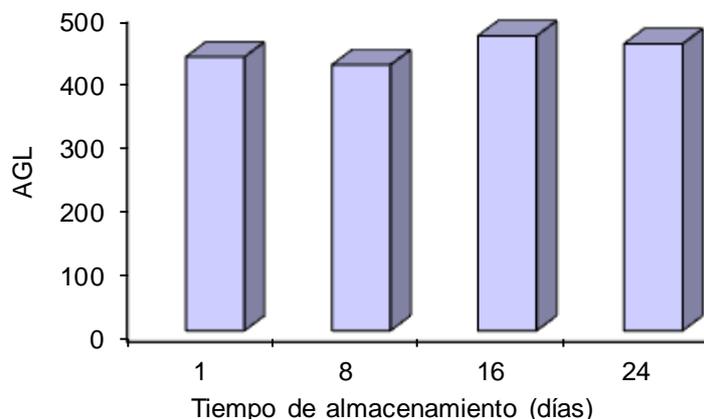


Fig. 3.17. Evolución en el contenido de ácidos grasos libres (AGL) expresados como porcentaje sobre grasa, en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

La hidrólisis de los lípidos es un fenómeno bioquímico importante que ocurre durante la elaboración, almacenamiento y maduración del queso y es causado por enzimas lipolíticas (Collins *et al.*, 2003; Deeth y Touch, 2000). Estas enzimas tienen su origen en la leche, el coagulante, los cultivos iniciadores y/o a la microflora no perteneciente a los cultivos iniciadores (Deeth y Fitz-Gerald, 1995; Fox y Wallace, 1997; McSweeney y Sousa, 2000). Los ácidos grasos liberados por la lipólisis contribuyen directamente al sabor del queso (Woo y Lindsay, 1984), principalmente los ácidos grasos de cadena corta y mediana (Bill y Day, 1964). También, a partir de los ácidos grasos libres y por el catabolismo de los mismos se genera una variedad de compuestos volátiles con efecto en el sabor (Molimard y Spinnler, 1996). En la revisión de Collins *et al.* (2003) hay información sobre las cantidades de AGL en numerosos tipos de queso. Se puede apreciar como los quesos que típicamente son sometidos a una larga maduración presentaron contenidos elevados de AGL, mientras que los quesos de corta maduración mostraron valores inferiores.

En ese contexto, los niveles de AGL encontrados en el queso Oaxaca fueron similares a los descritos para los quesos Mozzarella, Colby y Brick, todos ellos de corta maduración, que, a su vez, fueron los quesos con los menores niveles de AGL entre todos los recogidos en dicha

revisión (Collins *et al.*, 2003). Por este motivo se puede decir que la lipólisis en el queso Oaxaca fue moderada debido a su relativamente baja concentración de AGL. Teniendo en cuenta la repercusión de los AGL sobre el sabor de los quesos, se podría afirmar que el efecto de los mismos sobre el aroma del queso Oaxaca sería poco marcado. Esta afirmación se respalda con lo expresado por Villanueva-Carvajal *et al.* (2012), quienes mencionan que el queso Oaxaca no desarrolla sabores de tipo madurativo; sin embargo, a pesar de esto, los mencionados autores mantienen que el perfil de sabor de este queso podría ser reconocido por consumidores habituales.

En relación con los cambios en la cantidad de AGL durante el almacenamiento del queso, en concordancia con lo encontrado en el presente estudio, Woo y Lindsay (1984) tampoco encontraron cambios apreciables en las concentraciones de AGL durante el almacenamiento del queso Mozzarella hasta un total de 4 meses, a 2°C, ni tampoco a 7°C. La ausencia de incremento en los niveles de AGL puede atribuirse, al menos parcialmente, a la baja temperatura de almacenamiento de los quesos, que enlentece el crecimiento microbiano, así como las actividades de las lipasas endógenas y microbianas. En este sentido, Melilli *et al.* (2004) encontraron que durante 24 días de almacenamiento del queso Ragusano (también de “pasta filata”) en salmuera a 12 y 15°C, el incremento en la cantidad de AGL fue poco acusado y mucho menor al observado en dicho queso cuando el almacenamiento tuvo lugar a temperaturas superiores de 18 a 24°C. Adicionalmente, la baja lipólisis observada en el queso Oaxaca durante su almacenamiento podría atribuirse a la pérdida de enzimas durante el malaxado debido a la lixiviación y a la inactivación térmica de ciertas lipasas, como las lipasas endógenas de la leche. No obstante, respecto esto último, hay que tener en cuenta que algunas lipasas microbianas son termoestables (Fox *et al.*, 1993).

En las Figuras 3.18 a 3.23 se muestra el contenido de los principales AGL (C10:0, C14:0, C16:0, C18:0 y C18:1). Al igual que lo observado con el contenido total de AGL, estos ácidos considerados individualmente no mostraron cambios significativos durante el

almacenamiento. Los ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico, caproico y caprílico) no se muestran en el presente trabajo porque no pudieron ser detectados con el método utilizado para la medición de AGL. Los ácidos grasos mayoritarios en orden de abundancia fueron: C18:0, C18:1, C14:0, C16:0, C12:0 y C10:0. La cantidad de ácido cáprico (C10:0) estuvo entorno a 16 mg/kg de queso, el EEM en el análisis de varianza fue de 0,94. La cantidad de ácido laúrico (C12:0) fue aproximadamente de 22 mg/kg de queso, con un EEM de 1,06. Los niveles de ácido mirístico (C14:0) fueron de 70 mg/kg de queso aproximadamente, con un EEM de 3,66. El ácido palmítico (C16:0) fue el mayoritario con niveles de unos 200 mg/kg y con un EEM de 17,3. Las cantidades de ácido esteárico (C18:0) fueron de 70 mg/kg g de queso aproximadamente y el EEM fue de 6,80. Finalmente, el ácido oleico (C18:1) mostró valores de 100 mg/kg, con un EEM de 4,96.

El orden de abundancia y los porcentajes obtenidos en los AGL concuerdan, en cierta medida, con el orden de abundancia y porcentajes de la grasa de la leche (Mansson, 2008). En este sentido, Bill y Day (1964) y Wong *et al.* (1972) mencionan que la proporción de ácidos grasos libres del queso son a grandes rasgos similares a los de la grasa de la leche, siendo el C16:0, C18:1, C18:0 y C14:0 los más abundantes por este orden. No se detectaron en el queso Oaxaca ácidos grasos libres poliinsaturados, debido presumiblemente a su baja concentración (inferior a la del límite de detección), ya en el queso Oaxaca hubo poca lipólisis y estos ácidos grasos están en pequeña concentración en la grasa de la leche. Woo y Lidsay, (1984) tampoco detectaron estos ácidos en el queso Mozzarella, aunque sí se detectan en quesos con mayor lipólisis (Collins *et al.*, 2003).

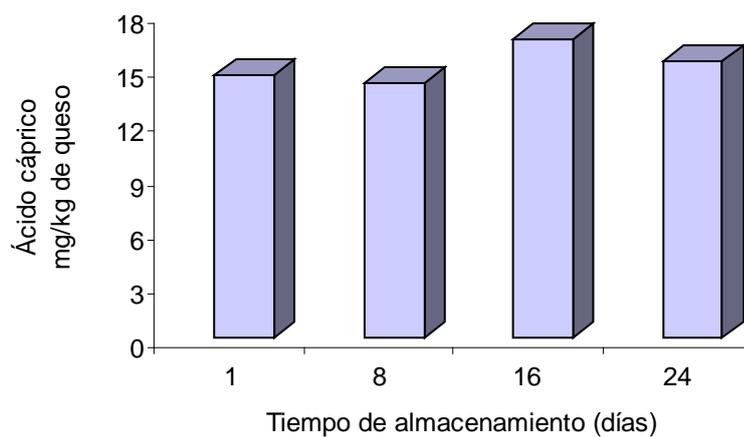


Fig. 3.18. Evolución del contenido del ácido cáprico (C10:0) del queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

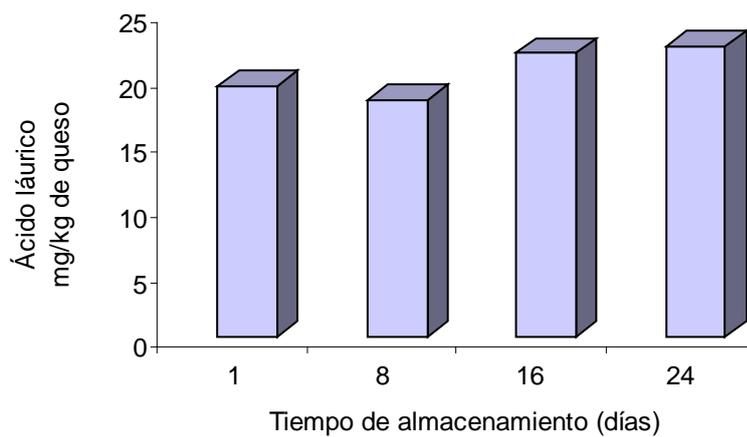


Fig. 3.19. Evolución del contenido del ácido láurico (C12:0) en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

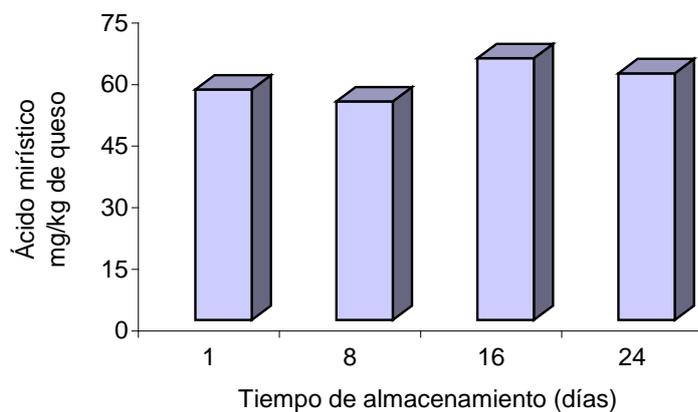


Fig. 3.20. Evolución del contenido de ácido mirístico (C14:0) en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

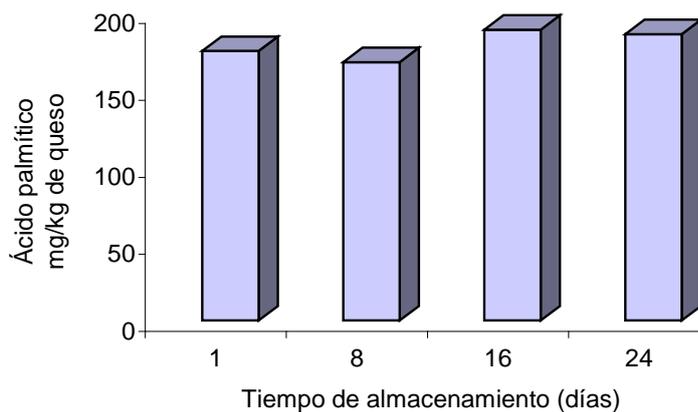


Fig. 3.21. Evolución del contenido de ácido palmítico (C16:0) en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

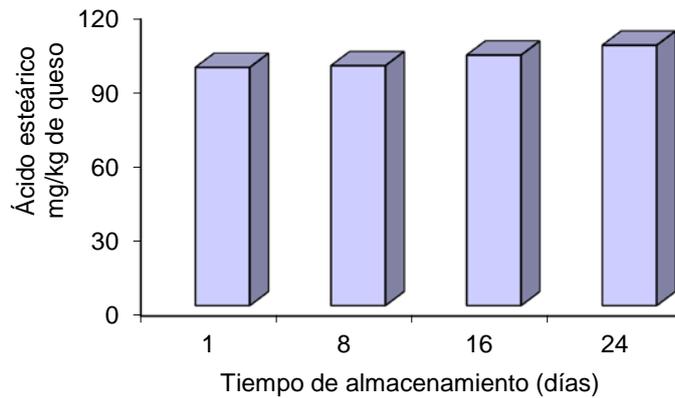


Fig. 3.22. Evolución en el ácido esteárico (C18:0) en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

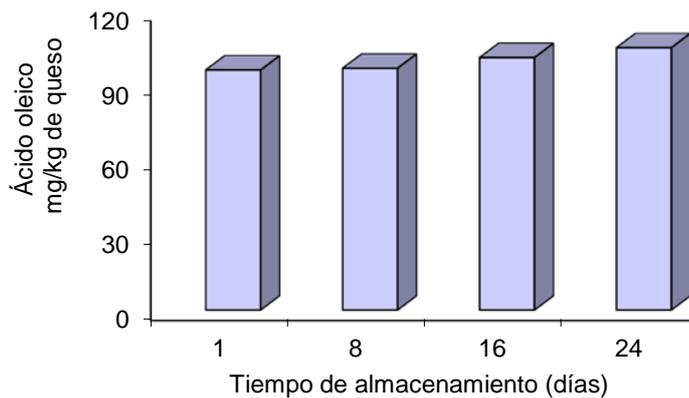


Fig. 3.23. Evolución en el contenido de ácido oleico (C18:1) en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

3.3.3.4. Evolución del contenido de nitrógeno no proteico y de nitrógeno soluble en agua

El contenido de nitrógeno no proteico (NNP) en el queso Oaxaca estuvo entorno a 5,6% sobre nitrógeno total (NT) (Figura 3.24). El EEM fue de 0,04. La evolución del contenido en NNP en el queso Oaxaca no mostró cambios estadísticamente significativos. En la Figura 3.25 se muestra la evolución del nivel de nitrógeno soluble en agua (NS_a), que tampoco cambió significativamente a lo largo del almacenamiento del

queso Oaxaca. El contenido medio de NS_a fue de 12,98 expresado como porcentaje sobre NT, con un EEM de 0,07.

La hidrólisis de las proteínas es probablemente el fenómeno bioquímico más importante con efecto sobre las propiedades funcionales y textura del queso (Fox y McSweene, 1996; Upadhyay *et al.*, 2004; Ayyash y Shah, 2010). Este fenómeno tiene lugar durante el almacenamiento de la leche, su coagulación y la maduración del queso y pueden tener origen en la propia leche, el coagulante o los microorganismos que intervienen en su elaboración. La proteólisis cursa con un aumento en las fracciones nitrógenadas de bajo peso molecular y aumento en la proteína soluble en agua (Fox, 1989; Fox y McSweene, 1996; Upadhyay *et al.*, 2004). Los niveles de NNP y NS_a son considerados como índices del grado de proteólisis en el queso (Sousa y Malcata, 1997).

En discordancia con lo encontrado en el presente estudio, los niveles de NNP notificados por Kindstedt *et al.* (1995) y Rudan *et al.* (1998) en el queso Mozzarella mostraron un incremento durante la maduración del queso, de forma que estuvieron en torno a 0,9–1,1% de NNP sobre NT en los primeros días de almacenamiento a 4°C y fueron de 3,8–5,5 a los 45 y 60 días de almacenamiento. También Yazici *et al.* (2010) describieron que aunque no hay cambios en los niveles de NNP en los primeros días de almacenamiento, si ocurren posteriormente. Igualmente, Kindstedt *et al.* (1995), Rudan *et al.* (1998), Ayyash y Shah (2011) describen como en el queso Mozzarella almacenado a 4°C se observa un incremento en los niveles NS_a a partir de los primeros días de almacenamiento que se acentuó a los 50 días.

Farkye *et al.* (1991) indicaron que el incremento en NNP durante el almacenamiento de los quesos era causado principalmente por el coagulante residual; sin embargo, otros autores (Creamer, 1976; Matheson, 1981; Law, 1987; Lawrence *et al.*, 1987) describen que las altas temperaturas de malaxado desactivan enzimas proteolíticas como la quimosina, la pepsina y ciertas proteasas fúngicas y vegetales procedentes del cuajo (Steffen *et al.*, 1993; Kindstedt *et al.*, 1995; Yazici *et al.*, 2010). Yazici *et al.* (2010) indicaron que el incremento en los

valores de NNP observado tras unos días de almacenamiento del queso Oaxaca podría deberse a la acción de la plasmina al ser un enzima termoestable. Por otra parte, varios autores (Barbano *et al.*, 1992; Fox y Sweeney, 1996; Sousa *et al.*, 2001; Upadhyay *et al.*, 2004) describen que el incremento en NNP y NS_a con el tiempo también puede deberse a las proteasas de los microorganismos del cultivo iniciador y otros microorganismos que no proceden de los cultivos, pero que también estén presentes en el queso.

Teniendo en cuenta lo anteriormente dicho, el estancamiento en los niveles de NNP observado durante el almacenamiento del queso Oaxaca tal vez sea debido a fenómenos de desnaturalización de las proteasas o peptidasas durante el malaxado y/o a las condiciones de almacenamiento (baja temperatura y corto periodo de tiempo). La escasa extensión de la proteólisis en el queso Oaxaca se puede considerar como favorable en cuanto a que la proteólisis afecta a la textura (Kindsedt, 1993b; Fox y McSweeney, 1996; Ayyash y Shah, 2011). De esta forma, al no haber proteólisis se mantiene mejor la textura original y por tanto la integridad de las correas, la aptitud para el deshebrado y la dureza del queso sin fundir.

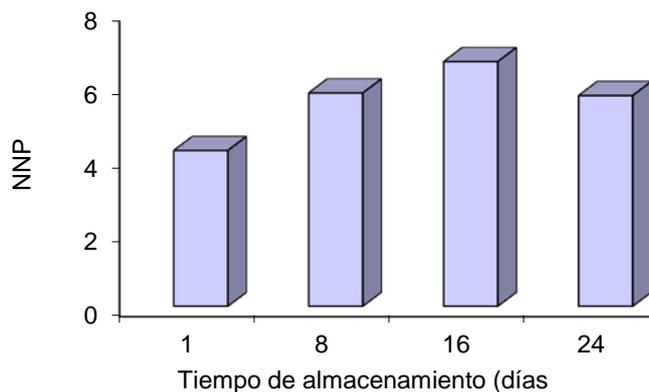


Fig. 3.24. Evolución en el contenido de nitrógeno no proteico (NNP) expresado como porcentaje sobre nitrógeno total en el queso Oaxaca a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

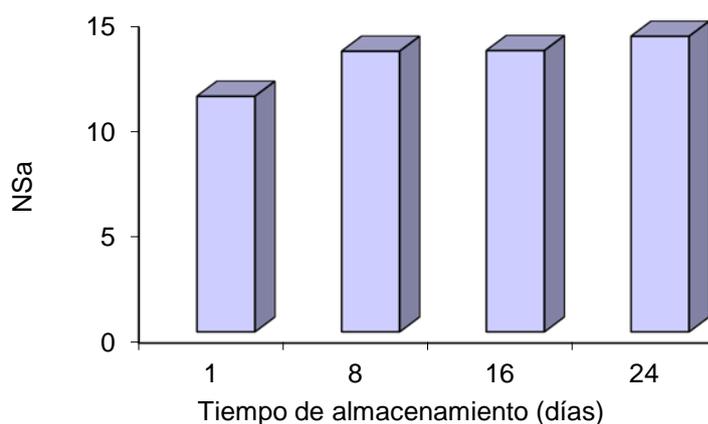


Fig. 3.25. Evolución en el contenido de nitrógeno soluble en agua (NSa) expresado como porcentaje sobre nitrógeno total en el queso Oaxaca a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

3.3.3.5 Evolución del contenido de nitrógeno aminoacídico

El contenido de nitrógeno aminoacídico ($\alpha\text{-NH}_2\text{-N}$) se observa en la Figura 3.26. Según puede observarse, los niveles de esta característica, expresados como g/100 g de NT, en el queso Oaxaca, no experimentaron cambios significativos con el tiempo de almacenamiento. El EEM fue de 0,04. Esta característica es otro índice de proteólisis, ya que ésta genera aminoácidos libres y pequeños péptidos como productos finales. No se pueden comparar los datos del presente estudio con otros estudios sobre queso Oaxaca o Mozzarella porque hasta donde hemos podido constatar no ha sido objeto de estudio el conocer el contenido, ni los cambios del $\alpha\text{-NH}_2\text{-N}$ en los mismos.

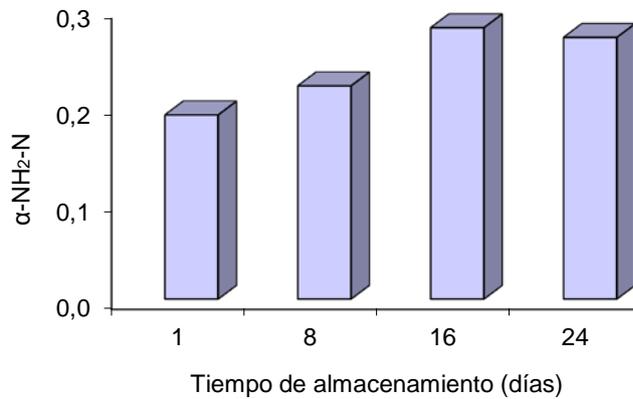


Fig. 3.26. Evolución en el contenido de nitrógeno aminoacídico (α -NH₂-N), expresado como porcentaje sobre nitrógeno total en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

3.3.3.6. Evolución del pH

En la Figura 3.27 se muestra la evolución del pH a lo largo de los 24 días de almacenamiento en el queso Oaxaca. Los valores de pH permanecieron constantes entre los días 1 y 8 y descendieron significativamente a partir del día 16. El error estándar de la media para (EEM) del análisis de varianza fue de 0,02. El descenso significativo de pH entre los días 1 y 16 de almacenamiento, se puede asociar al aumento de ácido láctico entre esos días, que fue descrito anteriormente.

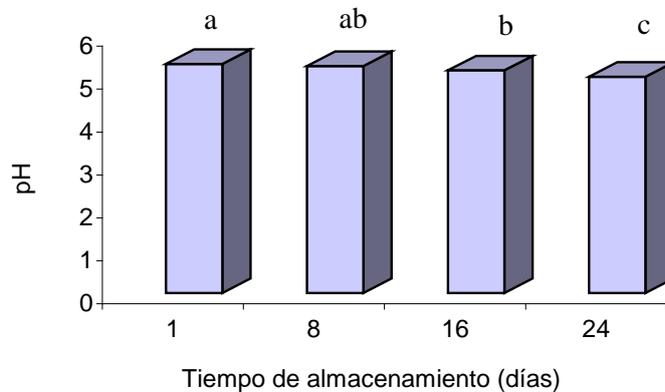


Fig. 3.27. Evolución en el pH en el queso Oaxaca a 8°C. ^{a,b,c} Valores medios de las barras con ninguna letra diferente presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

3.3.4. Variación cuantitativa de las propiedades funcionales de los quesos durante su almacenamiento a refrigeración

Las propiedades funcionales de los quesos (aptitud de fluir y estirar de la masa de queso fundida, color, textura, etc.) están influenciadas por la composición y pretratamientos de la leche utilizada para su elaboración, los procedimientos de fabricación y las condiciones de almacenamiento o maduración (Lucey *et al.*, 2003). Uno de los factores más importantes que influyen en estas propiedades es la estructura de las caseínas, que viene dada por las interacciones intra e inter moleculares, la cantidad de Ca asociada con estas partículas o el grado de proteolisis. Características tales como el pH, la temperatura y la fuerza iónica, tienen influencia sobre la estructura proteica y, por lo tanto, juegan un importante papel en la definición de las propiedades físicas del queso (Kindstedt, 1991, 1993b; McMahon *et al.*, 1993; Rowney *et al.*, 1999; Guinee, 2002; Lucey *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en los análisis de las propiedades funcionales se muestran en la Tabla 3.8. de forma conjunta y en las Figuras 3.28 a 3.38 de forma individual.

Tabla 3.8. Cambios en las características funcionales del queso Oaxaca durante su almacenamiento a vacío y 8°C

	Días de almacenamiento			
	1	8	16	24
<i>Color antes del cocinado</i>				
<i>L*</i>	87,05 ± 1,03 ^a	87,03 ± 1,09 ^a	83,08 ± 2,39 ^b	79,61 ± 1,92 ^c
<i>a*</i>	1,08 ± 0,37 ^b	2,08 ± 0,57 ^a	1,99 ± 0,74 ^a	1,89 ± 0,74 ^a
<i>b*</i>	19,43 ± 0,73 ^b	25,13 ± 3,50 ^a	23,39 ± 2,52 ^a	21,67 ± 0,39 ^{ab}
<i>Textura antes del cocinado</i>				
Dureza (N)	29,57 ± 2,73 ^a	30,63 ± 2,11 ^a	23,38 ± 2,74 ^{ab}	16,16 ± 4,22 ^b
Elasticidad	0,80 ± 0,01 ^a	0,69 ± 0,04 ^a	0,64 ± 0,04 ^{ab}	0,59 ± 0,03 ^b
Cohesividad	0,33 ± 0,02	0,34 ± 0,06	0,30 ± 0,03	0,27 ± 0,01
Adhesividad (N.s)	12,59 ± 8,74	20,77 ± 9,01	25,13 ± 21,32	42,69 ± 10,48
<i>% de extensión</i> ¹	5,57 ± 0,33 ^a	14,81 ± 2,70 ^b	32,66 ± 5,25 ^c	45,87 ± 8,58 ^d
<i>Color despues del cocinado</i>				
<i>L*</i>	82,35 ± 0,89 ^a	74,94 ± 4,20 ^{ab}	67,67 ± 3,06 ^{bc}	60,41 ± 2,67 ^c
<i>a*</i>	0,93 ± 0,56	0,90 ± 0,40	1,19 ± 1,35	1,49 ± 0,32
<i>b*</i>	23,45 ± 1,98	22,72 ± 2,52	23,36 ± 2,52	24,50 ± 0,90

^{a-c} Los promedios en la misma fila con diferente superíndice mostraron diferencias significativas (P <0,05).

¹ Porcentaje de incremento en el área de los discos del queso durante el fundido respecto al área inicial.

3.3.4.1. Evolución del color

En la Figura 3.28 se muestra la evolución de la luminosidad (*L**) del queso Oaxaca no fundido durante los 24 días de almacenamiento a 8°C. El índice de luminosidad del queso al día siguiente de la elaboración estuvo entorno a 87,5, posteriormente, hasta el día 16, el índice mostró un ligero descenso, aunque no significativo, y a partir del día 16 disminuyó significativamente hasta llegar a un valor de alrededor de 80. El EMM fue de 0,65. La Figura 3.29 muestra la evolución del parámetro *a** del queso Oaxaca durante el almacenamiento. El primer día, *a** estuvo en torno a 1,07, posteriormente se incrementó a 2,08 para después mantenerse sin

diferencias significativas hasta el final del almacenamiento. El incremento inicial fue estadísticamente significativo ($P < 0,05$). El EMM fue de 0,18. También se observaron cambios en el valor de b^* durante la primera parte del almacenamiento del queso Oaxaca, de forma que hubo un incremento significativo entre los días 1 y 8 ($P < 0,01$; Fig. 3.30). Posteriormente, no se observaron cambios significativos. El EEM fue de 0.93.

El color de los quesos es la consecuencia de la reflexión, absorción y transmisión de la luz que incide sobre los mismos. De forma importante, el color del queso viene dado por el color de la leche y la cantidad de grasa (Carpino *et al.*, 2004). Adicionalmente, la estructura física de la matriz proteica y de los glóbulos grasos afectan también al color (Rudan *et al.*, 1998). De esta forma, el color del queso es en cierta manera específico para cada variedad de queso (Kaya, 2002). Como ejemplo, los valores de L^* , a^* y b^* encontrados en tres quesos frescos o de corta maduración fueron, respectivamente los siguientes: 86, -9 y 24 para queso Mozzarella de baja humedad (Sheehan *et al.*, 2005); 84, -8 y 27 para queso Havarti (Kristensen *et al.*, 2000) y 81, -8 y 29 para queso Samsø (Juric *et al.*, 2003). Los valores de a^* de esos quesos presentaron diferencias considerables con los del queso Oaxaca, que mostró valores entorno a 1-2. No obstante, Rudan *et al.* (1998) encontraron valores de a^* positivos, cercanos a 1, en queso Mozzarella bajo en grasa. Los valores de los índices del color obtenidos en el queso Oaxaca recién elaborados coinciden con los determinados en este mismo queso en un estudio previo en el que se analizaron 11 quesos de otros tantos elaboradores (Caro *et al.*, 2014).

El valor L^* está relacionado positivamente con lo blanco que es un queso (Rudan *et al.*, 1998). El descenso del valor de L^* durante el almacenamiento del queso Oaxaca (disminución de su blancura) está en concordancia con lo encontrado por varios autores en queso Mozzarella bajo en grasa (Metzger *et al.*, 2001; Rudan *et al.*, 1998; Sheehan *et al.*, 2005). Estos autores atribuyeron el descenso de L^* a cambios a la estructura proteica (grado de hidratación de la proteína y grado de proteólisis) y a la concentración de solutos en el suero del queso, como por ejemplo los péptidos y otras sustancias nitrogenadas solubles

generadas por proteolisis. Estos cambios producen una menor dispersión de la luz por parte de la estructura proteica y una mayor interacción (absorción) entre la luz y la grasa y sustancias disueltas en la fase acuosa.

Al igual que lo observado en este estudio, el moderado incremento en el valor de a^* (aproximadamente una unidad) durante la primera parte del almacenamiento seguido de un estancamiento también ha sido descrito en queso Mozzarella bajo en grasa (Rudan *et al.*, 1998). Sin embargo, estos autores no encontraron cambios significativos en el valor de b^* (amarillo) del queso durante su almacenamiento, mientras que en el queso Oaxaca sí que se observó un incremento. Sheehan *et al.* (2005) no encontraron cambios ni en a^* ni en b^* durante el almacenamiento (75 días) del queso Mozzarella bajo en grasa. En cualquier caso, en el queso Oaxaca los cambios en los índices a^* y b^* (incrementos) podrían estar en cierta medida relacionados entre sí y con los cambios en L^* (descenso), aunque a este respecto los primeros dos índices cambiaron al inicio del almacenamiento y el último al final. También es factible que los cambios en el color puedan ser atribuidos al menos parcialmente a los cambios en el pH (L^*) o al hecho de envasar al vacío y las consecuencias que puede traer el cambio de atmósfera que lleva implícito (a^* y b^*).

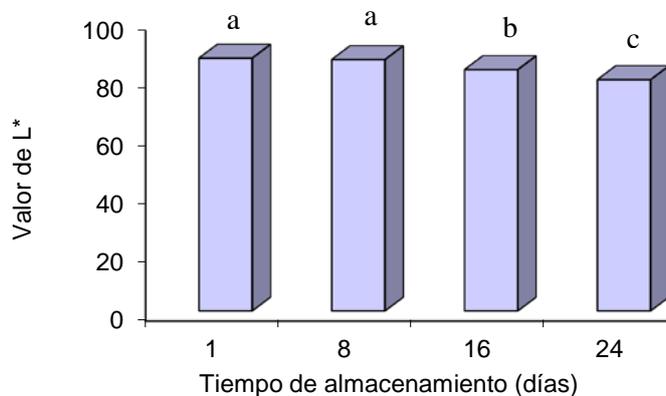


Fig. 3.28. Evolución de L^* (luminosidad) en el queso Oaxaca almacenado 8°C. ^{a,b,c} Valores medios de las barras con ninguna letra diferente presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

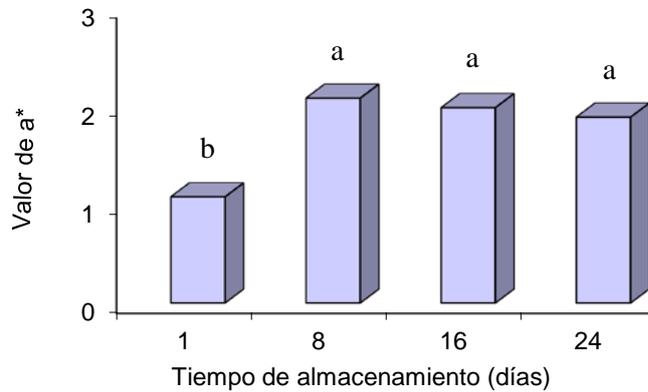


Fig. 3.29. Evolución de a* (índice rojo-verde) antes en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. ^{a,b} Valores medios de las barras con ninguna letra diferente presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

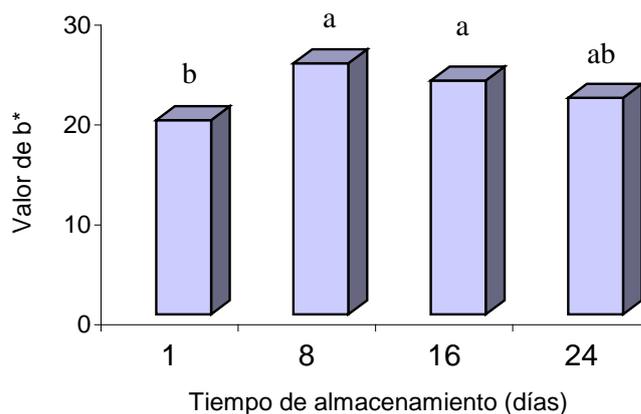


Fig. 3.30. Evolución de b* (índice amarillo y azul) antes del fundido en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. ^{a,b} Valores medios de las barras con ninguna letra diferente presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

3.3.4.2. Evolución de la textura

En términos físicos, el queso es un material viscoelástico y todas sus características estructurales se traducen en una combinación de propiedades reológicas medibles (Steffe *et al.*, 1996). Las diferentes variedades de queso tienen una amplia gama de valores en sus características estructurales, que son atribuibles a variaciones en los

correspondientes procesos de elaboración y que afectan a las propiedades funcionales (Oberg *et al.*, 1991; Oberg *et al.*, 1992 y Yun *et al.*, 1993a,b) y sensoriales (van Vliet, 1999) de los quesos. La estructura del queso y por tanto su textura cambia con el tiempo de almacenamiento debido a diversos fenómenos como la proteólisis, el descenso de humedad, el cambio de pH, la captación de sal o la hidratación de proteínas (Akkerman *et al.*, 1989; Luyten *et al.*, 1991; Luyten y van Vliet, 1996 y Zoon y Allersman, 1996).

La dureza del queso Oaxaca (fuerza máxima de deformación) durante el almacenamiento a 8°C se muestra en la Figura 3.31. Se observaron valores de fuerza de 29,57 N al día siguiente a la elaboración. Estos valores permanecieron constantes hasta el día 8 de almacenamiento, momento en el cual comenzó a descender, observándose diferencias significativas entre los días 8 y 24 ($P < 0,05$), siendo dureza final del queso de 16,12 N. El EEM fue de 2,22. Al igual que la dureza, la elasticidad disminuyó durante el almacenamiento del queso Oaxaca (Figura 3.32), con un descenso significativo entre los días 8 y 24 (EEM de 0,016). La evolución de la cohesividad (Figura 3.33) mostró una tendencia descendente con el tiempo, pero las diferencias no fueron significativas ($P > 0,05$); el EEM de análisis de varianza fue de 0,03. Finalmente, la evolución de la adhesividad (Figura 3.34) mostró un progresivo aumento (en valores absolutos), que se vió reflejado en una tendencia estadística ($P = 0,10$). Para este parámetro hubo una variación considerable entre los quesos de las tres fábricas muestreadas, tal y como se puede deducir por el elevado EEM del análisis de varianza: 81,1.

En un estudio previo donde también se determinó la textura del queso Oaxaca con la misma metodología, se encontraron valores comparables a los del presente estudio: 25 N para la fuerza, 0,80 para la elasticidad, 0,50 para la cohesividad (Caro *et al.*, 2014). No obstante, se ha de tener en cuenta que la comparación de los valores del perfil de textura de los quesos entre estudios es compleja, principalmente debido a que las condiciones de medida pueden no ser coincidentes (tamaño de la muestra, fuerza de compresión, etc.).

La composición de los quesos de “pasta filata” afecta a su textura. En un estudio previo sobre queso Oaxaca (Caro *et al.*, 2011) se ha descrito cómo la composición de la leche afectó al perfil de textura del queso, de forma que los valores de dureza y elasticidad aumentaron y los de adhesividad disminuyeron cuando el queso contuvo menos grasa. Respecto al queso Mozzarella, diversos estudios han mostrado que el perfil de textura del queso estuvo relacionado con varios factores entre los que cabe señalar la humedad (Kindstedt *et al.*, 1995; Yun *et al.*, 1993b), las interacciones proteína-proteína debidas al calcio (Metzger *et al.*, 2001), la cantidad de grasa, así como el tamaño y la distribución de las gotitas de lípidos (Van Hekken *et al.*, 2007).

Respecto a la evolución de la textura con el tiempo de almacenamiento, en concordancia con lo observado el presente estudio, otros trabajos sobre el queso Mozzarella también describen el descenso en los valores de dureza, elasticidad y cohesividad (Effendi *et al.*, 1992; Kindstedt *et al.*, 1995; Tunick *et al.*, 1991; Yun y Barbano, 1992 y 1993ab; Rudan *et al.*, 1999; Imm *et al.*, 2003). Estos cambios indican una transformación progresiva en la estructura proteica, de forma tal que el queso va cambiando de una textura más sólida a una más fluida y viscosa (Kindstedt, 1993b). Este cambio empeora la propiedad funcional de fibrosidad y desmenuzado y hace al queso más blando.

Kindsted (1993b) relaciona claramente el decremento de la dureza y de los otros parámetros durante el almacenamiento con la actividad proteasa desarrollada en el queso. En el caso del queso Oaxaca, donde no pudo ser evidenciada una proteólisis significativa habría que buscar otros factores para explicar el descenso de su dureza y su elasticidad durante el almacenamiento. En este sentido, un factor a tener en cuenta es el descenso de pH observado durante el almacenamiento del queso Oaxaca (Fig. 3.27). Flourey *et al.* (2009) explican que el papel del pH en la textura del queso es particularmente importante, porque los cambios en el pH están directamente relacionados con los cambios químicos en la estructura de las micelas de caseína. Estos autores describen como un menor pH en el queso trae consigo una menor dureza y elasticidad. Estos cambios se relacionan con una mayor liberación de Ca y P de la micela,

así como a una reducción de las cargas negativas de las caseínas a menor pH (Dalglish y Law, 1989; Watkinson *et al.*, 2001). Otra causa posible del ablandamiento y pérdida de elasticidad sería el aumento en el grado de hidratación de las caseínas, que se incrementa con el tiempo (Lucey y Fox, 1993; Luyten y van Vliet, 1996; McMahon *et al.*, 1999).

McMahon *et al.* (2005) y Paulson *et al.* (1998) describieron que con el tiempo se incrementaba la adhesividad de los quesos. Esto mismo se ha observado en el queso Oaxaca. Esos autores atribuyen este cambio en la adhesividad al descenso de pH que, a su vez, reduce el contenido de Ca en las micelas. De esta manera, las proteínas se desdoblán y sus grupos funcionales están más disponibles para interactuar con otras superficies. La proteína con menor contenido de Ca presenta más sitios hidrófobos que pueden impartir un mayor grado de flexibilidad y facilidad de interacción con las superficies.

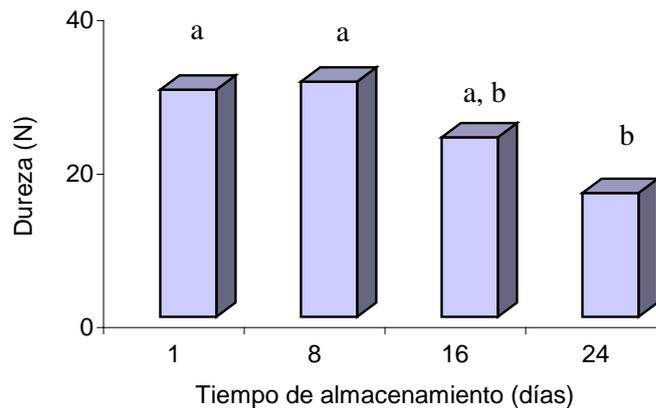


Fig. 3.31. Evolución en la dureza en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. ^{a,b,c} Valores medios de las barras con ninguna letra diferente presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

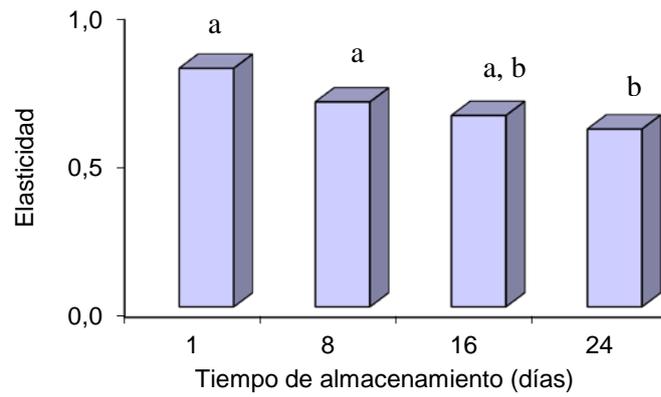


Fig. 3.32. Evolución en la elasticidad en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. ^{a,b,c} Valores medios de las barras con ninguna letra diferente presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

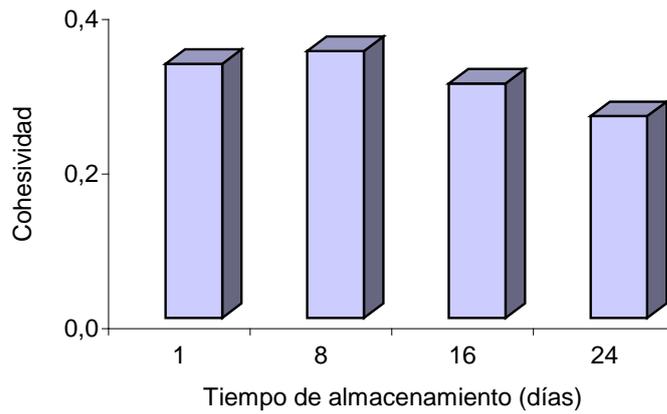


Fig. 3.33. Evolución en la cohesividad en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

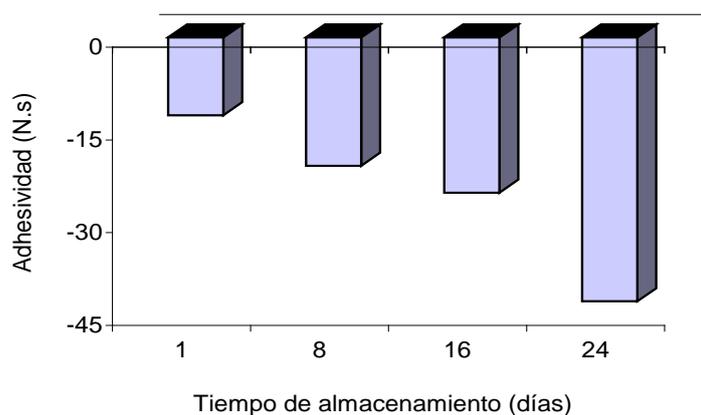


Fig. 3.34. Evolución en la adherencia en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

3.3.4.3. Evolución de la capacidad de extensión del queso durante el fundido

En la Figura 3.35 se recoge la evolución del porcentaje de extensión del queso Oaxaca durante su fundido. La extensión del queso experimentó un progresivo incremento ($P < 0,05$). La extensión al día siguiente de la elaboración estuvo entorno al 5% llegando a ser de 40% después de 24 días. El EEM fue de 2,06.

Kindstedt (1993a) define al fundido del queso como la formación de una masa de queso uniforme y continua con características de fluido, como consecuencia del incremento en su temperatura. McMahon *et al.* (1999) explican que este fenómeno ocurre cuando el agua del queso es absorbida dentro de la matriz proteica, incrementando la hidratación de las proteínas y permitiendo así que la estructura proteica del queso fluya cuando éste se calienta, extendiéndose sobre la superficie donde esté apoyado. La grasa del queso juega un papel importante en dicha extensión (Tunick *et al.*, 1991). En un trabajo previo con queso Oaxaca (Caro *et al.*, 2011), se observó como la extensión del queso de tres días de almacenamiento estuvo en el rango de 18%-54%, en función del contenido en grasa, de forma que la cantidad de grasa estuvo

positivamente relacionada con la extensión del queso en el fundido. Además de la grasa, la extensión del queso en el fundido puede estar relacionada con los valores de humedad y NaCl (Wang *et al.*, 1998), pH y Ca (Lawrence *et al.*, 1987; Ma *et al.*, 2011).

En el presente estudio, el tiempo de almacenamiento fue fundamental para el desarrollo del fundido (Fig. 3.35). El incremento en la extensión del queso durante el fundido a lo largo de su almacenamiento también ha sido descrito en el queso Mozzarella (Kindstedt, 1993b; Yun *et al.*, 1993ab). Estos autores explican que a partir de la primera o segunda semana de almacenamiento del queso en refrigeración, el fundido del queso mejora, adquiriendo un aspecto deseable, suave, homogéneo, moderadamente elástico y estirable. El efecto del tiempo sobre el fundido se ha explicado principalmente por la progresivo debilitamiento (o reducción) de las interacciones proteína-proteína en la matriz proteica del queso, consecuencia de la actividad proteolítica (McMahon *et al.*, 1999). De esta forma, al inicio del almacenamiento, los quesos tienen menor extensión en el fundido, porque a pesar del calentamiento, las interacciones entre las moléculas de proteína son relativamente fuertes y mantienen estable la matriz proteica, por lo que el queso se resiste a fluir. Sin embargo, después de un tiempo de almacenamiento, principalmente debido a la proteólisis, la matriz proteica pierde integridad y el queso fluye más fácilmente cuando se calienta.

McMahon *et al.* (1999) resumieron la influencia de la composición del queso y del tiempo de almacenamiento sobre el fundido del queso Mozzarella de la siguiente manera: la extensión del fundido puede ser considerada como la combinación de dos efectos principales, 1) el contenido de grasa y humedad 2) las interacciones proteína-proteína y 3) las interacciones entre proteínas y el agua atrapada dentro de la matriz proteica.

Comparando la extensión en el fundido observada en el queso Mozzarella comercial bajo en humedad (Guinee *et al.*, 2000b) con la del queso Oaxaca, la del queso Mozzarella fue más acusada. De acuerdo a lo anteriormente expuesto, la diferencia en el fundido entre ambos quesos se puede atribuir a diferencias en la composición (humedad y grasa) y en

el grado de proteólisis entre los dos tipos de queso (como se vio la proteólisis fue muy baja en el queso Oaxaca). Cabe mencionar que la extensión en el fundido es una propiedad funcional de gran importancia en el queso Mozzarella bajo en grasa, destinado en gran medida a la elaboración de pizzas. Sin embargo, en el queso Oaxaca consideramos que más que valorarse la extensión en el fundido, lo que se valora por los consumidores es la propiedad de estiramiento de la masa fundida de queso; es decir, la capacidad del queso para formar hebras largas, lisas y sin romperse (comunicación personal, productores de queso Oaxaca).

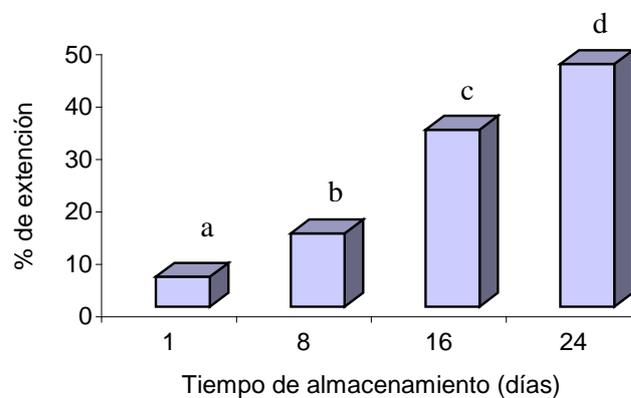


Fig. 3.35. Evolución en el % de extensión en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. ^{a,b,c} Valores medios de las barras con ninguna letra diferente presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

3.3.4.4. Evolución de color del queso fundido

En la Figura 3.36 se muestra la evolución de la luminosidad (L^*) del queso Oaxaca calentado (fundido), determinado en diversos días de almacenamiento a 8°C, observándose un descenso significativo con el tiempo. El EMM fue de 2,5. En la Figura 3.37 se muestra la evolución del parámetro a^* del queso Oaxaca fundido a distintos tiempos de almacenamiento. Hubo una tendencia estadística $P=0,10$ hacia el incremento, siendo el incremento inferior a una unidad. El EMM fue de 0,32. En la Figura 3.38 se muestra la evolución del parámetro b^* del queso Oaxaca fundido durante su almacenamiento. No se observaron

cambios apreciables ($P > 0,05$) en el valor b^* del queso Oaxaca fundido. El EMM fue de 0,83.

El color del queso Oaxaca fundido ha sido estudiado en un trabajo previo (Caro *et al.*, 2011) en el que se determinó la influencia de la composición de la leche y la temperatura de cocinado sobre esa característica sensorial. Los resultados obtenidos en dicho estudio arrojaron valores de L^* inferiores (50-67), lo que probablemente se deba a diferencias metodológicas en el tiempo de cocinado (4 min a 280°C en el presente estudio y 20 min a temperatura máxima de 200°C en el anterior). Imm *et al.* (2003) encontraron en queso Mozzarella cocinado a 240°C durante 2 min, valores similares de L^* a los del presente estudio, aunque a^* (-4,3) y b^* (17,4) fueron más bajos que los vistos en el presente estudio. El color del queso Mozzarella fundido depende de factores relacionados con la composición de la leche (Imm *et al.*, 2003; Rudan *et al.*, 1998; Zisu y Shah, 2005), las condiciones de procesado, la maduración y el almacenamiento (Oberg *et al.*, 1991; Zisu y Shah, 2005), además de la temperatura y tiempo de cocinado (Metzger *et al.*, 2001).

Comparando los valores de L^* del queso antes de fundir con los del queso fundido, los primeros fueron más elevados. La disminución de L^* asociada al calentamiento ha sido descrita en un trabajo previo (Caro *et al.*, 2011). Esta disminución podría explicarse por la pérdida de humedad en el queso durante el cocinado y a la reorganización de la estructura del queso durante su enfriamiento tras el fundido (mayor tamaño de las partículas de grasa o cambio en las interacciones proteicas; Metzger *et al.*, 2001). En el día 1 del almacenamiento el valor de a^* del queso Oaxaca fundido fue similar al obtenido en el queso sin fundir (Fig. 3.29), mientras que b^* fue ligeramente superior en el queso fundido que en el queso sin fundir (Fig. 3.30). Normalmente, los valores de a^* y b^* son mayores en los quesos fundidos que en el queso antes de su fundido y tienden a incrementar cuanto más intenso es el calentamiento (Matzdorf *et al.*, 1994; Caro *et al.*, 2011). Este incremento se ha asociado a la reacción de Maillard (Kindstedt, 1993b; Tunick *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos en el queso Oaxaca en el presente trabajo (escaso incremento de a^* y b^*) indican que hubo un leve pardeamiento durante el

cocinado, lo que concuerda con los bajos niveles de azúcares residuales y escasa actividad proteolítica detectada en el queso durante su almacenamiento. También hay que tener en cuenta para explicar el escaso cambio en el color, la relativamente baja intensidad del calentamiento a la que se sometió el queso para su fundido, ya que el pardeamiento se desarrolla en función de la misma.

Por otra parte, el almacenamiento de los quesos Oaxaca provocó un descenso progresivo en la luminosidad del queso cocinado. El descenso en el valor de L^* de los quesos cocinados asociado al tiempo de almacenamiento ha sido también observado en el queso Mozzarella (Imm *et al.*, 2003; Rudan *et al.*, 1998). Las causas de este descenso serían en cierta medida las mismas que las explicadas para el descenso de L^* en el queso no cocinado. En el queso Mozzarella también se han observado cambios en el valor a^* y b^* (asociados al grado de desarrollo de la reacción de Maillard) durante el almacenamiento, que se han relacionado con la reacción entre de azúcares y nitrógeno α -amínico (Kindstedt, 1993b; Imm *et al.*, 2003). En el queso Oaxaca, los azúcares y el nitrógeno α -amínico no varían de forma significativa con el tiempo de almacenamiento, por lo que no debería esperarse cambios en a^* y b^* . Consecuentemente, el valor de b^* no mostró cambios; sin embargo, el valor de a^* incrementó de forma moderada con el tiempo de almacenamiento, no pudiéndose atribuir una causa concreta a este incremento. El moderado cambio de a^* y la ausencia de cambio en b^* con el almacenamiento podrían justificarse por la escasa extensión de la proteólisis observada en este estudio.

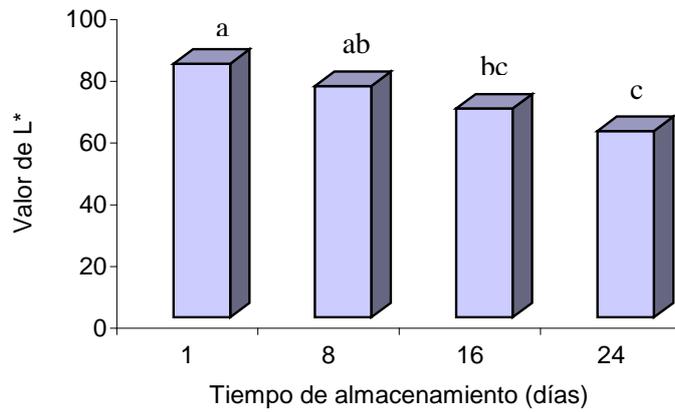


Fig. 3.36. Evolución de L^* (luminosidad) en el queso Oaxaca almacenado a 8°C después de su cocinado. ^{a,b,c} Valores medios de las barras con ninguna letra diferente presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

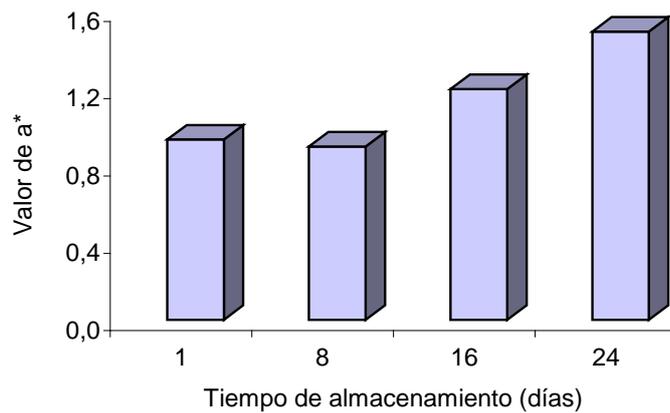


Fig. 3.37. Evolución de a^* (índice de rojo-verde) en el queso Oaxaca almacenado a 8°C después de su cocinado. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

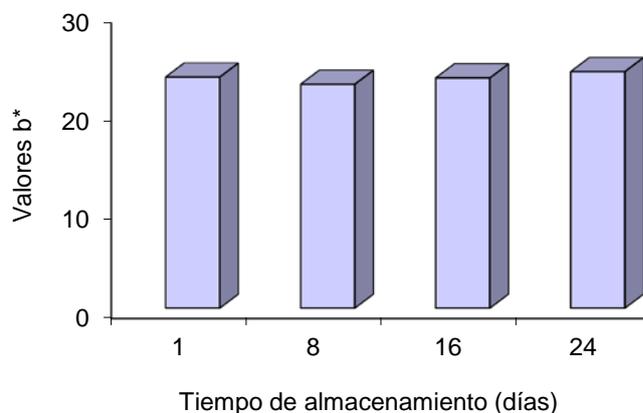


Fig. 3.38. Evolución de b^* (índice de amarillo-azul) en el queso Oaxaca almacenado a 8°C después de su cocinado. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

3.3.5. Variación cuantitativa de la calidad sensorial de los quesos durante su almacenamiento a refrigeración

Los cambios en la calidad sensorial del queso Oaxaca durante su almacenamiento se muestran de forma resumida en la Tabla 3.9. y en las Figuras 3.39 a 3.45 se recogen los datos para cada una de las características determinadas en el estudio.

Tabla 3.9. Cambios en las características sensoriales del queso Oaxaca durante su almacenamiento a vacío y 8°C

	Días de almacenamiento			
	1	8	16	24
Olor a queso	4,87 ± 0,73	4,80 ± 0,21	4,55 ± 0,25	4,34 ± 0,58
Olor a leche ácida	4,20 ± 0,32	4,33 ± 0,36	4,16 ± 0,15	3,81 ± 0,12
Olor a Mantequilla	4,06 ± 0,25	4,14 ± 0,13	3,90 ± 0,43	3,80 ± 0,79
Sabor ácido	4,35 ± 0,06	3,93 ± 0,72	4,36 ± 0,69	4,78 ± 0,71
Sabor amargo	3,32 ± 0,61	3,76 ± 0,82	4,66 ± 1,01	4,37 ± 1,24
Textura fundente	3,67 ± 0,11	3,52 ± 0,42	4,36 ± 0,58	4,30 ± 0,80

Rechazo (%) ¹	0 ^d	6 ^c	36 ^b	81 ^a
--------------------------	----------------	----------------	-----------------	-----------------

^{a-d} Los promedios en la misma fila con diferente superíndice mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$).

¹ Porcentaje de muestras analizadas, dentro de cada día de almacenamiento, que fueron encontradas por los evaluadores como inaceptables con respecto a su sabor y/o textura.

3.3.5.1. Aroma y gusto

El sabor de una variedad de queso es el resultado de un complejo equilibrio entre los compuestos químicos volátiles y no volátiles (Fox y Wallace, 1997; Plutowska y Wardencki, 2007). En general se acepta que el perfil volátil se relaciona con el olor y el aroma de los quesos. La mayoría de los compuestos aromáticos de los quesos se forman durante la fermentación y maduración.

Las principales vías para la formación de los compuestos volátiles son: 1) el metabolismo de la lactosa, 2) la lipólisis y 3) la proteólisis (Molimard y Spinnler, 1996). La primera vía comprende el sabor ácido del queso, relacionado con su pH (Gallardo-Escamilla *et al.*, 2005). También incluye el olor a mantequilla, que viene dado principalmente por el diacetilo (2,3-butanodiona) (Villaseñor *et al.*, 2000), al que se considera como el principal compuesto aromático de la leche fermentada y queso fresco (Molimard y Spinnler, 1996; Curioni y Bosset, 2002; Garde *et al.*, 2005). Este compuesto se forma en el queso por el metabolismo microbiano, principalmente por algunas BAL, especialmente *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* (Kaneko *et al.*, 1990), con habilidad para fermentar el citrato. La segunda vía genera compuestos derivados de la grasa formados por la lipólisis y las reacciones de oxidación de los lípidos, tales como los ácidos grasos libres, los ésteres, las lactonas y las cetonas, con umbrales de percepción olfativa muy bajos (Siek *et al.*, 1971; Kinsella, 1975). Por último, la proteólisis proporciona una gama de péptidos y aminoácidos libres, lo que probablemente contribuye al gusto de la mayoría de las variedades de queso. El gusto amargo, se atribuye principalmente a la acumulación de péptidos que contienen prolina liberados de la caseína (Guinee y Kilcawley, 2004 y Wadhvani y McMahon, 2012) ocasionada por las reacciones proteolíticas, catalizadas

por los enzimas coagulantes o microbianas (Yazici *et al.*, 2010). Además de su influencia en el gusto, los aminoácidos libres son precursores importantes de compuestos volátiles formados por una serie de reacciones catabólicas (McSweeney y Sousa, 2000).

En el presente trabajo se han evaluado los cambios en el olor (característico a queso, a leche ácida, a mantequilla,) y el gusto (ácido y amargo) del queso (Figuras 3.39-3.43, respectivamente). Las puntuaciones obtenidas presentaron valores entre 3 y 6, en una escala de 9. Durante el almacenamiento, aunque los valores medios del olor a mantequilla y a queso mostraron cierta propensión al descenso y el olor a leche ácida y el amargor una tendencia de aumento; sin embargo, los cambios no fueron significativos. La ausencia de cambios significativos tal vez se pueda relacionar con la escasa actividad fermentativa, lipolítica y proteolítica observada en el queso durante su almacenamiento.

Existe un trabajo reciente donde se estudiaron las características sensoriales del queso Oaxaca recién elaborado (Villanueva-Carbajal *et al.*, 2012) que concluye que el sabor del queso Oaxaca es característico y podría ser reconocido por los consumidores habituales de este queso. Los descriptores utilizados en ese estudio en cuanto al sabor fueron: sabor 'a leche ácida', 'a mantequilla', 'a nata', 'a establo', 'a moho', 'a grasa', 'a leche quemada', 'a humo' y 'a leche pasteurizada'. Las puntuaciones de los sabores 'a leche quemada' y 'a humo' fueron en general bajas, lo que restaría importancia a estos dos descriptores. Por lo tanto, se observa cierta coincidencia entre los descriptores empleados en el presente estudio y los más relevantes empleados por los anteriormente mencionados autores en aquel estudio para evaluar sensorialmente el queso Oaxaca. A su vez los descriptores utilizados en ese y este trabajo, ambos sobre queso Oaxaca, muestran coincidencia con los empleados por Pagliarini *et al.* (1997) y Gasperi *et al.* (2000) en el queso Mozzarella italiano: sabores 'a leche', 'a nata', 'a yogur', 'agrio', 'a aceituna', y sabores dulce, ácido y salado. Considerando los cuatro estudios, las notas 'a nata', 'a leche fermentada' y los sabores ácido y salado fueron los mayoritariamente utilizados para la descripción del olor y sabor de esos dos quesos de "pasta filata" (Mozzarella y Oaxaca).

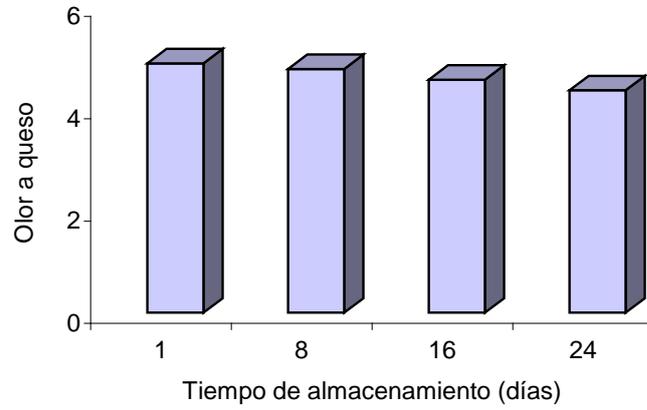


Fig. 3.39. Evolución del olor característico a queso en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

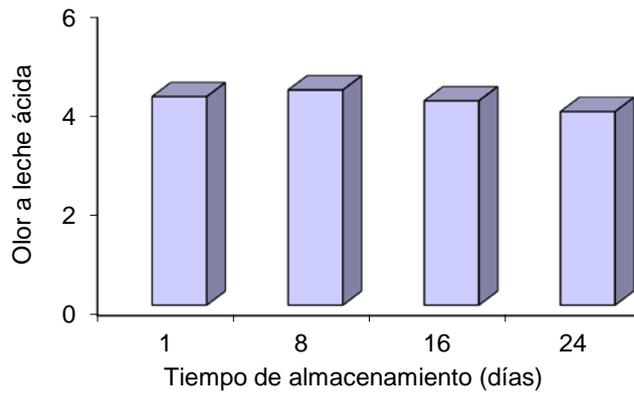


Fig. 3.40. Evolución olor a leche ácida en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

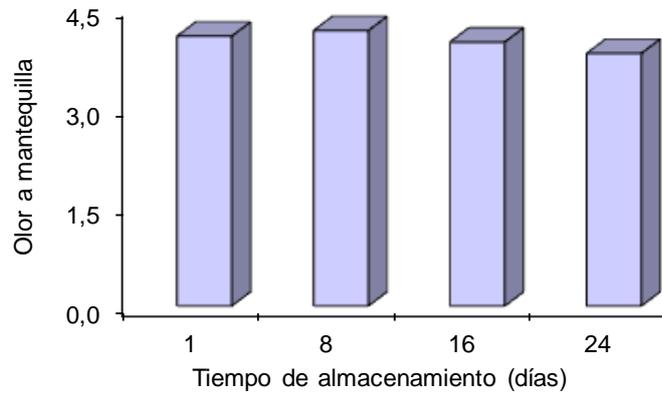


Fig. 3.41. Evolución del olor a mantequilla en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P<0,05$).

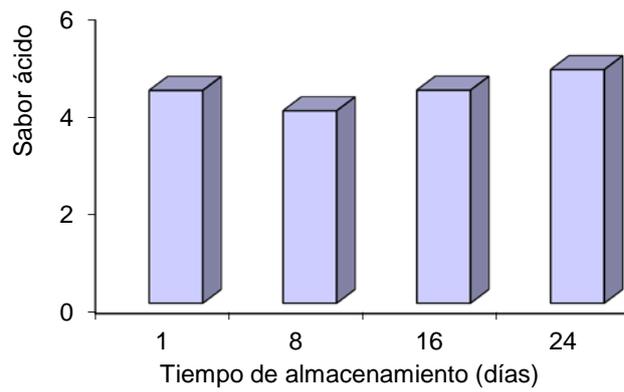


Fig. 3.42. Evolución del sabor a ácido en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P<0,05$).

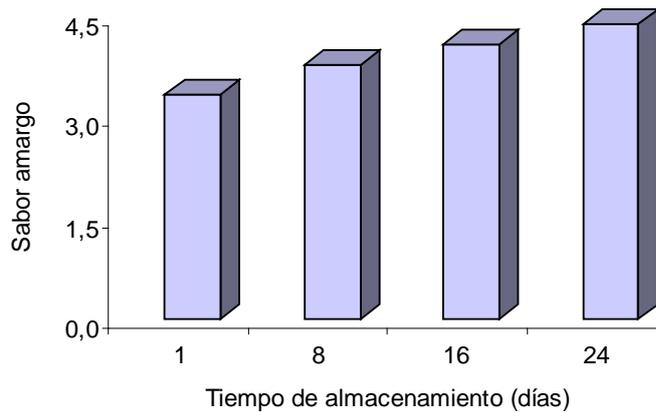


Fig. 3.43. Evolución del sabor amargo en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

3.3.5.2. Textura (sensación fundente-pastosidad)

En la Figura 3.44 se muestran los resultados del atributo de textura fundente para las muestras de queso estudiadas a lo largo del almacenamiento. Se puede observar que no existieron diferencias ($P > 0,05$) en el carácter fundente debidas al tiempo de almacenamiento, a pesar de que los valores medios fuesen más elevados al final que al principio del almacenamiento. Este resultado presenta cierta contradicción con los resultados del análisis de perfil de textura, donde sí que se observaron cambios (descenso) en la dureza y elasticidad del queso Oaxaca durante su almacenamiento. En esta tesitura, la dureza y elasticidad del queso pareciera no estar relacionada con la sensación fundente.

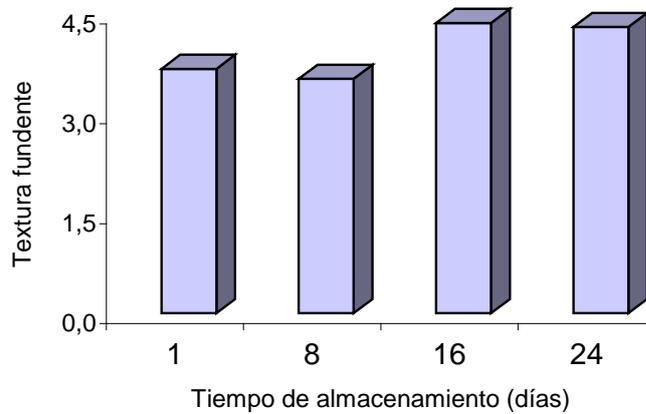


Fig. 3.44. Evolución de la textura fundente en boca en el queso Oaxaca almacenado a 8°C. No hubo diferencias significativas debidas al tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

3.3.5.3. Aceptabilidad del queso

A pesar de que no se observaron cambios significativos en los descriptores de olor y gusto anteriormente mencionados, ni en la sensación fundente en boca del queso Oaxaca durante su almacenamiento a 8°C, la aceptabilidad del queso sí que se vio fuertemente afectada por el tiempo de almacenamiento. A los 24 días de almacenamiento la gran mayoría de catadores rechazaron sensorialmente los quesos Oaxaca estudiados por considerarlos como no aptos para su comercialización debido a su olor y/o textura. El porcentaje de catadores que rechazaron el queso Oaxaca durante el almacenamiento se muestra en la Figura 3.45. No se observó rechazo alguno al día siguiente a la elaboración del queso, el porcentaje de quesos rechazados fue muy bajo en el día 8 y en el día 16 experimentó un incremento significativo (cercano al 40% del número total de pruebas sensoriales realizadas), llegando casi al 100 % en el día 24. En opinión de los catadores el queso almacenado durante largo tiempo adquiere un olor atípico, con tonos a estiércol, y la textura se hace blanda y arenosa, que hace que el queso sea rechazado.

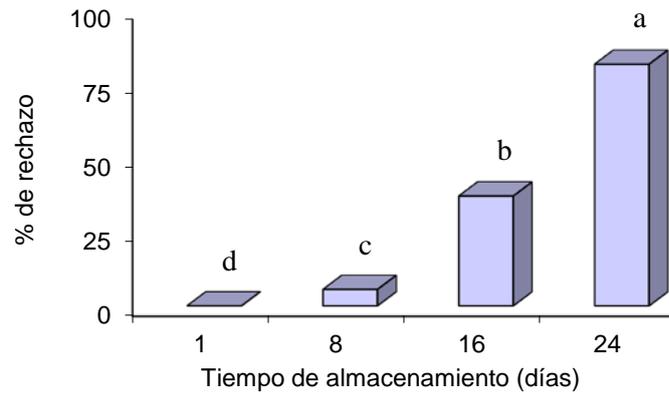


Fig. 3.45. Evolución del % de rechazo para la comercialización del queso Oaxaca almacenado a 8°C. ^{a,b,c} Valores medios de las barras con ninguna letra en común presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la prueba de Tukey.

CAPÍTULO 4

CAPÍTULO 4. TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y TECNOLÓGICAS DE LAS BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS DEL QUESO OAXACA ELABORADO CON LECHE CRUDA

4.1. Introducción

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) han desempeñado y desempeñan un papel esencial en la fabricación y conservación de numerosos productos alimenticios fermentados. El interés de las LAB en la fabricación industrial de los alimentos actualmente se centra en especies pertenecientes a seis géneros principalmente: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* y *Streptococcus*, algunos de los cuales se encuentran a menudo en los productos lácteos (Klaenhammer *et al.*, 2002; Ray y Bhunia, 2013).

En la producción de queso, las BAL son responsables fundamentalmente de la acidificación de la leche y de la cuajada, pero también juegan un papel relevante en la modificación del sabor y la textura del queso, así como en la inhibición de los microorganismos patógenos y alterantes (Leroy y De Vuyst, 2004; Lahtinen *et al.*, 2012; Ray y Bhunia, 2013). En este contexto, un gran número de estudios se han enfocado a la caracterización e identificación de las BAL en los quesos (Randazzo *et al.*, 2008), ya que el conocimiento de las características de las BAL presentes en los mismos es esencial para la comprensión de su contribución en el proceso de producción y la calidad de los quesos.

Actualmente, la mayor parte de las técnicas disponibles para la identificación de las BAL se basa en técnicas de biología molecular (Temmerman *et al.*, 2004; Jany y Barbier, 2008). Una de las metodologías más comunes y rápidas utilizadas en la clasificación y la identificación bacteriana en los productos lácteos es la secuenciación parcial o total de RNA ribosómico del gen 16S (RNAr) (Temmerman *et al.*, 2004; Adimpong *et al.*, 2012). Esta técnica se basa en la similitud o grado de coincidencia en la secuencia amplificada

entre diferentes individuos, y es un indicador de la variación de sus genomas. En general, a efectos prácticos, utilizando cebadores adecuados, si dos organismos presentan una secuencia del gen *16S RNA* con similitud inferior al 97%, están poco relacionadas a nivel genómico y, por lo tanto, pertenecen a especies diferentes, mientras que si los valores de identificación son más altos de 97% se puede considerar que están estrechamente relacionadas, asumiéndose su pertenencia a la misma especie (Felis y Dellaglio, 2007; Vetrovsky y Baldrian, 2013).

Las BAL (cantidad y variedad) presentes en los quesos son diferentes para los diferentes tipos de este producto lácteo y, dentro de cada tipo, entre diferentes plantas de fabricación y lotes del producto. En esta variación son determinantes ciertos factores como la especie animal de la que se obtiene la leche, las condiciones de ordeño y de manipulación de la leche o el proceso de elaboración de queso. En los quesos elaborados con leche cruda las BAL del género *Lactococcus* spp. suelen ser las dominantes en los primeros días de maduración, mientras que en etapas posteriores las BAL de los géneros *Lactobacillus* spp. llegan a ser predominantes (Cogan *et al.*, 1997). Las BAL del género *Enterococcus* spp también son abundantes en los quesos y, a veces, son las predominantes del principio al final del proceso de maduración (Sarantinopoulos *et al.*, 2001; Giraffa, 2003). Su presencia es especialmente elevada cuando las medidas higiénicas durante la obtención de leche y/o la elaboración de queso son deficientes. Las BAL del género *Leuconostoc* spp. se aíslan de los quesos con menor frecuencia que las de los géneros anteriormente mencionados. Es posible que su presencia en los quesos sea menor, aunque también pueden influir otros factores en su menor porcentaje de aislamiento, como por ejemplo, que los medios de cultivo existentes específicos para este género tienen poca selectividad y, por otra parte, las bacterias pertenecientes a *Leuconostoc* spp. tienen unas necesidades de nutrientes más compleja que la de las otras BAL (Jodan y Cogan, 1993).

Refiriéndonos ahora a la variedad de quesos de 'pasta filata' elaborados con leche cruda y de corta maduración se ha detectado en los mismos la presencia predominante de cepas de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. Como especies más representativas cabe mencionar *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus*

delbrueckii, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus helveticus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus faecium* (Morea *et al.*, 1998; Coppola, *et al.*, 2001; De Angelis *et al.*, 2006). En el queso recién elaborado, los recuentos iniciales de BAL suelen ser relativamente bajos, del orden de 5-7 log UFC/g, debido a la termodestrucción bacteriana producida por el calentamiento al que se somete la cuajada en el proceso de malaxado (Kindstedt, 1993). No obstante, una cantidad considerable de BAL soporta el tratamiento térmico, en particular los géneros y/o especies que tienen propiedades termodúricas. Posteriormente, la concentración y población de BAL varía a medida que transcurre el tiempo de maduración o almacenamiento (Villani *et al.*, 1991). Es frecuente observar un incremento en las BAL asociado a un aumento relativo en la población de los lactobacilos (Papademas y Robinson, 2000; Gobbetti *et al.*, 2002; Piraino *et al.*, 2005).

Uno de los fines principales del estudio de las BAL en los quesos elaborados con leche cruda es seleccionar cepas que debido a sus características peculiares demuestren un potencial para ser utilizadas como cultivos iniciadores o como adjuntas de los mismos. De esta forma se pretende, mediante el uso adecuado de esas cepas, la elaboración de quesos con leche pasteurizada con características similares a las de los quesos elaborados con leche cruda. El estudio de dicho potencial, es decir, de la aptitud de las cepas seleccionadas para la obtención de queso en un tiempo adecuado y con las características de calidad deseadas, se conoce como caracterización tecnológica. Por otra parte, las cepas que vayan a ser consideradas para su uso en los cultivos iniciadores (estárter) deben cumplir con dos requisitos fundamentales: la producción de ácido de forma rápida y la generación de un sabor y aroma apropiado (Leroy y De Vuyst, 2004). Además, de acuerdo con Early (1998), no deben presentar factores de virulencia o algún rasgo que suponga un peligro posible para la salud (presencia de resistencia frente a sustancias antimicrobianas, antibióticos entre otras, que puedan ser transferidas a bacterias patógenas presentes de modo ocasional en la flora intestinal, producción de aminas biógenas, etc.), tienen que tener características bioquímicas/enzimáticas (fermentación de azúcares, proteólisis y lipólisis) ajustadas a lo deseado en el queso, deben desarrollarse bien en las

condiciones ambientales del queso (tolerancia a la sal, resistencia a temperaturas de cocción, etc.), y así mismo, sería conveniente que mostraran habilidad para competir con la microflora no deseada y que tuviesen una elevada resistencia a la contaminación con fagos. Consecuentemente, se ha desarrollado una serie de metodologías de aplicación en los laboratorios de microbiología encaminadas a la caracterización tecnológica de las BAL, con el fin de determinar su capacidad acidificante, capacidades proteolíticas y lipolíticas, producción de CO₂ y de otros compuestos volátiles, actividades enzimáticas para la fermentación de azúcares o actividad antimicrobiana (Herrero *et al.*, 1996).

4.2. Material y métodos

4.2.1. Aislamiento de bacterias ácido-lácticas durante el proceso de elaboración del queso

4.2.1.1 Toma de muestras de leche, cuajada y queso

Para realizar este estudio, en primer lugar, se obtuvieron muestras de leche, de cuajada y de queso en 3 industrias artesanales ubicadas en el Valle de Tulancingo, Hidalgo, que elaboran queso Oaxaca con leche cruda. En cada una de las industrias se procedió a la toma de muestras en dos días distintos de elaboración. Se recogieron las muestras de las etapas consideradas clave para la elaboración del queso Oaxaca: a) leche fresca (LF) en el momento de la recepción de la misma; b) leche ácida (LA) cuando se iba a adicionar el cuajo en la leche destinada a la elaboración de queso (leche con una acidez entre 18 - 20°D); c) cuajada ácida (CA), es decir, cuajada en el momento inmediatamente anterior al malaxado (cuajada con un pH entre 5,2-5,4; y d) queso (Q), consistente en queso recién elaborado (en el mismo día de su fabricación), a las pocas horas después del malaxado y salado, cuando se dio forma de madeja a las correas. Las muestras fueron recogidas en frascos (leche) o bolsas de plástico (cuajada y queso) estériles. La cantidad de muestra recogida fue de 250 ml para la LF y la LA y de 500 g para la CA y el Q. Las

muestras fueron transportadas y almacenadas a una temperatura de 4°C hasta el momento de su análisis que no superó las 4 horas.

4.2.1.2. Recuentos

Se tomó una alícuota de 10 ml de las muestras líquidas (LF y LA), una vez homogenizadas por agitación, y se realizaron diluciones decimales utilizando como diluyente una solución salina peptonada estéril con 0,1% (p/v) de peptona (Difco, Reino Unido) y un 0,85% (p/v) de NaCl (Prolabo, Barcelona, España). En el caso de las muestras sólidas (CA y Q) se depositó en una bolsa estéril 10 g de muestra y 90 ml de diluyente (solución salina estéril descrita anteriormente). El conjunto se homogeneizó durante 2 min en un Stomacher (Seward stomacher 80, Reino Unido). A partir de esta dilución (10^{-1}) y se realizaron diluciones decimales sucesivas, que se sembraron por duplicado en alícuotas de 1 ml en los medios sólidos utilizados para el recuento y aislamiento de las BAL.

En particular, los recuentos de *Lactobacillus* spp. se realizaron por siembra en profundidad en agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS; Oxoid, Ltd., Basingstoke, Reino Unido) acidificado con ácido láctico (Panreac, Barcelona, España) a un pH de 5,5. Una vez sembrado y solidificado el medio se adicionó a la placa una sobrecapa del mismo medio para obtener condiciones de anaerobiosis. Las placas se incubaron a 30°C durante 48-72 h. Los recuentos de *Lactococcus* spp. se realizaron por la técnica de siembra en profundidad en agar M17 (Oxoid). Las placas se incubaron a 30 °C durante 48-72 h (Fox *et al.*, 2000).

4.2.1.3. Aislamiento y caracterización taxonómica inicial

Para cada punto de muestreo, industria muestreada y día de muestreo, de las placas con crecimiento utilizadas para los recuentos se aislaron al azar dos-tres colonias de de cada uno de los medios de cultivo (agar MRS y M17). Las colonias aisladas se sembraron en caldo triptona de soja (TSB, Bacto, Mt Printchard, Australia) con 0.5% (p/v) de extracto de levadura (Difco), que fue incubado a 30°C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, 1 ml de cada tubo de

ensayo se introdujo en un tubo *Eppendorf* y se sometió a centrifugación a 12,000 rpm durante 3 min (Centrifuga modelo 5414, *Eppendorf*, Hamburgo, Alemania). Posteriormente, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de caldo MRS (Oxoid) con glicerol (Acofarma, Barcelona, España) al 50% (v/v). Los aislamientos se mantuvieron a -40°C hasta su posterior precaracterización taxonómica. La precaracterización de las presuntas BAL se llevó a cabo mediante las pruebas de tinción de Gram y actividad catalasa, de forma que aquellas cepas que fueron Gram positivas y catalasa negativas fueron seleccionadas para su posterior identificación y caracterización tecnológica.

Para la recuperación de las cepas aisladas (antes de proceder a la precaracterización), los tubos *Eppendorf* con las cepas aisladas se descongelaron a temperatura ambiente, se tomaron 100 µl del contenido, que se añadieron a 5 ml de caldo MRS adicionado con 0.5% (p/v) de extracto de levadura, siendo la mezcla incubada a 30°C durante 24 h. Para evaluar la pureza del cultivo inicial, con un asa de siembra estéril se inoculó una alícuota del caldo en agar MRS siguiendo el método de siembra por estría cruzada en placa, buscando la homogeneidad macroscópica de las colonias. En caso necesario (colonias no homogéneas), el proceso se repitió a partir de una colonia de las estrías con morfología y color típicos de BAL (tamaño, forma y color).

Una vez comprobada la pureza del aislamiento, de la placa de MRS con el crecimiento en estrías se tomó una colonia con un asa de cultivo y se sembró en otra placa de agar MRS por el método de agotamiento, incubándose a 37°C por 48 h. Transcurrido este tiempo se tomó una colonia de esa nueva placa, se colocó en un portaobjetos y se le agregó una gota de peróxido de hidrogeno (30%, p/v; Merck, Barcelona, España) previamente diluido al 3% (v/v). La actividad catalasa se detectó por la aparición inmediata de burbujas al reaccionar este enzima con el peróxido de hidrogeno (Cowan y Steel, 1999). A partir de otra colonia, se realizó la tinción por el método de Gram (Harrigan, 1998). Finalmente, una tercera colonia se sembró en caldo TSB (Bacto) con 0,5% (p/v) de extracto de levadura (Difco), que fue incubado a 37°C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, 1 ml del caldo se introdujo en un tubo *Eppendorf* y se sometió a centrifugación a 12,000 rpm durante 3 min, se retiró el

sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de caldo MRS (Oxoid) con glicerol (Acofarma) al 50% (v/v). Estos aislamientos puros se mantuvieron a -40°C hasta su posterior identificación y caracterización.

4.2.2. Identificación genética de las cepas aisladas

4.2.2.1. Extracción del DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo a partir de las cepas precaracterizadas como BAL. Se partió de los aislamientos conservados en MRS-glicerol. Se tomaron 100 µl de la mezcla (constituida por inóculo más caldo MRS más glicerol, ver apartado 4.2.1.3) y se sembraron en caldo TSB (Bacto) con 0,5% (p/v) de extracto de levadura (Difco), incubando a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se tomó 1 ml del caldo y se sometió a centrifugación a 12.000 rpm durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante y al residuo resultante se le añadieron 100 µl de una solución de lisis que contenía tris HCl 20 mM a pH 8,3 (T-1503; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), cloruro potásico 50 mM (Sigma-Aldrich), cloruro de magnesio 1,5 mM (Sigma-Aldrich), Tween 20 al 0,5% (v/v) (Sigma-Aldrich), Triton X-100 al 0,45% (v/v) (Sigma-Aldrich), gelatina al 0,01% (p/v) (Sigma-Aldrich) y proteinasa K (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,05 mg/ml. La mezcla se agitó y posteriormente se incubó durante 1 h a 55°C en estufa (P Selecta 2000; J.P. SELECTA, Barcelona, España). A continuación, se calentó durante 10 min a 98°C en un termostato de bloque metálico (J.P. SELECTA, S.A.) para inactivar la proteinasa K. Los microtubos se centrifugaron durante 1 min a 12.000 rpm. El sobrenadante con el DNA se transvasó a un nuevo microtubo y se almacenó a -40°C hasta su posterior análisis.

4.2.2.2. Condiciones de la técnica de PCR del gen 16S RNA ribosómico

Los oligonucleotidos cebadores empleados en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) del gen 16S RNA ribosómico fueron los propuestos

por Heilig *et al.* (2002) para la identificación de BAL (cebadores específicos). El cebador directo fue el S-D-Bact-0011-a-S-17 5´ AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG 3´ y el cebador inverso S-G-Lab-0677-a-A-17 5´ CAC CGC TAC ACA TGG AG 3´. Estos cebadores fueron preparados por Fisher Scientific (Munich, Alemania) y rinden un producto de aproximadamente 700 pares de bases (pb).

La mezcla de la reacción de PCR estuvo formada por 1 µl de cada uno de los cebadores a concentración de 10 µM, 25 µl de mezcla de polimerasa Taq Ready Mix (Kapa Biosystems, Boston, MA, EEUU) y 5 µl del sobrenadante con el DNA bacteriano (Heilig *et al.*, 2002). El volumen de la mezcla fue completado hasta 50 µl con agua mili-Q. La reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo TC-512 (Techne, Staffordshire, Reino Unido) usando las condiciones de amplificación descritas por Qingqiang *et al.* (2005): un proceso inicial de calentamiento a 94°C durante 4 min, seguido de 35 ciclos de amplificación siguiendo las siguientes etapas: 30 s a 94°C, 20 s a 56°C y 40 s a 72°C, y finalmente un periodo de elongación de 10 min a 72°C. En cada una de las reacciones de PCR realizadas se introdujo un blanco que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción pero en el cual el DNA molde de la muestra fue sustituido por agua y un control positivo (*Lactobacillus casei* ATCC 393).

Los amplicones fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) (Laboratorios Conda, Madrid, España) en un tampón TAE 1x (Tris base 2M, ácido acético glacial al 5,7%, v/v, y EDTA 0,025 M), ajustado a pH 7,9 y suplementado con bromuro de etidio 0,05 mg/l (Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland) para visualizar las bandas de DNA. Se empleó como marcador molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). La electroforesis se realizó a una diferencia de potencial comprendida entre 100-120 V durante el tiempo necesario para la correcta resolución de las bandas. El seguimiento de la electroforesis se realizó observando los geles en un transiluminador de luz ultravioleta modelo "TF 20M" (Vilber-Lourmat, MRNAe la Vallée, Francia). Una vez finalizada se obtuvieron imágenes de los geles mediante una cámara fotográfica Kodak modelo "DC120" (Kodak, Rochester, NY, EEUU), que fueron posteriormente visualizadas con el software Digital Science 1D, versión 3.0 (Kodak).

4.2.2.3. Purificación, secuenciación e identificación de la secuencia

Los productos de PCR fueron purificados mediante columnas de purificación NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor, y enviados al Laboratorio de Técnicas Instrumentales para su secuenciación con el equipo 3130 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Las secuencias fueron analizadas con el software de secuenciación Chromas Lite (versión 2.01) de Technelysium Pty Ltd. (Queensland, Australia), que abre los archivos obtenidos del equipo de Applied Biosystems y permite exportar las secuencias a texto plano o con formato FASTA.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), utilizando el programa “Nucleotide Blast”. También se empleó la base de datos del “Ribosómico Database Project” (RPD-II; <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) por ser específica para el DNA ribosómico. Obtenido el resultado de la identificación, se consideraron los emparejamientos con aquellas especies (y en su caso subespecie) que presentaron el mayor porcentaje de similitud con la secuencia problema.

4.2.2.4. Análisis estadístico de los datos y preparación de los árboles filogenéticos

Con la finalidad de construir un árbol filogenético del cual se puedan realizar inferencias filogenéticas confiables, se procedió a la recopilación de secuencias completas de los genes *16S RNAr* de diversas cepas de especies y subespecies similares a las obtenidas en el presente estudio en la base de datos Genbank del NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, EEUU), para su utilización como cepas de referencia, que fueron incluidas con las cepas problema en la construcción de los árboles.

Las cepas cuya secuencia fue obtenida del Genbank utilizadas como referencia fueron las siguientes:

- Género *Lactobacillus* (*Lb.*): *Lb. rhamnosus* APO11548, *Lb. rhamnosus* D16552, *Lb. brevis* M58810, *Lb. paraplantarum* AJ306297, *Lb. plantarum* AJ640078, *Lb. paracasei* D79212, *Lb. pentosus* D79211 y *Lb. casei* NR_041893.1.
- Género *Lactococcus* (*L.*): *L. lactis* subsp. *cremoris* AB100802, *L. lactis* subsp. *lactis* AB100803, *L. lactis* subsp. *hordinae* AB100804, *Lb. plantarum* EF694029, *L. raffinolactis* EF694030.
- Género *Leuconostoc* (*Lc.*): *Le. lactis* AB023968
- Género *Enterococcus* (*E.*): *E. faecalis* AE016830.1, *E. faecalis* AB012212, *E. faecalis* AB154827, *E. faecium* AJ301830, *E. gallinarum* AF039900, *E. avium* AF133535, *E. haemoperoxidus* AF286832, *E. mundtii* AF061013 y *E. thailandicus* EF197994.

Adicionalmente, se utilizaron también como cepas de referencia las cepas *Lb. rhamnosus* ATCC 53103, *Lb. casei* ATCC 393, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092, *Lb. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *E. faecalis* ATCC 27332 y *E. faecalis* 189 (proporcionada por el grupo de la Dra. María Rosario García Armesto, de la colección del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León). De estas cepas se utilizaron las secuencias de los fragmentos parciales del gen 16S RNAr, de aproximadamente 670 pb, que fueron obtenidas en el laboratorio mediante PCR y secuenciación usando la misma metodología descrita anteriormente para las cepas problema.

Para el cálculo de las distancias entre las cepas y la construcción de los árboles filogenéticos se utilizaron dos métodos diferentes: el método de agrupamiento no ponderado por pares utilizando la media aritmética, conocido por sus siglas en inglés como “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” (UPGMA; Sneath y Sokal, 1973) y el método del “vecino más cercano”, en inglés Neighbour Joining (NJ; Saitou y Nei, 1987). El procedimiento realizado en cada caso se describe a continuación.

UPGMA

El alineamiento de las secuencias fue realizada mediante el programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994; <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>), que lleva a cabo un

alineamiento múltiple progresivo siguiendo el método propuesto por Feng y Doolittle (1987). El programa alinea en primer lugar las secuencias más parecidas y a continuación va añadiendo secuencias al alineamiento. Este programa mejora la sensibilidad de otros métodos de alineamiento múltiple progresivo (Segura, 2002). Para el alineamiento se utilizaron las opciones por defecto del programa.

A partir de las secuencias alineadas se generó una matriz de distancias y la construcción de los árboles empleando para ello el mismo programa CLUSTAL W. La matriz se calculó por medio del algoritmo de dos parámetros de Kimura, que permite distintas tasas de cambio de nucleótidos según se trate de transiciones o transversiones y los huecos o “gaps”, en inglés, son considerados como nucleótidos desconocidos (Kimura, 1980). A partir de la matriz de distancias se generaron los árboles filogenéticos, empleando el método de UPGMA. Los dendrogramas construidos, se editaron y visualizaron con el programa TreeView X (Page, 1996).

NJ

Este método consiste en el agrupamiento sucesivo de los organismos generando los árboles sin raíz. En él se minimiza la longitud total de las ramas del mismo (Vinuesa, 2002 y Segura, 2002). Dado que este método no produce árboles enraizados, se incluyó en el estudio la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa de *Bacillus subtilis* DMS 10^T AJ276351 (obtenida de la base de datos Genbank del NCBI) como grupo externo (*outgroup*), permitiendo así generar una orientación filogenética a los árboles obtenidos respecto a este microorganismo, considerado como raíz.

Para llevar a cabo el procedimiento se realizó el alineamiento de las secuencias mediante el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994; <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). A partir de las secuencias alineadas se generó la matriz de distancias mediante el algoritmo de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969), se construyeron los árboles y se analizaron las relaciones existentes entre especies con el programa *Phylogeny Inference Package* (PHYLIP, versión 3.69 (Felsenstein,

2009; <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). En el procedimiento se incluyó un análisis de *bootstrap* con 2000 réplicas, para determinar el grado de soporte estadístico de los agrupamientos. Generalmente, se considera que una agrupación es concluyente cuando el valor de *bootstrap* es 90 o mayor (es decir, cuando el agrupamiento se repite en 90, o más, de cada 100 réplicas). Sin embargo, Hillis y Bull (1993) han demostrado que valores de *bootstrap* mayores de 70 generalmente corresponden a una probabilidad del 95% de que los datos apoyen de forma consistente el agrupamiento. Por este motivo, se indican en los árboles las agrupaciones con valor de *bootstrap* superiores a 70. Los árboles generados se editaron y visualizaron las relaciones genéticas con el programa *TreeView X* (Page, 1996).

4.2.3. Estudio bioquímico y tecnológico de las cepas aisladas del queso

4.2.3.1. Fermentación de carbohidratos

La caracterización bioquímica de las cepas de BAL se realizó mediante el sistema miniaturizado API™ (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia). Antes de la caracterización bioquímica, las cepas ensayadas fueron recuperadas y se comprobó su pureza según se describe en el apartado 4.2.1.3. Posteriormente, se determinó el perfil de fermentación de carbohidratos utilizando la galería API CH 50 (bioMérieux), que está recomendada para la identificación de cepas del género *Lactobacillus* spp. y microorganismos próximos. Este sistema consta de una serie de microtubos que contienen los sustratos con carbohidratos potencialmente fermentables. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del proveedor (http://www.biologiemarine.com/___fiches/APIpdf/API%2050%20CHL%20Medium-_07486_-_G_-_50410.pdf). realizándose la lectura de los microtubos después de 48 h de incubación a 37°C. Los resultados fueron analizados en la base de datos del proveedor: Apiweb™, <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>.

4.2.3.2. Actividad enzimática

Para determinar el perfil enzimático de las cepas BAL se empleó el sistema miniaturizado API ZIM (bioMeriux; Humble *et al.*, 1977) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este sistema permite la detección semicuantitativa de los enzimas siguientes: fosfatasa alcalina, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), lipasa (C14), leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina, quimotripsina, fosfatasa ácida, fosfoamidasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, α -manosidasa y α -fucosidasa.

El ensayo se realizó sobre 93 cepas. En aquellos casos donde hubo varias cepas pertenecientes a un mismo grupo genético, que además tenían el mismo perfil de fermentación de carbohidratos, se optó por elegir aleatoriamente una de las cepas del grupo y analizar solo el perfil enzimático de la cepa elegida (asumiendo que las cepas del mismo grupo genético y perfil de fermentación de carbohidratos podrían tener el mismo perfil enzimático por proceder de la misma cepa). Además, no pudo realizarse el ensayo de las siguientes cepas de *E. faecalis*: 19b, 25, 27, 49, 33, 515, 14b, 512, 60, 30b por problemas técnicos.

Para cada cepa estudiada, a partir de las placas de MRS sembradas en estría, con ayuda de un hisopo se tomó del crecimiento una cantidad de células tal que permita preparar una suspensión bacteriana en agua destilada estéril con una densidad equivalente a 5 unidades de la escala de McFarland. Cada pocillo de la galería se rellenó con 65 μ l de la suspensión anteriormente descrita. Posteriormente, se incubaron las galerías durante 4 horas y media en una estufa a 37°C. Transcurrido este tiempo, las reacciones se revelaron de la siguiente manera: se añadió en cada pocillo una gota del reactivo Zym A y a continuación una gota del reactivo Zym B y se esperó durante 5 minutos para que se desarrollara el color. Después, para eliminar el exceso de color de la solución base, Fast blue BB, las tiras fueron expuestas a la luz solar durante 10 s y la lectura de los resultados fue registrada en valores entre 0 y 5 unidades de acuerdo con la escala de color proporcionada por el fabricante.

4.2.4. Características tecnológicas

4.2.4.1. Capacidad de acidificación de la leche

A partir de un cultivo puro de cada uno de los aislamientos, se tomó una colonia con un asa de platino y se sembró en un tubo con 5 ml de caldo MRS (Oxoid) con 5% (p/v) de extracto de levadura (Oxoid). Los tubos se incubaron a 30°C durante 24 h y una vez transcurrido este tiempo se tomó una alícuota de 150 µl de cada tubo y se vertieron en un tubo de ensayo con 15 ml de medio Skim Milk (Difco) tindalizado dos veces a 121°C durante 5 min. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la Federación Internacional de Lechería (IDF, 1995). Los tubos se incubaron en un baño de agua a 30°C y se realizaron las lecturas del pH con un pH-metro (Crison Instruments S. A. modelo GLP22; Barcelona, España) a las 0 h, 6 h, 12 h y 24 h de incubación.

4.2.4.2. Actividad proteolítica

A partir de un cultivo puro de cada uno de los aislamientos, se tomó una colonia con un asa de platino y se sembró en tubos con 5 ml de caldo Tryptic Soy Broth (TSB; Oxoid) con 5% (p/v) de extracto de levadura (Oxoid), que se incubaron a 37°C durante 24 h. Se tomó una alícuota de 25 µl de cada uno de los tubos y se inoculó por el método de siembra en superficie sobre una placa de agar con leche desnatada. El agar se preparó de la siguiente manera: se vertió primero una base aproximadamente de 10 ml de agar (Difco) atemperado estéril y una vez solidificado, se añadió una segunda capa fina de agar Skim Milk (Difco). Las placas se incubaron a 30°C durante 14 días. Las placas se observaron diariamente y se anotó el diámetro en mm del halo claro que eventualmente pudiera haber aparecido alrededor de las colonias desarrolladas. Como control positivo se utilizó *Enterococcus faecalis* ATCC 53103 de la colección del departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León, España. Transcurrido ese tiempo, se inundaron las placas con HCl (Panreac) 1% (p/v). Se consideró como resultado positivo aquellas colonias que presentaron halos o zonas transparentes.

4.2.5. Aspectos de inocuidad de las bacterias ácido-lácticas aisladas del queso

4.2.5.1. Sensibilidad frente a los antibióticos

Se determinó la sensibilidad de las cepas de BAL frente a diversos antibióticos siguiendo las recomendaciones de la EFSA (2012), específicamente para la elección de los tipos de antibióticos estudiados y para la expresión de los resultados. Además, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI). La determinación de la CMI es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico expresada como la mínima cantidad de antibiótico capaz de impedir el crecimiento de una bacteria en condiciones normalizadas.

El ensayo se llevó a cabo mediante el método Etest (AB BioDisk; bioMérieux), que es un ensayo de resistencia microbiana a antibióticos basado en el uso de tiras de un material específico que contiene antibióticos en un gradiente de concentración (Tabla 4.1). Para llevar a cabo el ensayo se siguieron las recomendaciones del proveedor, del National Council of Clinical Laboratory Services (NCCLS; 2007) y de Goosseens (2007).

Tabla 4.1. Antibióticos y sus rangos de concentración presentes en las tiras Etest

Compuesto Antimicrobiano	Categoría	Concentración (rango) µg/ml	
Gentamicina	Aminoglucósido	0,016	256
Kanamicina	Aminoglucósido	0,016	256
Estreptomina	Aminoglucósido	0,064	1024
Tetraciclina	Tetraciclina	0,016	256
Eritromicina	Macrólido	0,016	256
Cloranfenicol	Cloranfenicol	0,016	256
Ampicilina	Betalactámico	0,016	256
Bencilpenicilina	Betalactámico	0,002	32
Vancomicina	Glicopéptido	0,016	256
Ciprofloxacino	Fluoroquinolona	0,002	32
Clindamicina	Lincosamida	0,016	256

El ensayo se realizó sobre 98 cepas. En aquellos casos en que hubo varias cepas pertenecientes a un mismo grupo genético con el mismo perfil de fermentación de hidratos de carbono, se optó por elegir aleatoriamente una de esas cepas y analizar solo el perfil enzimático de la cepa elegida (considerando de nuevo que las cepas del mismo grupo genético y mismo perfil de fermentación de carbohidratos podrían proceder de una misma cepa). Además, no pudo realizarse el ensayo de las siguientes cepas de *E. faecalis*: 27, 33, 515 y 49, por problemas experimentales.

A partir de un cultivo puro de cada uno de los aislamientos, con ayuda de un hisopo se preparó una suspensión celular en una solución estéril de NaCl al 0,85% (p/v) hasta alcanzar una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland que se considera equivalente a la producida por una concentración bacteriana de 1 a 2 x10⁸ ufc/ml (Barry, 1876; Leiva, 1999). Inmediatamente después de haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, se procedió a la siembra en césped de la cepa por toda la superficie de una placa de agar LSM (ISO, 2012), con otro hisopo estéril. Este medio se preparó mezclando 90% de caldo Iso-Sensitest (Oxoid) y 10% de caldo MRS (Oxoid), se ajustó el pH a 6,7 y se le añadió 8,2 g por litro de Agar Bacteriológico (Oxoid).

Después de la siembra de las placas y antes de que transcurrieran 15 minutos, se colocaron 2 tiras del antibiótico Etest a ensayar, separadas tanto del borde de las placas como entre sí, para evitar que se superpusieran las zonas de inhibición. Finalmente, la placa que contenía las tiras se incubó durante 24 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura de la placa siguiendo las indicaciones del fabricante de la prueba (http://www.ilexmedical.com/files/ETEST_RG.pdf). Con el fin de asegurar el buen funcionamiento de las tiras Etest (AB BIODISK), así como la metodología empleada, se utilizó una cepa control (*E. faecalis* ATCC 29212) cuya concentración mínima inhibitoria (CMI) fué estudiada para cada uno de los antibióticos. Los valores de CMI obtenidos para esta cepa con cada antibiótico fueron comparados con los rangos obtenidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007).

Para establecer los puntos de corte de resistencia/sensibilidad a partir de las CMI (concentración más baja de antibiótico a partir de la cual no se observa crecimiento bacteriano) se siguieron los criterios sugeridos por organizaciones

internacionales o en trabajos de investigación relevantes (Tabla 4.2). Las cepas con concentraciones mínimas inhibitorias iguales o superiores que los puntos de corte se consideraron resistentes (SCAN, 2002).

Tabla 4.2. Concentraciones mínimas inhibitorias establecidas como puntos de corte para distintas especies de bacterias ácido lácticas usadas en alimentos y probióticos

Antibiótico	Especie	Propuesta del punto de corte (µg/ml)				
		EFSA (2012)	SCAN (2002)	NCCLS (2007)	Danielsen and Wind (2003)	Otros trabajos
Ampicilina	<i>Lb. plantarum</i>	2	2**		4	
	<i>Lb. paracasei</i>	4	2**		4	
	<i>Lb.rhamnosus</i>	4	2**		4	
	<i>L. lactis</i>	2				
	<i>Le. lactis</i>	2				
	<i>E. faecalis</i>	-	8	≥16		
	<i>E. faecium</i>	2	8	≥16		
Bencil penicilina	<i>Lb. plantarum</i>				4	
	<i>Lb. paracasei</i>				4	
	<i>Lb.rhamnosus</i>				4	
	<i>L. lactis</i>					4 ⁽¹⁾
	<i>Le. lactis</i>					4 ⁽¹⁾
	<i>E. faecalis</i>			≥16		
	<i>E. faecium</i>			≥16		
Ciprofloxacino	<i>Lb. plantarum</i>		4**		>32	
	<i>Lb. paracasei</i>		4**		>32	
	<i>Lb.rhamnosus</i>		4**		>32	
	<i>L. lactis</i>					4 ⁽¹⁾
	<i>Le. lactis</i>					4 ⁽¹⁾
	<i>E. faecalis</i>		2	≥4		
	<i>E. faecium</i>		4	≥4		
Cloranfenicol	<i>Lb. plantarum</i>	8	16		16	
	<i>Lb. paracasei</i>	4	16		16	
	<i>Lb.rhamnosus</i>	4	16		16	
	<i>L. lactis</i>	8				
	<i>Le. lactis</i>	4				
	<i>E. faecalis</i>	-	16	≥32		
	<i>E. faecium</i>	16	16			
Clindamicina	<i>Lb. plantarum</i>	1			32	
	<i>Lb. paracasei</i>	1			0,5	
	<i>Lb.rhamnosus</i>	1			2	
	<i>L. lactis</i>	1				
	<i>Le. lactis</i>	1				
	<i>E. faecalis</i>	-				1 ⁽²⁾
	<i>E. faecium</i>	4				
Eritromicina	<i>Lb. plantarum</i>	1	4		4	
	<i>Lb. paracasei</i>	1	4		2	
	<i>Lb.rhamnosus</i>	1	4		2	
	<i>L. lactis</i>	1				
	<i>Le. lactis</i>	1				
	<i>E. faecalis</i>	-	4	≥8		
	<i>E. faecium</i>	4	4			
Gentamicina	<i>Lb. plantarum</i>	16	1		128	
	<i>Lb. paracasei</i>	32	1		128	
	<i>Lb.rhamnosus</i>	16	1		128	

	<i>L. lactis</i>	32		
	<i>Le. lactis</i>	16		
	<i>E. faecalis</i>	-	500	
	<i>E. faecium</i>	32	500	
Kanamicina	<i>Lb. plantarum</i>	64	32	>256
	<i>Lb. paracasei</i>	64	32	>256
	<i>Lb. rhamnosus</i>	64	32	>256
	<i>L. lactis</i>	64		
	<i>Le. lactis</i>	16		
	<i>E. faecalis</i>	-	1024	
	<i>E. faecium</i>	1024	1024	
	Estreptomicina	<i>Lb. plantarum</i>	n.r.	16
<i>Lb. paracasei</i>		32	16	>256
<i>Lb. rhamnosus</i>		64	16	>256
<i>L. lactis</i>		32		
<i>Le. lactis</i>		64		
<i>E. faecalis</i>		-	1024	
<i>E. faecium</i>		128	1024	
Tetraciclina		<i>Lb. plantarum</i>	32	16
	<i>Lb. paracasei</i>	4	16	4
	<i>Lb. rhamnosus</i>	8	16	4
	<i>L. lactis</i>	4		
	<i>Le. lactis</i>	8		
	<i>E. faecalis</i>	-	16	≥16
	<i>E. faecium</i>	4	16	
	Vancomicina	<i>Lb. plantarum</i>	n.r.	4**
<i>Lb. paracasei</i>		n.r.	4**	4
<i>Lb. rhamnosus</i>		n.r.	4**	4
<i>L. lactis</i>		4		
<i>Le. lactis</i>		n.r.		
<i>E. faecalis</i>		-	8	≥32
<i>E. faecium</i>		4	8	

EFSA (2012): *Lb. plantarum/pentosus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei/paracasei*, *Leuconostoc* spp., *L. lactis* y *E. faecium*.

SCAN (2002): *Lactobacillus*, *E. faecium* y *E. faecalis*.

Danielsen y Wind (2003): *Lactobacillus* spp.

NCCLS (2007): *Enterococcus* spp.

Otros; ⁽¹⁾ Katla *et al.* (2001): *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp.; ⁽²⁾ Flórez *et al.* (2005): bacterias ácido lácticas.

** las indicaciones dicen que hay ciertas cepas inherentemente resistentes.

4.2.5.2. Actividad hemolítica

A partir de un cultivo puro de cada uno de los aislamientos, se sembró cada cepa en tubos de ensayo que contenían 5 ml de caldo de Tryptic Soy Broth (TSB, Oxoid) con 5% (p/v) de extracto de levadura (Oxoid). Los tubos se incubaron a 37°C durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota con un asa de platino y se sembró por el método de estría en una placa de agar sangre (Facklam y Wilkinson, 1981). Este medio se preparó de la siguiente manera: se mezclaron 40 g de Tryptic Soy Agar (TSA; Oxoid) deshidratado con un litro de agua; una vez disuelto, el medio resultante se esterilizó y se atemperó a 45°C en un baño de agua. A continuación, se le añadió 50 ml de sangre de caballo desfibrinada estéril (Oxoid).

Las placas se inocularon y a seguidamente se incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 48 h. Las condiciones de anaerobiosis se obtuvieron almacenando las placas en una jarra de anaerobios (Oxoid) donde se colocó un sobre generador de condiciones anaerobias (Anaerogen, Oxoid). Transcurrido el tiempo de incubación se llevó a cabo la lectura de las placas. Para ello, se utilizó como control positivo el microorganismo *Staphylococcus aureus* CECT 5192, proporcionado por el grupo de la Dra. María Rosario García Armesto, de la colección del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León

El crecimiento en agar sangre produce cambios en el aspecto del medio alrededor de las colonias, cuando las bacterias lisan los eritrocitos total o parcialmente dan lugar a 3 tipos de resultados; a) α -hemólisis: aparición de una zona marrón-verdosa alrededor de las colonias debido a una lisis incompleta de los eritrocitos con cambio de color de la hemoglobina por pérdida de potasio (hemólisis parcial); b) β -hemólisis: los eritrocitos se lisan totalmente y la hemoglobina es degradada dando lugar a un halo claro alrededor de las colonias (hemólisis total); c) no hemólisis: no hay cambio debido al crecimiento bacteriano.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Recuento de bacterias ácido-lácticas en las distintas etapas del proceso de elaboración del queso

En la Tabla 4.3 se muestran los valores medios de los recuentos encontrados en agar M17 (indicativos del contenido en lactococos) y MRS (indicativos del contenido de lactobacilos) en las distintas etapas de elaboración del queso Oaxaca. En el agar M17 se observaron recuentos relativamente altos en la leche fresca, lo que es indicativo de que la leche de partida ya presentó una acidificación incipiente. Estos recuentos subieron algo más de una unidad logarítmica en la leche ácida y se mantuvieron sin cambios significativos en cuajada ácida y queso. También se observaron recuentos relativamente elevados en el agar MRS en la leche fresca que se incrementaron en la leche ácida, se mantuvieron en esos niveles en la cuajada ácida y descendieron en el queso, para situarse en los niveles iniciales. La disminución en el queso podría atribuirse al efecto termoreductor del malaxado (o fundido de la cuajada), que es una etapa donde la cuajada ácida (pH 5,2-5,4) se calienta hasta una temperatura de unos 55°C durante 15 minutos (Caro *et al.*, 2007). Sólo se observaron diferencias entre los recuentos de M17 y MRS en la cuajada ácida, siendo superiores en el medio M17.

Los recuentos en M17 (medio utilizado para el recuento de lactococos) en queso fueron aproximadamente una unidad logarítmica inferiores a los descritos por Saxer *et al.* (2013) en queso Oaxaca, mientras que hubo coincidencia entre este estudio y el de Saxer *et al.* en los recuentos en MRS (lactobacilos). La diferencia entre ambos estudios en cuanto a los recuentos de lactococos puede atribuirse al hecho de que los quesos evaluados en el estudio de Saxer *et al.* estaban elaborados con leche pasteurizada (a los que se agregan cultivos iniciadores), mientras que los de este estudio se han obtenido a partir de quesos elaborados con leche cruda. Los altos recuentos observados en este estudio confirman que la elaboración del queso Oaxaca está basada en la producción de ácido láctico derivado del crecimiento de las BAL, que

proporciona (la acidez junto con el malaxado) al queso características singulares, como por ejemplo la fibrosidad, rasgo único de esta variedad de queso (Oaxaca).

Tabla 4.3. Recuentos de bacterias acido-lácticas del queso Oaxaca en las distintas etapas de elaboración (valores medios y desviación estándar de cada fábrica muestreada; n = 3)

Etapa de elaboración	M17	MRS
Leche fresca	6,46 ± 0,45 ²	6,58 ± 0,43 ³
Leche ácida	7,96 ± 0,23 ¹	8,70 ± 0,83 ¹
Cuajada ácida	8,23 ± 0,29 ^{a1}	7,62 ± 0,31 ^{b12}
Queso	7,64 ± 0,60 ¹²	6,63 ± 0,65 ²³

^{1,2,a,b} Valores medios de las filas con ninguna letra en común y valores medios de las columnas con ningún número en común indican la presencia de diferencias significativas ($P < 0,05$; prueba de Tukey).

4.3.2. Aislamiento de bacterias acido-lácticas

En la Tabla 2 se muestran los aislamientos en las distintas etapas de elaboración del queso Oaxaca en los medios de cultivo M17 y MRS que fueron consideradas como presuntas BAL según las pruebas de precaracterización (Gram positivas y catalasa positivas). Como se observa en la Tabla 4.4, se aislaron entre 18 y 35 colonias por etapa de elaboración. En total se aislaron 121 colonias, que fueron posteriormente adscritas a cuatro géneros de BAL, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*.

Tabla 4.4. Cepas de presuntas BAL aisladas en las diferentes etapas de elaboración del queso Oaxaca de los distintos medios de aislamiento

Procedencia	Medio	Cepas	Aislamientos
LF	M17	25, 27, 28, 32b, 33, 52, 58, 66a, 66b, 501, 502, 513, 515, 1010, 1011, 1012, 1002, ,	35
	MRS	3, 8, 20, 22a, 22b, 51, 53, 54, 56, 60, 62, 68, 1502, 1520, 2001, 2002, 2011, 2012	
LA	M17	24b, 29, 34, 35, 40, 43, 63, 504, 510a, 510b, 511, 512, 1003, 1004, 1013, 1014	34
	MRS	4a, 4b, 6, 11, 14a, 14b, 15a, 15b, 49, 50, 55, 57, 59, 67a, 67b, 1511, 1510, 2015,	
CA	M17	26a, 26b, 30b, 36, 37, 39, 41, 44, 45, 505a, 506, 516, 517, 518, 1006, 1016, 1019, 2013	34
	MRS	10a, 10b, 13, 17a, 17b, 18, 19a, 19b, 21, 24a, 47, 1506, 1515, 2005a 2016, 2017a	
Q	M17	509, 519, 520a, 1007, 1008, 1009, 1017, 1020, 2019	18
	MRS	64, 1509, 1514, 1516, 1517, 1518, 2004, 2007, 2008	

LF; Leche fresca, LA; Leche acida, CA; Cuajada ácida (antes del malaxado), Q; Queso

4.3.3. Identificación genética de las cepas aisladas

Las presuntas BAL (aislamientos) fueron sometidas a identificación genética por medio de la comparación de la secuencia parcial del gen 16S RNAr con las secuencias de las bases de datos: Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) y *Ribosomal Database Project II* (RDP-II). La Tabla 4.5 muestra los resultados de dicha identificación. Las 121 cepas estudiadas se agruparon en 4 géneros y siete especies de BAL. En concreto, 26 cepas fueron adscritas al género *Lactobacillus* spp. (20 a *Lb. plantarum*, 5 a *Lb. paracasei* y 1 a *Lb. rhamnosus*), 20 cepas al género *Lactococcus* spp. (todas se identificaron como *L. lactis*), una cepa al género *Leuconostoc* spp. (adscrita a la especie *Le. lactis*) y 74 cepas, al género *Enterococcus* spp. (68 se identificaron como *E. faecalis* y 6 como *E. faecium*).

Considerando los resultados de la comparación de secuencias parciales del gen 16S RNAr en el programa BLAST, la mayoría de los aislamientos problema (115 cepas) presentaron una alta similitud en su secuencia (*identity* igual o superior al 98%) con la secuencia de la cepa recogida en la base de datos. El criterio para asignar una cepa problema a una especie con un grado de certeza aceptable está en el rango de *identity* \geq 97-99 (Stackebrandt y Goebel, 1994; Bou *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2003; Felis y Dellaglio, 2007).

Siguiendo el criterio intermedio (*identity* 98%), solo 6 cepas presentaron valores por debajo de 98% (Tabla 4.5). Aunque la similitud (*identity*) de estas cepas no fue menor al 93%, su adscripción a especie presenta una mayor incertidumbre. De esas seis cepas, todas, excepto la cepa 1004 (identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) se identificaron como *Enterococcus faecalis* (8, 25, 26b, 36, 66a).

De acuerdo con estos resultados, la identificación genética por la metodología empleada presentó más incertidumbre en el caso de *Enterococcus* spp. que en el caso de *Lactobacillus* spp. o *Lactococcus* spp. Esta mayor incertidumbre se podría atribuir, al menos parcialmente, a que el par de cebadores utilizado está diseñado específicamente para lactobacilos (Heilig *et al.*, 2002). Otra posible causa para explicar la mayor incertidumbre podría ser la

gran variabilidad genética dentro del grupo de *Enterococcus* spp. (Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2013; Caro *et al.*, 2014).

Contrastando los resultados de identificación obtenidos con el programa BLAST y los obtenidos con el programa RDP-II se observa una gran concordancia. Cabe señalar que los valores de *similarity* en RDP-II fueron algo superiores a los de *identity* del BLAST. En este sentido, 5 de las 6 cepas con valores de *identity* inferiores a 98% en el BLAST, presentaron valores de *similarity* en RDP-II elevados (por encima de 0,980); sólo la cepa 66a mostró valores inferiores. Por otra parte, con el programa BLAST hubo tres cepas (59, 2005a y 2007) que se llegaron a identificar a nivel de subespecie (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei*), mientras que con el programa RDP-II sólo se llegaron a identificar a nivel de especie (*Lb. paracasei*). Estos resultados confirman lo dicho por Stackebrandt y Goebel (1994) de que el análisis de la secuencia del gen *16S RNAr*, aunque da buenos resultados en la identificación a nivel de género y especie, normalmente no puede diferenciar cepas a nivel de subespecie, no siendo apropiado para medir relaciones intraespecie. También se deduce de los resultados obtenidos que el uso conjunto de los dos programas (RDP-II and BLAST) permite dar mayor robustez a los resultados de la identificación.

Tabla 4.5. Resultados de la identificación a partir del emparejamiento las secuencias de la región 16S RNAr de las cepas problema usando los programas BLAST y RDP-II.

Cepa	Número de acceso		Especie asignada*	Estadísticos del emparejamiento #		
				BLAST	RDP-II	
				BLAST	RDP-II	identity (%)
<i>Lactobacillus spp</i>						
3	NR_075041.1	AB030925	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	1.000
21	NR_075041.1	AB104855	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	0.989
22a	NR_075041.1	AB030925	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	1.000
22b	NR_075041.1	AB104855	<i>Lb. plantarum</i>	99	0.998	0.964
24a	NR_075041.1	AB030925	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	1.000
24b	NR_075041.1	AB030925	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	1.000
4	NR_075041.1	AB104855	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	0.990
55	NR_075041.1	AB030925	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	1.000
57	NR_075041.1	AB030925	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	1.000
58	NR_075041.1	AB030925	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	1.000
66b	NR_075041.1	AB104855	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	0.981
67a	NR_075041.1	AY851752	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	0.987
67b	NR_075041.1	AB104855	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	0.990
68	NR_075041.1	EF468099	<i>Lb. plantarum</i>	99	0.996	0.979
505a	NR_075041.1	AB030925	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	1.000
1017	NR_075041.1	AB183696	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	0.987
1019	NR_075041.1	AB030925	<i>Lb. plantarum</i>	99	0.997	0.990
1511	NR_075041.1	AY851754	<i>Lb. plantarum</i>	99	0.998	0.985
1515	NR_075041.1	AY851761	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	0.988
1517	NR_075041.1	AB030925	<i>Lb. plantarum</i>	99	1.000	1.000
51	NR_025880.1	AB289214	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	99	1.000	0.974
59	NR_025880.1	EU637387	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (BLAST) <i>Lb. paracasei</i> (RDP-II)	99	0.998	0.985
2005a	NR_025880.1	EU637387	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (BLAST) <i>Lb. paracasei</i> (RDP-II)	99	1.000	1.000
2007	NR_025880.1	HM163450	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (BLAST) <i>Lb. paracasei</i> (RDP-II)	99	0.998	0.975
2013	NR_025880.1	AB126872	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	99	1.000	0.981
2004	NR_102778.1	AF375897	<i>Lb. rhamnosus</i>	99	0.998	0.992
<i>Lactococcus spp</i>						
501	NR_103918.1	DQ011898	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	1.000	0.991
502	NR_040955.1	DQ011898	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	1.000	1.000
506	NR_040955.1	DQ011898	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	0.997	0.980
509	NR_040955.1	DQ011898	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	1.000	1.000
511	NR_040955.1	EU091387	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	0.998	0.953
518	NR_040955.1	EU872263	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	0.997	0.974
519	NR_040955.1	JF297355	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	1.000	0.990
520a	NR_040955.1	EU091415	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	0.996	0.977
1002	NR_040955.1	DQ011898	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	0.997	0.969
1003	NR_040955.1	DQ011898	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	98	1.000	1.000
1004	NR_103918.1	DQ255952	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	97	1.000	0.971
1007	NR_040955.1	DQ173744	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	0.984	0.976

1502	NR_040955.1	AF515224	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	0.998	0.968
1506	NR_040955.1	DQ011898	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	1.000	0.963
1510	NR_103918.1	DQ011898	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	1.000	0.980
1520	NR_040955.1	EU872263	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	1.000	0.964
2002	NR_040955.1	EU872263	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	1.000	0.964
2016	NR_103918.1	DQ011898	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	0.997	0.989
2017a	NR_103918.1	DQ011898	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	1.000	1.000
2019	NR_103918.1	DQ011898	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99	1.000	0.991
<i>Leuconostoc spp</i>						
517	NR_040823.1	GU049408	<i>Le. lactis</i>	99	1.000	0.990
<i>Enterococcus spp.</i>						
4a	NR_074637.1	Y18293	<i>E. faecalis</i>	99	0.997	0.991
4b	NR_074637.1	Y18293	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.986
6	NR_074637.1	Y18293	<i>E. faecalis</i>	98	0.998	0.986
8	NR_074637.1	Y18293	<i>E. faecalis</i>	96	0.998	0.986
10a	NR_074637.1	Y18293	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.986
10b	NR_074637.1	Y18293	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.997
11	NR_074637.1	Y18293	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.997
13	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.988
14a	NR_074637.1	AM982785	<i>E. faecalis</i>	99	0.986	0.968
14b	NR_074637.1	AM982785	<i>E. faecalis</i>	99	0.986	0.968
15a	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
15b	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.996	0.993
17a	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.996	0.993
17b	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
18	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
19a	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
19b	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
20	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.996	0.983
25	NR_074637.1	AM982785	<i>E. faecalis</i>	97	0.986	0.968
26a	NR_074637.1	AM982785	<i>E. faecalis</i>	99	0.986	0.968
26b	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	95	0.989	0.926
27	NR_074637.1	AM982785	<i>E. faecalis</i>	99	0.983	0.933
28	NR_074637.1	Y18293	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.976
29	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.994	0.981
30b	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.992	0.978
32b	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.988
33	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	98	0.994	0.940
34	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.967
35	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.994	0.993
36	NR_074637.1	AY375293	<i>E. faecalis</i>	97	0.996	0.943
37	NR_074637.1	AY375293	<i>E. faecalis</i>	98	0.996	0.934
39	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.994	0.993
40	NR_040789.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.987	0.952
41	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.994	0.993
43	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.988
45	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.996	0.993
47	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
49	NR_074637.1	Y18293	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.995
50	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	98	1.000	1.000
52	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.974
53	NR_074637.1	AM982785	<i>E. faecalis</i>	99	0.981	0.968
56	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
60	NR_074637.1	Y18293	<i>E. faecalis</i>	99	1.000	1.000
66a	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	93	0.973	0.947
504	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
510a	NR_074637.1	Y18293	<i>E. faecalis</i>	99	1.000	0.998
510b	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.996	0.971

512	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.988
513	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
515	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	98	0.998	1.000
516	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	98	0.996	0.924
1006	NR_074637.1	Y18293	<i>E. faecalis</i>	99	0.989	0.968
1008	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.996	0.993
1009	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
1010	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
1011	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.992
1012	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.994	0.991
1013	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
1014	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
1016	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
1020	NR_074637.1	Y18293	<i>E. faecalis</i>	99	1.000	0.976
1509	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
1516	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
2001	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.996	0.971
2008	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
2011	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	1.000
2012	NR_074637.1	AY865649	<i>E. faecalis</i>	99	0.996	0.993
2015	NR_074637.1	FJ641056	<i>E. faecalis</i>	99	0.998	0.992
44	NR_102790.1	AY683831	<i>E. faecium</i>	99	0.993	0.957
62	NR_102790.1	AJ968601	<i>E. faecium</i>	98	0.980	0.975
63	NR_102790.1	AY683831	<i>E. faecium</i>	99	0.998	0.979
64	NR_102790.1	AY683831	<i>E. faecium</i>	99	1.000	1.000
1514	NR_102790.1	DQ011898	<i>E. faecium</i>	99	0.998	0.975
1518	NR_102790.1	DQ011898	<i>E. faecium</i>	99	1.000	0.988

^a Especie de la base de datos de los programas utilizados que presentó mayor coincidencia en la secuencia de 16S rRNA con la cepa problema. En los casos en los que la asignación presenta diferencias entre los programas BLAST y RDP-II se muestran los resultados de la identificación con programas por separado.

Identity (%) y similarity: grado de identidad o coincidencia de las secuencias (mismos residuos en las mismas posiciones en un alineamiento, frecuentemente expresados como porcentaje) calculado con los programas BLAST y RDP-II respectivamente. Score Sa_b: Puntuación sobre 1 de la coincidencia de las secuencias basada el número de fragmentos de 7-pares de bases que presentan en común la secuencia de la cepa problema con la de cepa que se compara.

En la Tabla 4.6 se muestran los resultados de identificación de las cepas problema estudiadas, agrupadas en función del medio de aislamiento y del momento de la toma de muestras. En cuanto al efecto del medio de cultivo, como era de esperar (Fox *et al.*, 2000), se observó cómo la mayor parte de los *Lactobacillus* spp. se aislaron de medio MRS (aunque, curiosamente, para *Lb. paracasei* ocurrió lo contrario) y la mayor parte de *Lactococcus* spp. se aislaron de medio M17. Las cepas de *Enterococcus* spp. (las más abundantes) se aislaron en cantidades semejantes a partir de medio M17 que de medio MRS. Como complemento a la Tabla 4, la Fig. 4.1 muestra el % de los aislamientos obtenidos a partir de las principales etapas de elaboración del queso Oaxaca.

Tabla 4.6. Clasificación de las cepas aisladas durante el proceso de elaboración del queso Oaxaca en función a la especie, etapa y medio de cultivo de procedencia

Identificación	Cepas			
	Etapa	Medio M17	Medio MRS	Nº de cepas
<i>Lactobacillus spp.</i>				
<i>Lb. plantarum</i>				
	LF	58, 66b	3, 22a, 22b, 54, 68	7
	LA	24b	55, 57, 67a, 67b, 1511	6
	CA	505a, 1019	21, 24a, 1515	5
	Q	1017	1517	2
<i>Lb. paracasei</i>				
	LF	51		1
	LA	59		1
	CA	2013	2005a	2
	Q	2007		1
<i>Lb. rhamnosus</i>				
	Q		2004	1
<i>Lactococcus spp.</i>				
<i>L. lactis</i>				
	LF	501, 502, 1002	1502, 1520, 2002	6
	LA	511, 1003, 1004	1510	4
	CA	506, 518	1506, 2016, 2017a	5
	Q	509, 519, 520a, 1007, 2019	-	5
<i>Enterococcus spp.</i>				
<i>E. faecalis</i>				
	LF	25, 27, 28, 32b, 33, 52, 66a, 513, 515, 1010, 1011, 1012	8, 20, 53, 56, 60, 2001, 2011, 2012	20
	LA	29, 34, 35, 40, 43, 504, 510a, 510b, 512, 1013, 1014	4a, 4b, 6, 11, 14a, 14b, 15a 15b, 49, 50, 2015	22
	CA	26a, 26b, 30b, 36, 37, 39, 41, 45, 516, 1006, 1016	10a, 10b, 13, 17a, 17b, 18, 19a, 19b, 47	20
	Q	1008, 1009, 1020	1509, 1516, 2008	6
<i>E. faecium</i>				
	LF	-	62	1
	LA	63	-	1
	CA	44	-	1
	Q	-	64, 1514, 1518	3
<i>Leuconostoc spp.</i>				
<i>Lc lactis</i>				
	CA	517	-	1
Total cepas				121

LF; Leche fresca, LA; Leche acida, CA; Cuajada ácida (antes del malaxado), Q; Queso

Los géneros con mayor presencia durante el proceso de elaboración del queso Oaxaca fueron *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Lactococcus* spp. Este resultado coincide con lo encontrado en un estudio previo de queso Oaxaca por Saxer *et al.* (2013). Las BAL de los géneros y especies detectadas en nuestras muestras son comunes en los quesos (Montel *et al.*, 2014). Es usual encontrar una cantidad elevada de enterococos en los quesos tradicionales elaborados con leche cruda, aunque las BAL más abundantes suelen ser lactococos y, en segundo lugar, enterococos (Cogan *et al.*, 1997). No obstante, en determinados casos llegan a ser los enterococos las BAL predominantes en la leche o en el queso (Sarantinopoulos *et al.*, 2001). Los enterococos son BAL presentes en gran cantidad en los productos lácteos fermentados, formando también parte de la microflora intestinal de algunos mamíferos.

La especie de BAL aislada con mayor frecuencia en este estudio, a pesar de haber utilizado para el aislamiento medios de cultivo diseñados para el crecimiento y recuento de lactococos y lactobacilos, fue *Enterococcus faecalis*. Los porcentajes de aislamiento para este microorganismo estuvieron próximos al 60% en todas las etapas de elaboración del queso Oaxaca excepto en la fase de queso recién elaborado, donde disminuyeron hasta un poco más de la mitad de los valores iniciales (30-40%).

Es posible que la mayor presencia de *Enterococcus* spp. en todo el proceso de elaboración del queso Oaxaca pueda deberse a las condiciones medioambientales de las fábricas donde se elabora el queso, por ejemplo, ambientes ácidos (pHs cercanos a 4,5), temperaturas altas a las que son sometidas las herramientas de trabajo y la misma cuajada, que debe calentarse con agua a 70°C o también a condiciones higiénicas deficientes en la obtención y manipulación de la leche (Sarantinopoulos *et al.*, 2001). No obstante, su presencia en los quesos no implica *per se* un peligro sanitario, por el contrario, la presencia de enterococos en el queso se ha relacionado con la producción de bacteriocinas (enterocinas) y con la posibilidad de ejercer un efecto probiótico (Franz *et al.*, 1999). Tal es así, que se ha propuesto y considerado el uso de cepas de *Enterococcus* spp. como adjuntas de los cultivos iniciadores

(Sarantinopoulos *et al.*, 2001). No obstante, la EFSA (2013) no considera seguro el uso de *Enterococcus* spp. como adjunto de los cultivos iniciadores debido a la existencia de cepas pertenecientes a este género responsables de infecciones nosocomiales y con elevada resistencia a antibióticos. Sin embargo, recientemente, Buhnik-Rosenblau *et al.* (2013) demostraron que utilizando métodos de tipado adecuados en combinación con técnicas moleculares, es posible separar las cepas de *Enterococcus* spp. de interés tecnológico de otras cepas acompañantes. Estos autores sugieren, que las restricciones de la EFSA sobre el género *Enterococcus* spp. deberían ser revisadas y las restricciones referirse a cepas concretas y no para todo el género.

La segunda especie en importancia fue *Lactobacillus plantarum*, que se aisló en un nivel similar en la leche fresca y en la leche ácida (~20 %), aunque este valor descendió paulatinamente a aproximadamente el 15% y el 10% en cuajada ácida y queso recién elaborado, respectivamente. En relación con *Lactococcus lactis*, esta especie se posicionó en tercer lugar en abundancia. Su porcentaje de aislamiento se mantuvo dentro de un rango comprendido entre el 15 y el 20% en las 3 primeras etapas de elaboración del queso y se produjo un claro incremento en la última etapa (queso recién elaborado) donde casi se duplicó su porcentaje con respecto a las etapas anteriores llegando a ser, en esa etapa, los segundos microorganismos en importancia detrás de *E. faecalis*.

El resto de especies (*Lb. paracasei*, *E. faecium*, *Lb. rhamnosus* y *Le. lactis*) se aislaron con muy bajos porcentajes en las diferentes etapas de elaboración del queso Oaxaca (prevalencia normalmente inferior al 10%). Cabe señalar, no obstante, el repunte de *E. faecium* en el queso recién elaborado, respecto a las otras etapas de fabricación.

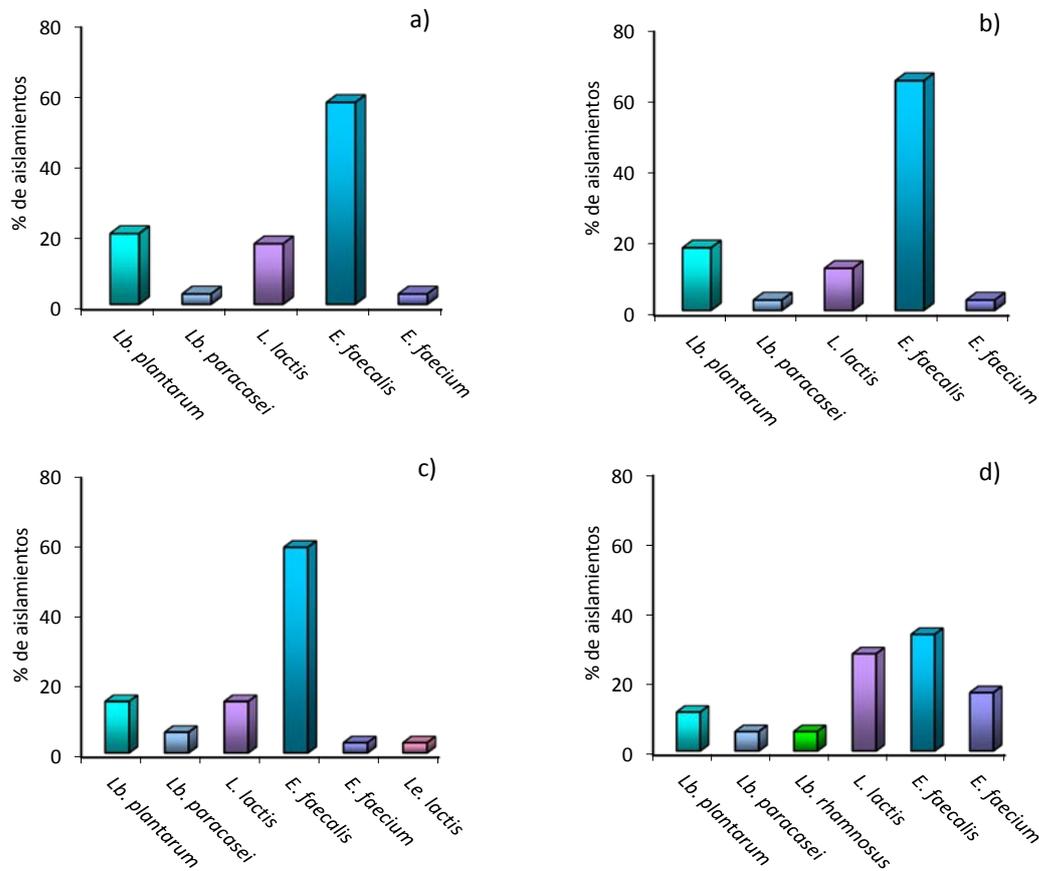


Figura 4.1. Distribución porcentual de cada una de las especies identificadas en función de la etapa de elaboración del queso de la que se obtuvieron a) leche fresca, b) leche ácida, c) cuajada ácida y d) queso recién elaborado.

4.3.4. Filogenia de las cepas aisladas

En las Figuras 4.2 a 4.7 se muestran los árboles filogenéticos o dendogramas obtenidos con las secuencias parciales del gen 16S RNAr de los aislamientos identificados como bacterias ácido-lácticas, construidos mediante los métodos UPGMA y NJ. En los mismos se han incluido, junto con los aislamientos, BAL tipo que actúan como cepas de referencia, permitiendo confirmar los datos de la identificación y evaluar las distancias genéticas relativas entre cepas de referencia y los aislamientos obtenidos en las distintas etapas del proceso de elaboración del queso. Cuando se usó el método NJ, se empleó también una cepa raíz: *Bacillus subtilis*, más alejada filogenéticamente que el resto (Ennahar *et al.*, 2003).

Debido a la elevada cantidad de cepas a analizar, se decidió fraccionar su número en tres grupos y construir los árboles independientes para cada grupo. Un grupo estuvo constituido por las cepas identificadas como *Lactobacillus* spp. (Figs. 4.2 y 4.3), otro por las cepas identificadas como *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. (Figs. 4.4 y 4.5) y el tercero por aquellas identificadas como *Enterococcus* spp. (Figs. 4.6 y 4.7). De las dos figuras correspondientes a cada uno de los tres grupos mencionados, las primeras correspondieron al método UPGMA y las segundas al método NJ.

De la observación de los árboles de *Lactobacillus* spp. (Figs. 4.2 y 4.3) podemos deducir en primer lugar, que se confirman los resultados de la identificación realizada por la técnica genética utilizada, ya que las cepas de referencia y los aislamientos se agruparon en grupos o “clusters” coincidentes con la misma especie. También se puede observar una gran cercanía genética entre las cepas identificadas dentro de la misma especie, con una coincidencia en la secuencia igual o superior al 99%.

Se han establecido agrupaciones (grupos genéticos o taxones) de aislamientos en función de su cercanía genética (Fig. 4.2), tomando como umbral para la pertenencia a un grupo una similitud del 99,5% (los aislamientos del mismo grupo muestran un nodo común situado en la escala de similitud en una posición superior al 99,5% y viceversa). Los aislamientos identificados como *Lb. plantarum* se agrupan en dos grupos genéticos, al igual que los *Lb. paracasei*. Además, hubo dos aislamientos (3 y 54) que no se asignaron a ningún grupo genético. La mayor separación de la cepa de referencia *Lb. casei* ATTC 393 con respecto al grupo de *Lb. casei/paracasei* coincide con las observaciones de Dicks *et al.* (1997), quienes consideraron a cepas intermedias entre ambas especies como una genoespecie (neotipo) diferenciado del grupo de *Lb. casei*. Por otra parte, en el agrupamiento (“cluster”) de *Lb. plantarum* se agruparon las cepas de referencia *Lb. pentosus* y *Lb. plantarum* subsp. *argenteratensis* con un *bootstrap* del 100% para este *cluster*, lo que indica una alta fiabilidad del agrupamiento. Estos resultados son similares a los encontrados por Ennahar *et al.* (2003), quienes encontraron una alta similitud entre las cepas de *Lb. plantarum* y *L. pentosus*, que presentaron según los mencionados autores diferencias únicamente en dos pares de bases. La alta similitud de las secuencias del 16S RNAr entre las dos especies

explicaría que esas bacterias se encuentren en el mismo “cluster”. Así mismo, este hecho confirma que microorganismos con una alta similitud en las secuencias del *16S RNAr*, no podrían ser distinguidas usando un análisis filogenético de este tipo (Hammes y Vogel, 1995).

Los árboles filogenéticos de *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. (Figs. 4.4 y 4.5) confirman, mediante la posición de las cepas de referencia, las identificaciones a nivel de especie realizadas y destacan la gran cercanía genética entre muchos de los aislamientos identificados como *L. lactis* susp. *lactis*. En la Fig. 4 se muestran dos grupos genéticos (el umbral de similitud para la agrupación ha sido el presentar un nodo común por encima del 99%). También hubo una serie de aislamientos identificados como *L. lactis* subsp. *lactis* que no fueron agrupados: 1002, 2016, 1003, 520a, 1007, 1004 (Tabla 4.6). Así mismo, se puede destacar que la cepa 1004 presentó un nodo común con el resto muy a la derecha de la gráfica, indicando diferencia genética característica. Cabe señalar también que la cepa de referencia *L. lactis* subsp. *hordinae* se incluyó dentro del grupo I, al igual que *L. lactis* subsp. *lactis* (NCDO 604).

Los árboles de las cepas identificadas como *Enterococcus* spp. (Figs. 4.6 y 4.7) confirmaron en gran medida los resultados de la identificación a nivel de especie; particularmente el árbol obtenido con el método NJ. Sobre la distancia (diversidad) genética entre cepas del mismo género (*E. faecium* o *E. faecalis*), aunque pequeña, fue en algunos casos considerablemente mayor a la observada para las especies de *Lactobacillus* y *Lactococcus*. En la Fig. 4.6 se establecen 16 grupos genéticos con los aislamientos analizados, tomando como umbral de corte el tener un nodo común por encima del 95% de similitud. Los grupos XV y XVI son los más diferentes al resto (nodo común más a la derecha) y los aislamientos 25 y 27 no pudieron agruparse. El grupo XIV incluye aislamientos agrupados no solo con la cepa de referencia de *E. faecium* sino también con cepas de referencia de otras especies de *Enterococcus*.

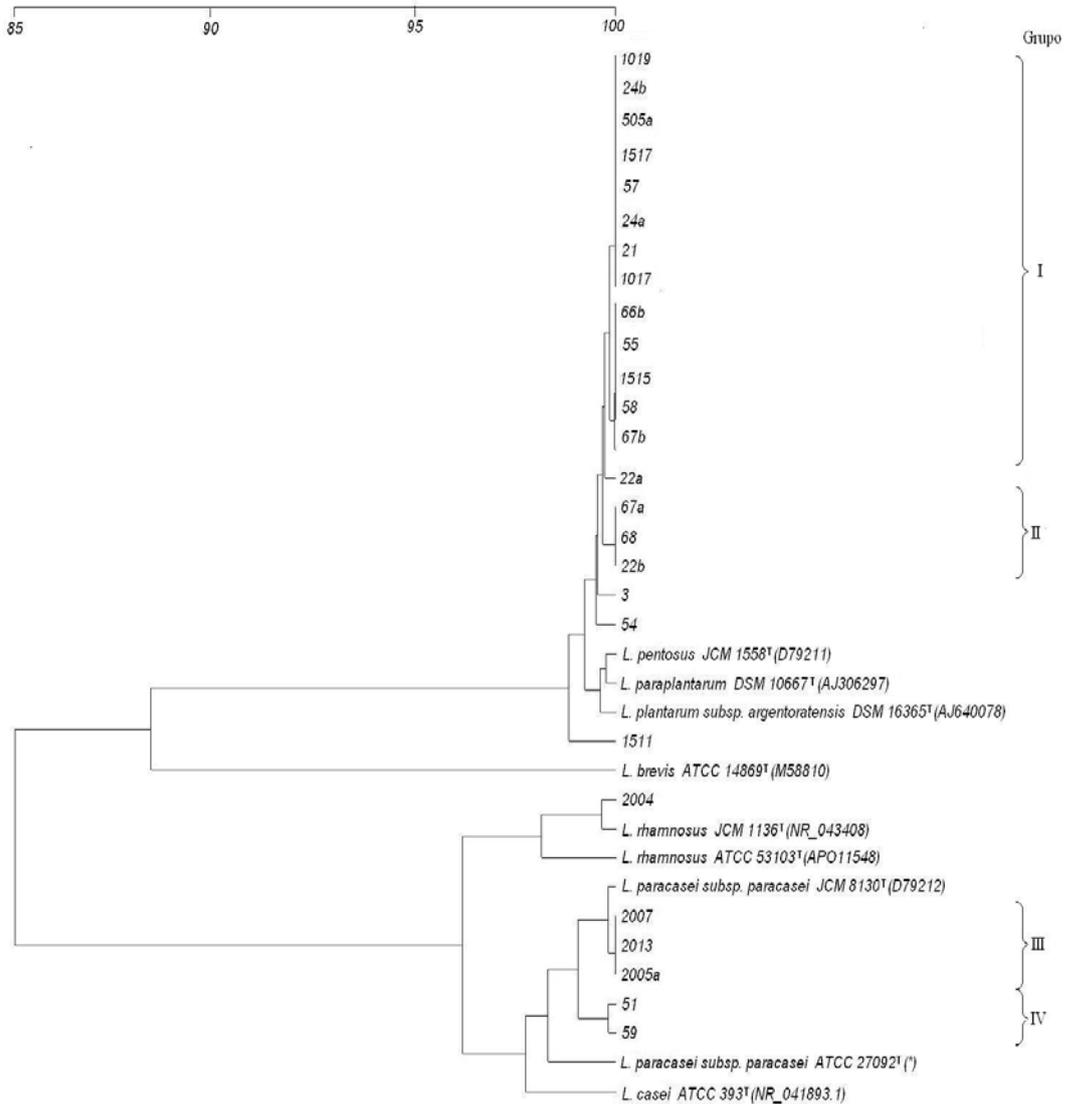


Figura 4.2. Árbol filogenético de los aislamientos identificados como *Lactobacillus* spp. y de diversas cepas de referencia obtenido mediante la comparación de las secuencias parciales (670 pb) del gen *16S rRNA*, utilizando el método de agrupación jerárquica mediante la media aritmética no ponderada “UPMGA”. La escala superior muestra el porcentaje de similitud. ATCC, American Type Culture Collection; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; NCDO, National Collection of Dairy Organisms; JCM, Japan Collection of Microorganisms. (*) cepa de referencia secuenciada en el laboratorio con los cebadores de las secuencias problema.

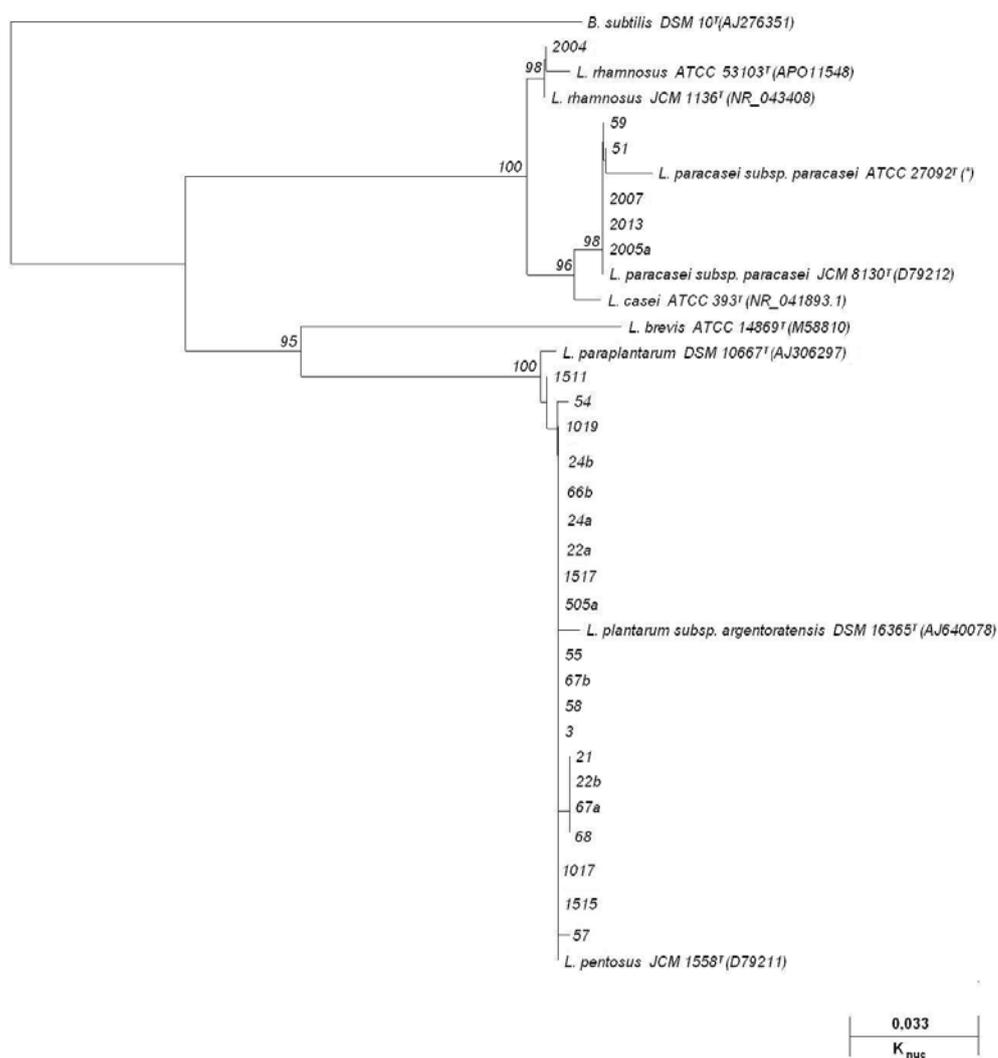


Figura 4.3. Árbol filogenético de los aislamientos identificados como *Lactobacillus* spp. y de diversas cepas de referencia obtenido mediante la comparación de las secuencias parciales (670 pb) del gen *16S RNAr*, utilizando el método del vecino más cercano “Neighbor-joining”. La parte de abajo muestra la distancia K_{nuc} , que representa el grado de coincidencia en nucleótidos entre cepas.

ATCC, American Type Culture Collection; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; NCDO, National Collection of Dairy Organisms; JCM, Japan Collection of Microorganisms. (*) cepa de referencia secuenciada en el laboratorio con los cebadores de las secuencias problema. El valor del “bootstrap” se observa en los nodos del árbol.

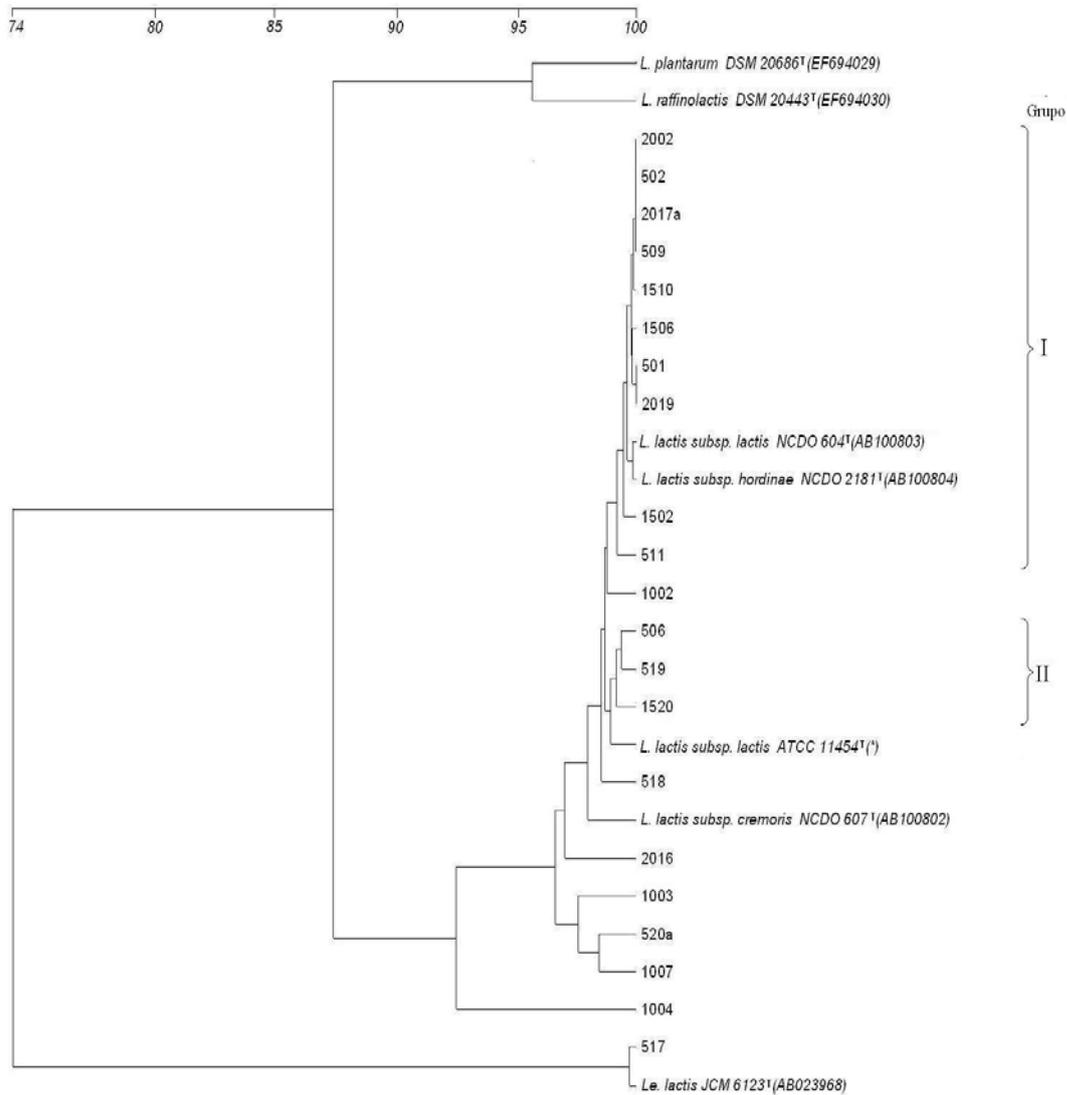


Figura 4.4. Árbol filogenético de los aislamientos identificados como *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. y de diversas cepas de referencia obtenido mediante la comparación de las secuencias parciales (670 pb) del gen *16S rRNA*, utilizando el método de agrupación jerárquica mediante la media aritmética no ponderada “UPMGA”. La escala superior muestra el porcentaje de similitud.

ATCC, American Type Culture Collection; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; NCDO, National Collection of Dairy Organisms; JCM, Japan Collection of Microorganisms. (*) cepa de referencia secuenciada en el laboratorio con los cebadores de las secuencias problema.

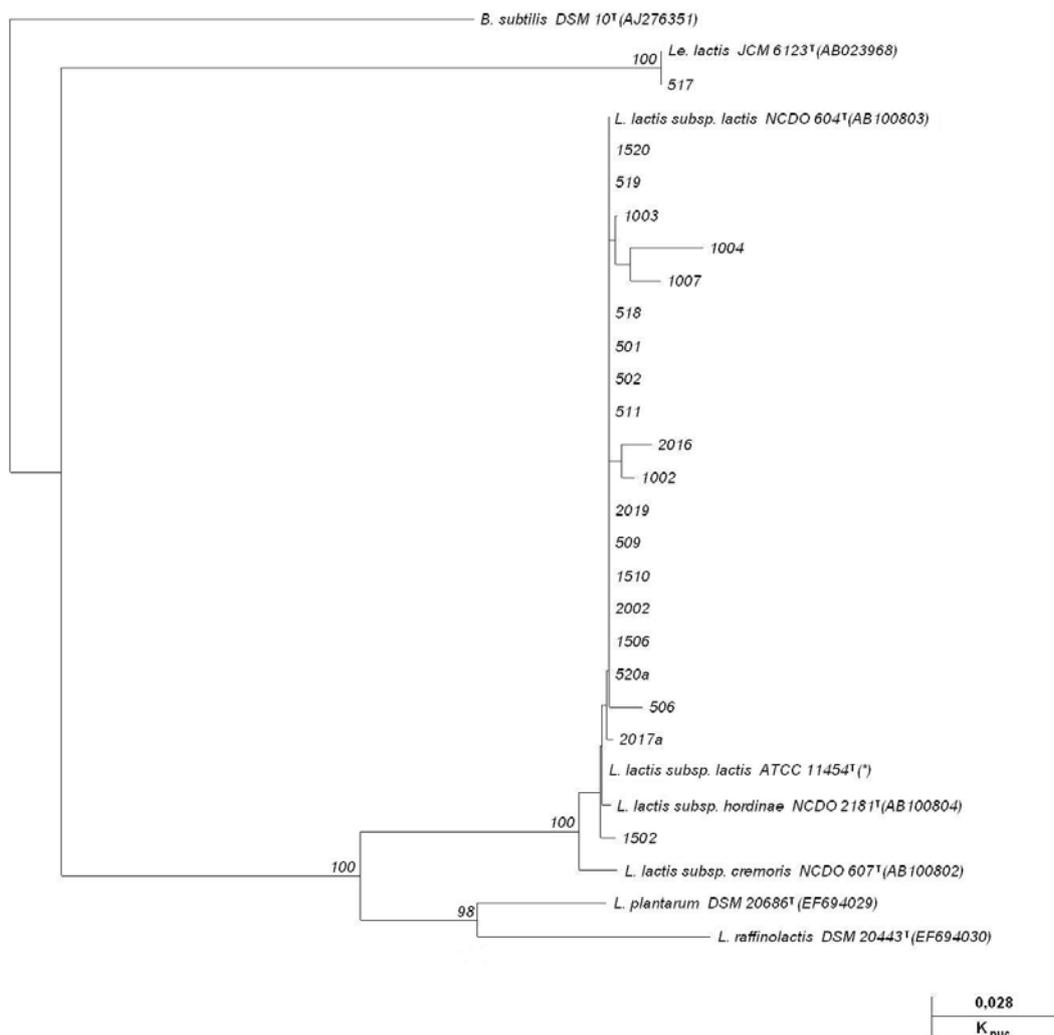


Figura 4.5. Árbol filogenético de los aislamientos identificados como *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. y de diversas cepas de referencia obtenido mediante la comparación de las secuencias parciales (670 pb) del gen *16S RNA*, utilizando el método del vecino más cercano “Neighbor-joining”. La parte de abajo muestra la distancia K_{nuc} , que representa el grado de coincidencia en nucleótidos entre cepas.

ATCC, American Type Culture Collection; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; NCDO, National Collection of Dairy Organisms; JCM, Japan Collection of Microorganisms. (*) cepa de referencia secuenciada en el laboratorio con los cebadores de las secuencias problema. El valor del “bootstrap” se observa en los nodos del árbol.

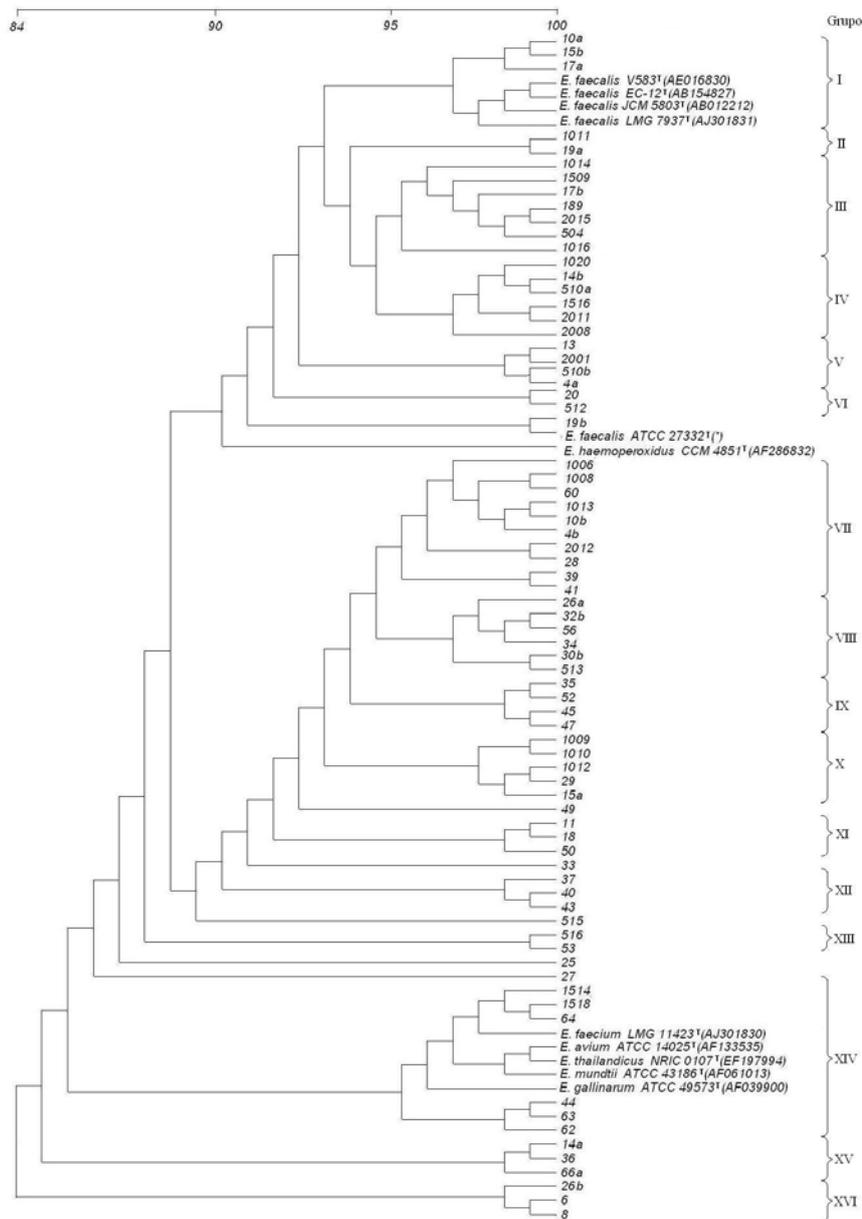


Figura 4.6. Árbol filogenético de los aislamientos identificados como *Enterococcus* spp. y de diversas cepas de referencia obtenido mediante la comparación de las secuencias parciales (670 pb) del gen *16S RNAr*, utilizando el método de agrupación jerárquica mediante la media aritmética no ponderada “UPMGA”. La escala superior muestra el porcentaje de similitud. ATCC, American Type Culture Collection; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; NCDO, National Collection of Dairy Organisms; JCM, Japan Collection of Microorganisms. (*) cepa de referencia secuenciada en el laboratorio con los cebadores de las secuencias problema.

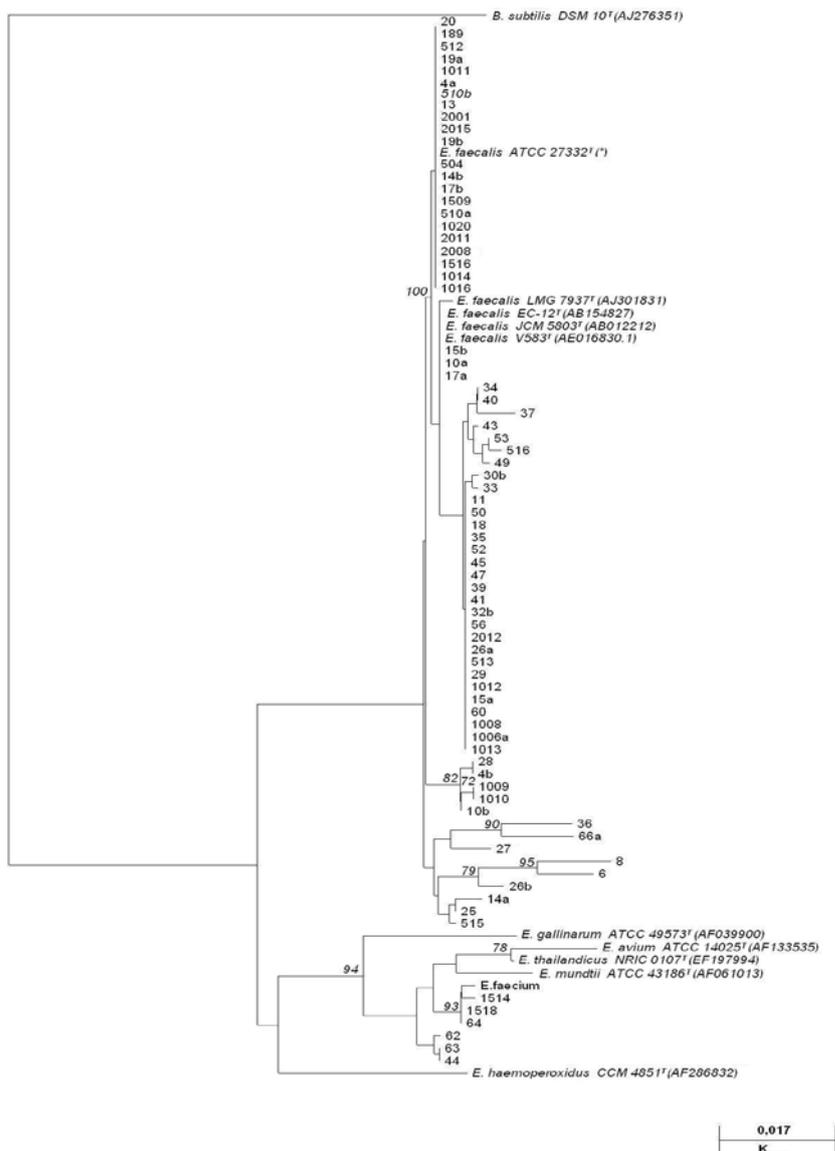


Figura 4.7. Árbol filogenético de los aislamientos identificados como *Enterococcus spp.* y de diversas cepas de referencia obtenido mediante la comparación de las secuencias parciales (670 pb) del gen *16S rRNA*, utilizando el método del vecino más cercano “Neighbor-joining”. La parte de abajo muestra la distancia K_{nuc} , que representa el grado de coincidencia en nucleótidos entre cepas.

ATCC, American Type Culture Collection; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; NCDO, National Collection of Dairy Organisms; JCM, Japan Collection of Microorganisms. (*) cepa de referencia secuenciada en el laboratorio con los cebadores de las secuencias problema. El valor del “bootstrap” se observa en los nodos del árbol.

4.3.5. Características bioquímicas. Fermentación de carbohidratos

En las Tablas 4.7 a 4.9 se muestran los perfiles de utilización de los glúcidos incluidos en el sistema miniaturizado API 50 CH, correspondientes a los aislamientos identificados como *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp., y *Enterococcus* spp., sucesivamente. Además, en las Tablas 4.10 a 4.12 se muestra, a modo de resumen, la capacidad de utilización de esos hidratos de carbono por el conjunto de cepas de cada uno de los grupos genéticos establecidos a partir de los árboles filogenéticos, obtenidos con el gen 16S RNAr, dentro de las distintas especies identificadas. Dicha capacidad está expresada como porcentaje de cepas de cada grupo que mostraron utilización del glúcido correspondiente (Tabla 4.10, *Lactobacillus* spp.; Tabla 4.11, *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp.; Tabla 4.12, *Enterococcus* spp.).

En las Tablas 4.7 y 4.10 se puede observar como todos los aislamientos adscritos al género *Lactobacillus* spp. fueron capaces de utilizar ribosa, glucosa, fructosa, manosa, manitol, sorbitol, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa y melecitosa; y prácticamente todos los aislamientos, con excepción de uno (24 de 25) utilizaron galactosa, N-acetil-glucosamina y gentiobiosa. Además, la mayoría de los aislamientos utilizaron turanosa, tagatosa y gluconato. Por el contrario, la utilización de glicerol, L-arabinosa, L-sorbosa, inositol, metil- α -D-manopiranosas, melibiosa, inulina, rafinosa y almidón, se realizó por más de un aislamiento pero sin llegar al 50%. Además, casi ninguno, con excepción de uno (1 de 25), fue capaz de utilizar D-xilosa, adonitol, metil- β -D-xilopiranosas, dulcitol y metil- α -D-glucopiranosas y ninguno de los aislamientos utilizó eritritol, L-arabinosa, L-xilosa, adonitol, ramnosa, glicógeno, xilitol, xilosa, D- y L-fucosa, D- y L-arabitol, 2- y 5-cetogluconato (dato no mostrado en las tablas). El presente estudio coincide con el de Singh y Singh (2014) en cuanto que todas o la mayor parte de las cepas de lactobacilos aislados de queso utilizaron amigdalina, lactosa, maltosa, salicina, sorbitol, sacarosa, trehalosa o esculina, y en que ninguna o muy pocas cepas utilizaron adonitol, arabinosa, arabitol, dulcitol, eritritol, fucosa, glicógeno, metil- α -D-glucopiranosas y xilosa. En el estudio de Hames y Voggel (1995) se indica que *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* y *Lb. rhamnosus*

(todas estas especies son heterofermentativas facultativas) se caracterizan por fermentar amigdalina, celobiosa, esculina, gluconato, manitol, melecitosa, melobiosa, rafinosa, ribosa, sorbitol y sacarosa. Este patrón de fermentación coincide parcialmente con lo encontrado en el presente estudio, con la diferencia de que en este estudio menos de la mitad de las cepas fermentaron melibiosa y rafinosa. Las causas de estas discrepancias deben atribuirse a la variabilidad intraespecie en el perfil de fermentación y a limitaciones de la metodología empleada, como pueden ser: la falta de reproducibilidad y poder discriminante en el análisis de fermentación de azúcares, o la existencia de confusiones en la identificación en base al gen 16S RNAr entre especies muy cercanas genéticamente (Ostlie *et al.*, 2005).

Las únicas coincidencias entre grupos genéticos en el perfil de utilización de glúcidos por los lactobacilos se observaron en dos parejas de aislamientos en el grupo I y en una del II; además, unas pocas cepas pertenecientes a grupos diferentes mostraron un perfil común (Tabla 4.7). La no coincidencia en el patrón de utilización de hidratos de carbono entre cepas dentro de un mismo grupo genético es esperable ya que no siempre hay coincidencia entre genotipo y fenotipo (Singh y Singh, 2014), lo que es especialmente válido para regiones del genoma conservadas como lo es la región del gen 16S RNAr. Por otra parte, las diferencias entre especies no fueron claras, en parte debido al bajo número de cepas pertenecientes a dos de las tres especies identificadas: lo más remarcable fue la mayor capacidad de usar (porcentaje de aislamientos positivos) glicerol, sorbosa e inulina por parte de las cepas de *Lb. paracasei* con respecto a las de *Lb. plantarum*.

La capacidad de utilización de glúcidos de los aislamientos adscritos a las especies *L. lactis* y *Le. lactis* (Tablas 4.8 y 4.11) se caracterizó por una utilización en el 100% de los casos de ribosa, glucosa, fructosa, manosa, N-acetil-glucosamina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, trehalosa y gentiobiosa; y casi todos con excepción de un aislamiento (1 de 21) utilizaron la galactosa. Además, la mitad o más de la mitad de las cepas utilizaron tagatosa, amigdalina, melecitosa, sorbitol, sacarosa, almidón y manitol. Por el contrario, menos de la mitad de las cepas utilizaron glicerol, gluconato, turanosa, melobiosa, rafinosa, L-arabinosa y sorbosa y ninguna cepa utilizó eritritol, D-arabinosa, D- y L-xilosa, adonitol, metil-β-D-xilopiranosas,

ramnosa, dulcitol, inositol, metil- α -D-manopiranososa, metil- α -D-glucopiranososa, inulina, glicógeno, xilitol, lixosa, D- y L-fucosa, D- y L-arabitol, y 2- y 5-cetogluconato. El perfil de fermentación de *L. lactis* de este trabajo coincide, en gran medida, en cuanto a aquellos glúcidos fermentados por el 100% o casi el 100% de los aislamientos, con lo encontrado en el estudio de Diana *et al.* (2014). No obstante, algunos hidratos de carbono utilizados por un % considerable de cepas de *L. lactis* en el presente estudio (manitol, sorbitol, amigdalina, sacarosa, melicitosa y tagatosa), figuran en el estudio de Diana *et al.* (2014) como fermentación negativa por las cepas de *L. lactis*. También coincide parcialmente el perfil del presente estudio con el perfil mostrado por Teuber (1995): galactosa +, lactosa +, maltosa +, melobiosa -, melicitosa -, rafinosa - y ribosa +. La principal diferencia entre ambos estudios radica en la melicitosa, ya que en el presente estudio se observó fermentación de este azúcar por la mayor parte de los *L. lactis*.

Comparando entre cepas del mismo grupo genético (Tabla 4.8), tampoco hubo coincidencia plena (al igual que observamos previamente para los lactobacilos) en el perfil de utilización de glúcidos dentro de un mismo grupo genético de lactococos. Sólo hubo una pareja de cepas en el grupo I con un perfil común. Además, hubo otra pareja que presentó un mismo perfil (perfil B, Tabla 4.8) pero formada por cepas de diferente grupo genético. También cabe señalar que algunas de las cepas más alejadas genéticamente (con mayores distancias respecto a la media de cepas del mismo género), como es el caso de los aislamientos 1004, 520a y 2016 de *L. lactis* (Figuras 4.4 y 4.5) presentaron patrones de fermentación con algunas diferencias respecto a la mayoría de los aislamientos de esta especie. Así, la cepa 1004 no fermentó el almidón ni la melobiosa y, sin embargo, fermentó el gluconato. Igualmente, la cepa 520a se diferenció del resto porque fermentó la L-arabinosa y la D-rafinosa. Finalmente, la cepa 2016, fue la única cepa de *L. lactis* que fermentó la L-sorbosa.

De las Tablas 4.9 y 4.12 se desprende que los aislamientos de *Enterococcus* spp. utilizaron en el 100% de los casos: glucosa, fructosa, manosa, N-acetil-glucosamina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa y lactosa; y casi todos, con la excepción de uno (73 de 74) utilizaron galactosa, arbutina y ribosa. Además, la mayoría de las cepas utilizaron amigdalina, sacarosa,

manosa, melecitosa, sorbitol, trehalosa, tagatosa, glicerol, getiobiosa y gluconato. Por el contrario, los hidratos de carbono inositol, almidón, L-arabinosa, ramnosa, turanosa, metil- α -D-manopiranososa, melibiosa, rafinosa, L-arabitol, D- y L-fucosa y D-arabitol fueron utilizados por menos de la mitad de las cepas y D-xilosa, sorbosa, dulcitol, inulina; y D-xilosa lo fueron solo por uno de los 74 aislamientos. Finalmente, ninguna cepa utilizó: eritritol, D-arabinosa, L-xilosa, D-adonitol, metil- β -D-xilopiranososa, metil- α -D-glucopiranososa, glicógeno, xilitol y 2- y 5-cetogluconato. Hubo varias cepas del mismo grupo genético con un perfil de utilización de glúcidos idéntico, aunque también mostraron perfiles iguales cepas de distintos grupos (Tabla 4.9). La principal diferencia entre cepas pertenecientes a *E. faecalis* y *E. faecium* fue la mayor capacidad de las primeras en la utilización de sacarosa, manosa, melecitosa y sorbitol, y la mayor capacidad de las segundas en la utilización de L-arabinosa. Estos resultados concuerdan con los de Manero y Blanch (1999) quienes manifiestan que la fermentación de arabinosa y sorbitol permite diferenciar entre *E. faecalis* (no fermenta L-arabinosa y sí sorbitol) y *E. faecium* (sí fermenta arabinosa y no sorbitol).

Comparando la utilización de glúcidos entre lactobacilos, lactococos y enterococos cabe señalar que:

- los lactococos utilizaron el menor número de glúcidos (28, frente a los 36 y 39 utilizados por lactobacilos y enterococos, respectivamente)
- la relativamente alta capacidad de uso del almidón por lactococos (65% de los aislamientos) en relación a lactobacilos y enterococos (20% aproximadamente)
- la mayor capacidad de usar turanosa por lactobacilos (cerca de 75%) con respecto a lactococos y enterococos (menos del 15% de los aislamientos)
- a excepción de los glúcidos mencionados en los anteriores puntos, aquellos más utilizados por una especie coincidieron con los más utilizados por las otras. En este sentido, todos los aislamientos de BAL fermentaron los siguientes glúcidos: glucosa, fructosa, manosa, esculina, salicina, celobiosa, maltosa y lactosa.

El perfil de fermentación de glúcidos, además de proporcionar información sobre las características de las cepas de cara a su descripción o caracterización, proporciona información sobre su aptitud funcional tecnológica. En este sentido, la fermentación, o no, de galactosa es de especial relevancia. La distinta habilidad de las cepas de BAL para fermentar la galactosa (Mukherjee y Hutkins, 1994) influye sobre la concentración de galactosa en el queso como azúcar residual (Wang y Sun, 2003). De esta forma, en quesos donde se desarrollan de forma predominante cepas de lactococos sin capacidad de fermentar la galactosa, se produce una acumulación de la misma. La presencia de galactosa en el queso se ha relacionado con un descenso del pH durante su almacenamiento debido a la fermentación bacteriana de azúcares residuales (como galactosa y otros azúcares fermentables procedentes de fuentes diferentes) (Beresford y Williams, 2004; Rynne *et al.*, 2007). También se ha relacionado la acumulación de galactosa con un pardeamiento del queso durante su horneado.

En el queso Oaxaca, tal y como se observó en el capítulo 3, el descenso del pH durante su almacenamiento no parece positivo, pues favorece la hidratación de las caseínas y la solubilización del calcio lo que, a su vez, empeora la textura. Por otra parte, el color marrón en el queso horneado es un defecto importante en quesos para pizza (Imm *et al.*, 2003). No obstante, el queso Oaxaca normalmente no se utiliza para este fin culinario, sino que se funde a baja temperatura en 'quesadillas' y otros platos típicos donde no hay posibilidad de pardeamiento.

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, probablemente sería adecuado, en caso de seleccionar cepas de lactococos para un posible cultivo iniciador, seleccionar aquellas cepas que fermentan la galactosa con objeto de que quedase en el queso el menor contenido posible de galactosa residual. Esto no supondría un gran problema ya que como se puede observar, la inmensa mayoría de *L. lactis* fueron positivas a la prueba de fermentación de galactosa. Por otra parte, como cepas adjuntas de los cultivos iniciadores se podrían seleccionar aislamientos que no fermenten la galactosa (lo que es más difícil dado que la gran mayoría de *Lactobacillus* spp. y *Enterococcus* spp. dieron positivo a la fermentación de galactosa), ni otros azúcares residuales de

la leche como la arabinosa, para que no la degraden posteriormente durante el almacenamiento y no descienda el pH. No obstante, hacen falta estudios experimentales complementarios al respecto, con el fin de comprobar y sacar conclusiones sobre el efecto del uso de cepas con y sin capacidad para fermentar galactosa sobre las características finales del queso

Tabla 4.7. Perfil de utilización de glúcidos (galería API 50 CH) de las cepas identificadas como *Lactobacillus* spp. por medio de la secuenciación parcial del gen 16S RNAr

CEPA	GR	GLY	LARA	RIB	DXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GEN	TUR	TAG	GNT	PER
<i>Lb. plantarum</i>																																						
21	I	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
24a, 67b	I	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	A
24b	I	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	
55	I	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	
57	I	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	
58, 1515	I	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	B
66b	I	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	
505a	I	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	
1017	I	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	
1517	I	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	
67a, 68	II	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	A
22b	II	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	C
3	SG	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	
22a	SG	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	C
54	SG	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
1511	SG	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>Lb. paracasei</i>																																						
2005a	III	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2007	III	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
2013	III	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
51	IV	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	A
59	IV	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Lb. rhamnosus</i>																																						
2004	SG	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-

GR: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 2); SG, sin grupo asignado. PER: Perfiles con la misma letra indican cepas con mismo patrón de utilización de glúcidos. GLY, Glicerol; LARA, L-Arabinosa; RIB, D-Ribosa; DXYL, D-Xilosa; ADO, D-Adonitol; MDX, Metil-β-D-Xilopiranosas; GAL, D-Galactosa; GLU, D-Glucosa; FRU, D-Fructosa; MNE, D-Manosa; SBE, L-Sorbosa; DUL, Dulcitol; INO, Inositol; MAN, D-Manitol; SOR, D-sorbitol; MDM, Metil-α-D-Manopiranosas; MDG, Metil-α-D-Glucopiranosas; NAG, N-Acetil-glucosamina; AMY, Amigdalina; ARB, Arbutina; ESC, Esculina; SAL, Salicina; CEL, D-Celobiosa; MAL, D-Maltosa; LAC, D-Lactosa; MEL, D-Melibiosa; SAC, D-Sacarosa; TRE, D-Thehalosa; INU, Inulina; MLZ, D-Meleictosa; RAF, D-Rafinosa; AMD, Almidón; GEN, Gentiobiosa; TUR, D-Turanosa; TAG, D-Tagatosa; GNT, Gloconato. Las siguientes pruebas de utilización de glúcidos dieron resultados negativos para todas las cepas y no se incluyeron en la Tabla: ERY, Eritritol; DARA, D-Arabinosa; LXYL, L-Xilosa; RHA, L-Ramnosas; GLYG, Glicógeno; XLT, Xilitol; LYX, D-Lixosa; DFUC, D-Fucosa; LFUC, L-Fucosa; DARL, D-Arabitol; LARL, L-Arabitol; 2KG, 2-Cetogluconato; 5KG, 5-Cetogluconato.

Tabla 4.8. Perfil de utilización de glúcidos (galería API 50 CH) de las cepas identificadas como *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. por medio de la secuenciación parcial del gen 16S RNAr.

CEPA	GR	GLY	LARA	RIB	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	MAN	SOR	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	MLZ	RAF	AMD	GEN	TUR	TAG	GNT	PER	
<i>L. lactis</i>																															
501	I	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	
502, 2017a	I	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	
509	I	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	
511	I	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1502	I	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	?	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	
1506	I	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	
1510	I	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	
2002	I	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	
2019	I	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	
506	II	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	A	
519	II	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	?	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	
1520	II	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	
1002	SG	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
518	SG	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	A	
2016	SG	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
1003	SG	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	?	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
520a	SG	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	
1007	SG	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
1004	SG	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	
<i>Le. lactis</i>																															
517	SG	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	

GR: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 4); SG, sin grupo asignado. PER: Perfiles con la misma letra indican cepas con mismo patrón de utilización de glúcidos. GLY, Glicerol; LARA, L-Arabinosa; RIB, D-Ribosa; GAL, D-Galactosa; GLU, D-Glucosa; FRU, D-Fructosa; MNE, D-Manosa; SBE, L-Sorbosa; MAN; D-Manitol, SOR, D-sorbitol; NAG, N-Acteil-glucosamina; AMY, Amigdalina; ARB, Arbutina; ESC, Esculina; SAL, Salicina; CEL, D-Celobiosa; MAL, D-Maltosa; LAC, D-Lactosa; MEL, D-Melibiosa; SAC, D-Sacarosa; TRE, D-Thehalosa; MLZ, D-Melecitosa; RAF, D-Rafinosa; AMD, Almidón; GEN, Gentiobiosa; TUR, D-Turanosa; TAG, D-Tagatosa; GNT, Gluconato. Las siguientes pruebas de utilización de glúcidos dieron resultados negativos para todas las cepas y no se incluyeron en la Tabla: ERY, Eritritol; DARA, D-Arabinosa; DXYL, D-Xilosa; LXYL, L-Xilosa; ADO, D-Adonitol; MDX, Metil-β-D-Xilopiranosas; RHA, L-Ramnosas; DUL, Dulcitol; INO, Inositol; MDM, Metil-α-D-Manopiranosas; MDG, Metil-α-D-Glucopiranosas; INU, Inulina; GLYG, Glicógeno; XLT, Xilitol; LYX, D-Lixosa; DFUC, D-Fucosa; LFUC, L-Fucosa; DARL, D-Arabitol; LARL, L-Arabitol; 2KG, 2-Cetogluconato; 5KG, 5-Cetogluconato.

Tabla 4.10. Capacidad de utilización de glúcidos por los diferentes grupos genéticos y especies de los aislamientos identificados como *Lactobacillus* spp. por medio de la secuenciación parcial del gen 16S RNAr.

Especie Grupo	<i>Lb. plantarum</i>			<i>Lb. paracasei</i>			<i>Lb. rhamnosus</i>
	I (n=12)	II (n=3)	Total (n=19)	III (n=3)	IV (n=2)	Total (n=5)	Total (n=1)
RIB	100	100	100	100	100	100	100
GAL	100	100	95	100	100	100	100
GLU	100	100	100	100	100	100	100
FRU	100	100	100	100	100	100	100
MNE	100	100	100	100	100	100	100
MAN	100	100	100	100	100	100	100
SOR	100	100	100	100	100	100	100
AMY	100	100	100	100	100	100	100
ARB	100	100	100	100	100	100	100
ESC	100	100	100	100	100	100	100
SAL	100	100	100	100	100	100	100
CEL	100	100	100	100	100	100	100
MAL	100	100	100	100	100	100	100
LAC	100	100	100	100	100	100	100
SAC	100	100	100	100	100	100	100
TRE	100	100	100	100	100	100	100
MLZ	100	100	100	100	100	100	100
NAG	92	100	95	100	100	100	100
GEN	92	100	95	100	100	100	100
TUR	83	100	74	67	100	80	0
GNT	83	67	79	100	100	100	0
TAG	58	0	47	100	50	80	100
LARA	50	100	53	0	100	40	0
MDM	50	100	58	0	50	20	0
GLY	42	0	32	100	50	80	100
MEL	25	0	21	33	0	20	0
RAF	25	0	21	33	0	20	0
INO	17	0	21	0	0	0	0
SBE	8	0	5	67	50	60	0
DXYL	8	0	5	0	0	0	0
MDX	8	0	5	0	0	0	0
INU	8	0	5	67	50	60	0
AMD	0	0	11	33	0	20	100
ADO	0	0	0	33	0	20	0
DUL	0	0	0	33	0	20	0
MDG	0	0	0	0	50	20	0

Grupo: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 2). RIB, D-Ribosa; GAL, D-Galactosa; GLU, D-Glucosa; FRU, D-Fructosa; MNE, D-Manosa; MAN, D-Manitol; SOR, D-sorbitol; AMY, Amígdalina; ARB, Arbutina; ESC, Esculina; SAL, Salicina; CEL, D-Celobiosa; MAL, D-Maltosa; LAC, D-Lactosa; SAC, D-Sacarosa; TRE, D-Thehalosa; MLZ, D-Melecitosa; NAG, N-Acetil-glucosamina; GEN, Gentiobiosa; TUR, D-Turanosa; GNT: Gloconato; TAG, D-Tagatosa; LARA, L-Arabinosa; MDM, Metil- α -D-Manopiranosas; GLY, Glicerol; MEL, D-Melibiosa; RAF, D-Rafinosa; INO, Inositol; SBE, L-Sorbosa; DXYL, D-Xilosa; MDX, Metil- β -D-Xilopiranosas; INU, Inulina; AMD, Almidón; ADO, D-Adonitol; DUL, Dulcitol; MDG, Metil- α -D-Glucopiranosas. Las siguientes pruebas de utilización de glúcidos dieron resultados negativos para todas las cepas y no se incluyeron en la Tabla: ERY, Eritritol; DARA, D-Arabinosa; LXYL, L-Xilosa; RHA, L- Ramnosa; GLYG, Glicógeno; XLT, Xilitol; LYX, D-Lixosa; DFUC, D-Fucosa; LFUC, L-Fucosa; DARL, D-Arabitol; LARL, L-Arabitol; 2KG, 2-Cetogluconato; 5KG, 5-Cetogluconato.

Tabla 4.11. Capacidad de utilización de glúcidos por los diferentes grupos genéticos y especies de los aislamientos identificados como *Lactococcus lactis* y *Leuconostoc lactis* por medio de la secuenciación parcial del gen 16S RNAr

Especie	<i>L. lactis</i>			<i>Le. lactis</i>
	I (n=10)	II (n=3)	Total (n=20)	Total (n=1)
RIB	100	100	100	100
GLU	100	100	100	100
FRU	100	100	100	100
MNE	100	100	100	100
NAG	100	100	100	100
ARB	100	100	100	100
ESC	100	100	100	100
SAL	100	100	100	100
CEL	100	100	100	100
MAL	100	100	100	100
LAC	100	100	100	100
TRE	100	100	100	100
GEN	100	100	100	100
GAL	90	100	95	100
TAG	70	33	70	100
AMY	70	0	65	100
MLZ	70	0	65	100
SOR	60	0	60	100
SAC	60	33	45	100
AMD	50	67	65	0
MAN	50	0	50	100
GLY	40	0	35	100
GNT	30	33	35	0
TUR	20	0	15	0
MEL	20	33	20	100
RAF	20	0	15	0
LARA	0	33	10	100
SBE	0	0	5	0

Grupo: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 4). RIB, D-Ribosa; GLU, D-Glucosa; FRU, D-Fructosa; MNE, D-Manosa; NAG, N-Acetil-glucosamina; ARB, Arbutina; ESC, Esculina; SAL, Salicina; CEL, D-Celobiosa; MAL, D-Maltosa; TRE, D-Thehalosa; GEN, Gentiobiosa; LAC, D-Lactosa; GAL, D-Galactosa; TAG, D-Tagatosa; AMY, Amigdalina; MLZ, D-Melecitosa; SOR, D-sorbitol; SAC, D-Sacarosa; AMD, Almidón; MAN, D-Manitol; GLY, Glicerol; GNT, Gluconato; TUR, D-Turanosa; MEL, D-Melibiosa; RAF, D-Rafinosa; LARA, L-arabinosa; SBE, L-Sorbosa. Las siguientes pruebas de utilización de glúcidos dieron resultados negativos para todas las cepas y no se incluyeron en la Tabla: ERY, Eritritol; DARA, D-Arabinosa; DXYL, D-Xilosa; LXYL, L-Xilosa; ADO, D-Adonitol; MDX, Metil-β-D-Xilopiranosas; RHA, L-Ramnosa; DUL, Dulcitol; INO, Inositol; MDM, Metil-α-D-Manopiranosas; MDG, Metil-α-D-Glucopiranosas; INU, Inulina; GLYG, Glicógeno; XLT, Xilitol; LYX, D-Lixosa; DFUC, D-Fucosa; LFUC, L-Fucosa; DARL, D-Arabitol; LARL, L-Arabitol; 2KG, 2-Cetogluconato; 5KG, 5-Cetogluconato.

Tabla 4.12. Capacidad de utilización de glúcidos por los diferentes grupos genéticos y especies de los aislamientos identificados como *Enterococcus* spp. por medio de la secuenciación parcial del gen 16S RNAr

Especie	<i>E. faecalis</i>															Total (n=67)	<i>E. faecium</i> XIV (n=6)
	I (n=3)	II (n=2)	III (n=6)	IV (n=6)	V (n=4)	VI (n=2)	VII (n=10)	VIII (n=6)	IX (n=4)	X (n=5)	XI (n=3)	XII (n=3)	XIII (n=2)	XV (n=3)	XVI (n=3)		
GLU	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
FRU	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MNE	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
NAG	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ESC	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
SAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
CEL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
LAC	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
GAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	83
ARB	100	100	100	100	100	100	90	100	100	100	100	100	100	100	100	99	100
RIB	100	100	100	100	100	100	100	83	100	100	100	100	100	100	100	99	100
AMY	100	100	100	100	100	100	90	100	100	100	100	100	100	100	100	99	67
SAC	100	100	100	100	100	100	90	100	100	100	67	100	100	100	67	96	33
MAN	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	67	67	97	33
MLZ	100	100	100	100	100	100	90	100	100	100	100	100	100	100	67	97	0
SOR	100	100	100	100	100	100	100	100	75	100	100	100	100	67	67	96	17
TRE	100	100	100	80	100	100	90	100	100	100	67	100	100	67	100	94	83
TAG	100	100	100	100	100	100	90	100	75	100	100	100	100	100	67	94	33
GLY	100	100	83	100	100	50	100	100	75	100	67	100	100	100	67	93	17
GEN	100	50	100	100	100	100	100	100	100	100	67	100	100	100	67	93	83
GNT	100	50	33	40	75	50	60	67	100	80	67	100	50	67	67	67	50
INO	100	50	17	20	25	0	20	17	25	20	0	0	0	67	33	25	0
AMD	67	50	17	0	0	50	20	17	0	0	33	0	0	0	33	19	17
LARA	33	0	0	0	0	0	10	0	25	20	33	0	50	0	0	9	83
RHA	67	0	17	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0
TUR	0	0	0	0	0	0	10	0	25	0	33	0	50	0	0	7	0
MDM	0	0	17	0	0	0	10	0	25	0	0	0	50	0	0	6	17
MEL	0	0	17	0	0	0	20	0	0	20	0	0	0	0	0	6	33
RAF	0	0	17	0	0	0	10	0	0	20	0	0	0	0	0	4	0
LARL	33	0	0	0	0	0	10	0	0	20	0	0	0	0	0	4	0
DFUC	33	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	3	0
LFUC	33	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	3	0
DARL	33	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	3	0
DXYL	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0	1	0

SBE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0	1	0
DUL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	1	0
INU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0	1	0
LYX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	0	1	0

Grupo: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6); SG, sin grupo asignado. PER: Perfiles con la misma letra indican cepas con mismo patrón de utilización de glúcidos. GLU, D-Glucosa; FRU, D-Fructosa; MNE, D-Manosa; NAG, N-Acetil-glucosamina; ESC, Esculina; SAL, Salicina; CEL, D-Celobiosia; MAL, D-Maltosa; LAC, D-Lactosa; GAL, D-Galactosa; ARB, Arbutina; RIB, D-Ribosa; AMY, Amigdalina; SAC, D-Sacarosa; MAN, D-Manitol, MLZ, D-Melecitosa; SOR, D-sorbitol; TRE, D-Thehalosa; TAG, D-Tagatosa; GLY, Glicerol; GEN, Gentiobiosia; GNT, Gluconato; INO, Inositol; AMD, Almidón; LARA, L-Arabinosa; RHA, L-Ramnosa; TUR, D-Turanosa; MDM, Metil- α -D-Manopiranosia; MEL, D-Melibiosia; RAF, D-Rafinosa; LARL, L-Arabitol; DFUC, D-Fucosa; LFUC, L-Fucosa; ; DARL, D-Arabitol; DXYL, D-Xilosa; SBE, L-Sorbosa; DUL, Dulcitol; INU, Inulina; LYX, D-Lixosa. Las siguientes pruebas de utilización de glúcidos dieron resultados negativos para todas las cepas y no se incluyeron en la Tabla: ERY, Eritritol; DARA, D-Arabinosa; LXYL, L-Xilosa; ADO, D-Adonitol; MDX, Metil- β -D-Xilopiranosia; MDG, Metil- α -D-Glucopiranosia; GLYG, Glicógeno, XLT, Xilitol; 2KG, 2-Cetogluconato; 5KG, 5-Cetogluconato.

4.3.6. Características bioquímicas. Actividad enzimática

A continuación se recoge la actividad enzimática de las cepas de bacterias ácido-lácticas de los géneros *Lactobacillus* spp. (Tabla 4.13), *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. (Tabla 4.14), *Enterococcus* spp (Tabla 4.15) y los valores promedio para cada una de las agrupaciones (Tabla 4.16).

El género *Lactobacillus* spp. mostró actividad en los enzimas fosfatasa alcalina, esterasa, esterasa lipasa, lipasa, leucina, valina y cistina arilamidasa, α -quimotripsina, fosfatasa ácida, fosfoamidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa y α -fucosidasa (Tabla 4.13). Por el contrario, no mostró actividad enzimática de: tripsina, β -galactosidasa, β -glucuronidasa y α -manosidasa. A nivel de especies, *Lb. plantarum* presentó una alta actividad (≥ 20 nmol de sustrato) en los enzimas leucina y valina arilamidasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa. *Lb. paracasei* presentó alta actividad en los enzimas: leucina y valina arilamidasa, fosfatasa ácida, α -glucosidasa; mientras que la cepa de *Lb. rhamnosus* la presentó en los enzimas: leucina y valina arilamidasa, esterasa lipasa, quimotripsina, fosfatasa ácida y β -glucosidasa (Tabla 11). La actividad enzimática observada en este trabajo para *Lb. plantarum* fue similar a la descrita por Herreros *et al.* (2003) para cepas de esta especie aisladas de queso español. Sin embargo, en el presente estudio se encontró en los aislamientos actividades β -galactosidasa y N-acetilglucosaminidasa, que no fueron observadas por Herreros *et al.* (2003).

En relación con los géneros *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. (Tabla 4.14), presentaron las siguientes actividades enzimáticas: esterasa, esterasa lipasa, leucina arilamidasa, valina arilamidasa y cistina arilamidasa, quimotripsina, fosfatasa ácida, fosfoamidasa, β -galactosidasa y β -glucosidasa. Sin embargo, no mostraron actividad en los enzimas fosfatasa alcalina, lipasa, tripsina, α -galactosidasa, α -glucosidasa, N-acetilglucosaminidasa, fucosidasa, glucuronidasa, y manosidasa. La actividad de *L. lactis* sólo fue ≥ 20 nmol de sustrato en los enzimas leucina arilamidasa y fosfatasa ácida; y la de la cepa de *L. lactis* en la enzima β -glucosidasa. En general, la actividad enzimática de *L. lactis* se

corresponde con la descrita por Herreros *et al.* (2003) para cepas de *L. lactis* aisladas de queso de la Armada.

En la Tabla 4.15 se muestra la actividad enzimática de los aislamientos del género *Enterococcus* spp. Los enterococos, tanto *E. faecalis* como *E. faecium* presentaron actividad destacable (promedio ≥ 1 nmol de sustrato) para los enzimas esterasa, esterasa lipasa, leucina, valina y cistina arilamidasa, quimotripsina, fosfatasa ácida y fosfoamidasa. Al comparar los resultados del presente estudio entre las dos especies de enterococos, encontramos que en *E. faecalis* la actividad enzimática fue ≥ 20 nmol de sustrato sólo para el enzima leucina arilamidasa y que en el caso de *E. faecium* se encontró actividad para este enzima y para los enzimas esterasa y esterasa lipasa. Estos resultados coinciden con la actividad enzimática principal encontrada en las cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de otros quesos (Nieto-Arribas *et al.*, 2001). En diferentes estudios, al igual que en este, se ha observado que los *Enterococcus* aislados de queso presentan actividad lipolítica sobre el 4-nitrofenil-butirato (C4) y 4-nitrofenil-caprilato (C8), pero no sobre el 4-nitrofenil-miristato (C14). Igualmente se observó una baja actividad de la fosfatasa alcalina, mientras que la actividad de la fosfatasa ácida fue elevada. También coinciden los estudios al señalar que un % de los aislamientos entre 25% y 50% muestran actividad β -galactosidasa, encargada de la hidrólisis de la lactosa.

Dentro de cada especie hubo una considerable variación en la actividad enzimática entre los aislamientos. Estas variaciones se han encontrado en otros trabajos que estudiaron la actividad enzimática de cepas de BAL aisladas de queso (Olivares *et al.*, 1993; Arizcum, 1997).

La actividad enzimática de *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. fue menor en cuanto a enzimas con resultado positivo y actividad de las mismas que la que mostró *Lactobacillus* spp. y *Enterococcus* spp. (Tabla 4.16). De esta tabla también cabe resaltar como principales diferencias entre géneros las siguientes:

- la actividad α -glucosidasa solo se observó en *Lactobacillus* spp.

- la actividad β -galactosidasa promedio tuvo valor positivo en los aislamientos de *Lactobacillus* spp. y *L. lactis* y fue menor de 0,5 en los de *Enterococcus* spp.
- la actividad β -glucosidasa presentó un promedio de 0 en los aislamientos de *Enterococcus* spp. y *L. lactis*, mientras que en los aislamientos de *Lactobacillus* fue positiva
- la actividad tripsina se encontró en la mayoría de los aislamientos de *E. faecalis*, mientras que prácticamente no existió en el resto de las especies
- Las actividades esterasa (C4) y esterasa lipasa (C8) fueron mayores en los aislamientos de *Enterococcus* spp. que en los aislamientos de *Lb. plantarum* y *L. lactis*.
- La actividad valina arilamidasa presentada por los aislamientos de *Lactobacillus* spp. fue mayor que la mostrada por *Enterococcus* spp. y *L. lactis*. Además, *L. lactis* presentó una menor actividad cistina arilamidasa.
- La actividad fosfatasa ácida fue mayor en los aislamientos de *L. lactis* que en los de *Lb. plantarum* y *Enterococcus* spp.

A partir de estas observaciones, hay que resaltar desde un punto de vista tecnológico, la mayor capacidad de los enterococos para hidrolizar ácidos grasos de pequeño tamaño y la menor capacidad de los aislamientos de este género para degradar la lactosa, con respecto a los aislamientos de los otros géneros. Por otra parte, los lactobacilos al tener mayor actividad aminoácido arilamidasa (considerando conjuntamente las actividades leucina, valina y cistina arilamidasa) que el resto de las BAL aisladas (más capacidad aminopeptidasa) podría atribuírseles una mayor capacidad de formar aroma en el queso a partir de los péptidos, así como una mayor capacidad de hidrolizar péptidos amargos (El Soda *et al.*, 1991). Finalmente, debido a la comparativamente elevada actividad fosfatasa ácida, los aislamientos de *L. lactis* degradarían mejor los fosfopéptidos (Fox y McSweeny, 1996).

Tabla 4.13. Actividad enzimática de los aislamientos del queso Oaxaca identificados como *Lactobacillus* spp., obtenida por el sistema API-ZYM (valores entre 0 y 5)*

Cepa	Enzimas ensayadas#																	
	GR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>Lb. plantarum</i>																		
21	I	1	0	1	0	4	3	1	0	0	3	3	1	4	1	4	4	0
24a	I	0	0	0	0	3	3	1	0	0	1	1	0	0	0	1	2	0
24b	I	1	0	1	1	3	4	2	1	0	3	2	1	4	0	4	4	0
55	I	0	2	2	1	4	4	1	0	1	3	3	0	2	2	1	0	0
57	I	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	1	0	2	0	3	3	0
58	I	1	1	1	0	4	3	1	1	0	2	2	0	3	1	4	3	0
27	I	0	2	3	0	3	0	3	0	3	2	3	0	1	0	0	0	0
66b	I	1	0	1	1	3	4	1	1	0	2	2	0	3	1	4	3	0
505a	I	1	1	1	0	2	2	1	1	0	2	2	1	4	3	5	3	0
1017	I	0	1	1	0	4	3	3	0	0	2	1	0	5	4	4	5	0
1517	I	1	0	1	0	3	2	0	0	0	2	2	0	4	3	2	3	0
67a	II	1	0	1	0	4	3	1	0	0	2	2	0	3	1	4	3	0
22b	II	0	1	1	1	4	3	2	0	0	2	1	0	3	1	3	2	0
3	SG	1	1	1	1	4	3	2	0	0	3	3	0	3	1	3	3	0
22a	SG	1	0	1	0	4	3	2	0	0	2	1	0	2	1	2	2	0
54	SG	1	4	3	0	2	0	2	0	2	2	2	0	1	0	0	0	0
1511	SG	1	1	0	1	4	3	2	0	0	1	2	0	4	3	5	3	0
Promedio		1	1	1	0	3	3	2	0	0	2	2	0	3	1	3	3	0
<i>Lb. paracasei</i>																		
2005a	III	1	3	2	1	4	4	3	0	1	3	2	0	3	4	0	0	0
2007	III	1	2	1	2	4	4	2	0	2	4	2	0	1	3	0	0	0
2013	III	1	2	2	1	4	4	2	0	1	4	2	0	1	3	0	0	0
51	IV	0	1	2	1	4	4	3	0	3	3	3	0	2	3	2	0	1
59	IV	1	1	1	1	4	3	2	0	0	3	3	0	3	1	3	3	0
Promedio		1	2	2	1	4	4	2	0	1	3	2	0	2	3	1	1	0
<i>Lb. rhamnosus</i>																		
2004	SG	1	2	3	1	4	4	2	0	3	3	2	0	2	1	4	0	3

GR: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6); SG, sin grupo asignado.

* Valores entre 0 y 5: 0, 0 nmol de sustrato hidrolizado; 1, 5 nmol de sustrato hidrolizado; 2, 10 nmol de sustrato hidrolizado; 3: 20 nmol de sustrato hidrolizado; 4, 30 nmol de sustrato hidrolizado; 5, \geq 40 nmol de sustrato utilizado.

1.-Fosfatasa alcalina, 2.-Esterasa (C4), 3.- Esterasa lipasa (C8), 4.-Lipasa (C14), 5.-Leucina arilamidasa, 6.-Valina arilamidasa, 7.-Cistina arilamidasa, 8.-Tripsina, 9.- α -Quimotripsina, 10.- Fosfatasa ácida, 11.-Fosfoamidasa, 12. α -Galactosidasa, 13.- β -Galactosidasa, 14.- α -Glucosidasa, 15.- β -Glucosidasa, 16.-N-acetil- β -Glucosaminidasa, 17.- α -Fucosidasa. No se incluyeron ni la β -Glucuronidasa, ni la α -Manosidasa en la tabla porque ninguna cepa presentó dichas actividades.

Tabla 4.14. Actividad enzimática de los aislamientos del queso Oaxaca identificados como *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp., obtenida por el sistema API-ZYM (valores entre 0 y 5)*

Cepa	GR	Enzimas ensayadas#																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>L. lactis</i>																		
501	I	0	0	1	0	4	0	0	0	1	4	1	0	0	0	0	0	0
502	I	0	0	1	0	4	0	0	0	0	5	1	0	1	0	0	0	0
509	I	0	4	2	0	4	0	2	0	3	3	1	0	1	0	0	0	0
511	I	0	1	1	0	5	0	0	0	1	5	1	0	1	0	0	0	0
1502	I	0	1	1	0	3	0	0	0	1	4	1	0	0	0	0	0	0
1506	I	0	1	1	0	2	0	1	0	1	4	2	0	1	0	0	0	0
1510	I	0	0	1	0	3	0	0	0	1	5	1	0	1	0	0	0	0
2002	I	0	0	0	0	4	3	2	0	2	4	1	0	5	2	1	0	0
2019	I	0	0	1	0	3	1	1	0	3	3	2	0	2	0	0	0	0
506	II	0	0	0	0	1	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	0	0
519	II	0	0	1	0	2	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0
1520	II	0	1	1	0	3	0	2	0	1	3	1	0	1	0	0	0	0
1002	SG	0	1	0	0	3	1	1	0	1	4	1	0	0	0	0	0	0
518	SG	0	0	0	0	4	1	1	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0
2016	SG	0	0	1	1	4	1	1	0	1	4	2	0	1	2	1	0	0
1003	SG	0	2	1	0	3	0	1	0	2	3	1	0	1	1	0	0	0
520a	SG	0	1	1	0	4	1	1	0	1	4	1	0	4	2	3	3	0
1007	SG	0	3	2	0	4	2	3	0	4	3	2	0	2	0	1	0	0
1004	SG	0	3	2	0	4	1	2	0	4	3	2	0	2	0	0	0	0
Promedio		0	1	1	0	3	1	1	0	1	4	1	0	1	0	0	0	0
<i>Le. lactis</i>																		
517	SG	0	2	1	0	1	0	0	0	0	2	1	2	2	0	3	0	0

GR: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6); SG, sin grupo asignado.

* Valores entre 0 y 5: 0, 0 nmol de sustrato hidrolizado; 1, 5 nmol de sustrato hidrolizado; 2, 10 nmol de sustrato hidrolizado; 3: 20 nmol de sustrato hidrolizado; 4, 30 nmol de sustrato hidrolizado; 5, ≥ 40 nmol de sustrato utilizado.

1.- Fosfatasa alcalina, 2.- Esterasa (C4), 3.- Esterasa lipasa (C8), 4.-Lipasa (C14), 5.-Leucina arilamidasa, 6.-Valina arilamidasa, 7.-Cistina arilamidasa, 8.-Tripsina, 9.-α-Quimotripsina, 10.- Fosfatasa ácida, 11.-Fosfoamidasa, 12. α-Galactosidasa, 13.- β-Galactosidasa, 14.-α-Glucosidasa, 15.- β-Glucosidasa,16.-N-acétil- β-glucosaminidasa, 17.- α-Fucosidasa. No se incluyeron ni la β-Glucuronidasa, ni la α-Manosidasa en la tabla porque ninguna cepa presentó dichas actividades.

Tabla 4.15. Actividad enzimática de los aislamientos del queso Oaxaca identificados como *Enterococcus* spp., obtenida por el sistema API-ZYM (valores entre 0 y 5)*

Cepa	GR	Enzimas ensayadas#																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>E. faecalis</i>																		
10a	I	0	2	2	0	2	1	1	0	1	2	1	0	0	0	0	0	
19a	II	0	1	1	0	4	0	2	0	3	2	2	0	0	0	0	0	
1011	II	0	2	2	0	3	1	2	0	3	3	2	0	0	0	0	0	
17b	III	0	1	2	0	2	1	2	0	3	1	3	0	0	0	0	0	
504	III	0	2	2	0	3	1	2	0	3	2	1	0	0	0	0	0	
1016	III	0	2	3	0	3	1	2	0	3	1	1	0	0	0	0	0	
1509	III	0	1	1	0	3	1	2	0	2	2	2	0	0	0	0	0	
2015	III	0	2	3	0	2	1	2	0	3	1	2	0	0	0	0	0	
510a	IV	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
2008	IV	0	1	1	0	1	0	1	0	2	1	2	0	0	0	0	0	
1516	IV	0	2	2	0	1	0	0	0	2	3	1	0	0	0	0	0	
4a	V	0	2	3	0	2	0	2	0	3	3	3	0	1	0	0	0	
13	V	0	3	2	0	2	0	1	0	2	2	1	0	0	0	0	0	
510b	V	0	3	3	0	3	0	3	0	3	3	3	0	1	1	0	0	
20	VI	0	3	3	1	3	1	2	0	2	3	2	0	1	0	0	0	
4b	VII	0	2	2	0	2	1	1	0	3	2	1	0	0	0	0	0	
10b	VII	0	2	3	1	3	1	3	1	3	2	3	0	1	0	0	0	
28	VII	0	3	3	1	3	1	3	0	3	2	3	0	0	0	0	0	
39	VII	0	2	2	1	3	1	3	0	3	2	3	0	0	0	0	0	
1006	VII	0	3	3	0	3	1	3	0	3	2	2	0	0	1	0	0	
1008	VII	0	2	2	0	2	0	2	0	2	2	2	0	1	0	0	0	
1013	VII	0	2	2	0	3	1	2	0	2	2	2	0	1	0	0	0	
26a	VIII	0	2	2	0	3	1	2	0	2	1	2	0	1	1	0	0	
56	VIII	0	2	2	0	2	0	2	0	3	1	2	0	1	1	0	0	
513	VIII	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	0	0	0	0	0	
35	IX	0	3	3	0	2	0	2	0	2	1	2	0	1	0	0	0	
47	IX	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2	3	0	1	0	0	0	
52	IX	0	1	1	1	4	4	2	0	0	1	1	0	2	1	2	1	
15a	X	0	3	3	0	2	1	2	0	2	1	1	0	1	0	0	0	
29	X	1	3	2	0	2	1	2	0	2	1	2	0	1	0	0	0	
1009	X	1	3	3	1	3	1	3	1	3	2	1	0	1	1	0	0	
1012	X	0	3	2	0	2	1	2	0	3	1	1	0	0	0	0	0	
11	XI	1	3	2	1	2	1	2	1	2	1	2	0	1	0	0	0	
18	XI	1	3	3	1	3	1	3	0	3	2	2	0	1	1	0	0	
50	XI	1	3	3	1	3	1	3	0	3	3	3	0	1	0	0	0	
37	XII	1	2	2	1	2	1	2	0	2	1	2	1	0	0	0	0	
53	XIII	0	3	3	0	2	1	2	0	2	2	1	0	0	1	0	0	
516	XIII	0	3	2	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	
14a	XV	0	2	1	0	2	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
36	XV	1	3	2	0	3	1	2	0	2	1	1	0	1	0	0	0	
66a	XV	0	2	1	0	2	1	2	0	1	2	1	0	0	0	0	0	
6	XVI	1	3	3	0	2	1	2	0	3	3	3	0	1	0	0	0	
8	XVI	0	2	1	1	3	1	2	0	1	2	2	0	0	0	0	0	
26b	XVI	0	3	3	1	2	1	2	0	2	2	2	0	0	0	0	0	
Promedio		0	2	2	0	3	1	2	0	2	2	2	0	0	0	0	0	
<i>E. faecium</i>																		
44	XIV	1	4	4	1	4	1	2	0	2	2	2	0	1	0	0	0	

62	XIV	0	2	2	0	3	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
63	XIV	0	3	3	1	3	1	2	0	3	2	2	0	1	0	0	0	0
64	XIV	1	3	3	1	3	1	2	0	4	2	2	0	1	0	0	0	0
1514	XIV	0	3	3	0	3	1	1	0	2	4	1	0	0	2	0	0	0
1518	XIV	0	3	2	0	3	1	2	0	1	3	2	0	0	0	0	0	0
<i>Promedio</i>		<i>0</i>	<i>3</i>	<i>3</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>2</i>	<i>2</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>

GR: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6); SG, sin grupo asignado.

* Valores entre 0 y 5: 0, 0 nmol de sustrato hidrolizado; 1, 5 nmol de sustrato hidrolizado; 2, 10 nmol de sustrato hidrolizado; 3: 20 nmol de sustrato hidrolizado; 4, 30 nmol de sustrato hidrolizado; 5, \geq 40 nmol de sustrato utilizado.

1.- Fosfatasa alcalina, 2.- Esterasa (C4), 3.- Esterasa lipasa (C8), 4.-Lipasa (C14), 5.-Leucina arilamidasa, 6.-Valina arilamidasa, 7.-Cistina arilamidasa, 8.-Tripsina, 9.- α -Quimotripsina, 10.- Fosfatasa ácida, 11.-Fosfoamidasa, 12. α -Galactosidasa, 13.- β -Galactosidasa, 14.- α -Glucosidasa, 15.- β -Glucosidasa, 16.-N-acétil- β -glucosaminidasa, 17.- α -Fucosidasa. No se incluyeron ni la β -Glucuronidasa, ni la α -Manosidasa en la tabla porque ninguna cepa presentó dichas actividades.

Tabla 4.16. Actividad enzimática* promedio de los diferentes aislamientos de bacterias ácido-lácticas, agrupadas por género y especie

	<i>Lactobacillus</i> spp.			<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	
	<i>Lb. plantarum</i> (n=17)	<i>Lb. paracasei</i> (n=5)	<i>Lb. rhamnosus</i> (n=1)	<i>L. lactis</i> (n=19)	<i>Le. lactis</i> (n=1)	<i>E. faecalis</i> (n=44)	<i>E. faecium</i> (n=6)
1. Fosfatasa alcalina	1	1	1	0	0	0	0
2. Esterasa (C4)	1	2	2	1	2	2	3
3. Esterasa lipasa (C8)	1	2	3	1	1	2	3
4. Lipasa (C14)	0	1	1	0	0	0	0
5. Leucina arilamidasa	3	4	4	3	1	3	3
6. Valina arilamidasa	3	4	4	1	0	1	1
7. Cistina arilamidasa	2	2	2	1	0	2	2
8. Tripsina	0	0	0	0	0	2	0
9. α -Quimotripsina	0	1	3	1	0	2	2
10. Fosfatasa ácida	2	3	3	4	2	2	2
11. Fosfoamidasa	2	2	2	1	1	2	2
12. α -Galactosidasa	0	0	0	0	2	0	0
13. β -Galactosidasa	3	2	2	1	2	0	0
14. α -Glucosidasa	1	3	1	0	0	0	0
15. β -Glucosidasa	3	1	4	0	3	0	0
16. N-acétil- β -glucosaminidasa	3	1	0	0	0	0	0
17. α -Fucosidasa	0	0	3	0	0	0	0

* Valores entre 0 y 5: 0, 0 nmol de sustrato hidrolizado; 1, 5 nmol de sustrato hidrolizado; 2, 10 nmol de sustrato hidrolizado; 3: 20 nmol de sustrato hidrolizado; 4, 30 nmol de sustrato hidrolizado; 5, \geq 40 nmol de sustrato utilizado.

Por otra parte, en las Tablas 4.17, 4.18 y 4.19 se muestran las actividades enzimáticas de los aislamientos de *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* y *Leuconostoc* spp. y *Enterococcus* spp., respectivamente, que fueron asignadas a grupos genéticos, por su proximidad en cuanto a pares de bases de la secuencia del gen 16S RNAr (Fig. 4.6). Según se observa en la Tabla 4.17, no hubo diferencias destacables en la actividad enzimática entre grupos genéticos de los aislamientos de *Lactobacillus* spp. Tampoco hubo diferencias destacables entre los grupos genéticos I y II de *L. lactis* (Tabla 4.18). Finalmente, comparando los grupos genéticos del género *Enterococcus* spp. se encontró una variabilidad notable en la actividad de los enzimas valina y cistina arilamidasa, ya que hubo grupos con actividad de 20 nmoles de sustrato y otros que no mostraron actividad (Tabla 4.19).

Tabla 4.17. Actividad enzimática* de los diferentes grupos genéticos y especies de los aislamientos identificadas como *Lactobacillus* spp. por medio de la secuenciación parcial del gen 16S RNAr

Grupo	<i>Lb. plantarum</i>			<i>Lb. paracasei</i>			<i>Lb. rhamnosus</i>
	I (n=10)	II (N=2)	Total (n=16)	III (n=3)	IV (n=2)	Total (n=5)	Total (n=1)
1. Fosfatasa alcalina	1	1	1	1	1	1	1
2. Esterasa (C4)	1	1	1	2	1	2	2
3. Esterasa lipasa (C8)	1	1	1	2	2	2	3
4. Lipasa (C14)	0	1	0	1	1	1	1
5. Leucina arilamidasa	3	4	3	4	4	4	4
6. Valina arilamidasa	3	3	3	4	4	4	4
7. Cistina arilamidasa	1	2	2	2	3	2	2
8. Tripsina	0	0	0	0	0	0	0
9. α -Quimotripsina	0	0	0	1	2	1	3
10. Fosfatasa ácida	2	2	2	4	3	3	3
11. Fosfoamidasa	2	2	2	2	3	2	2
12. α -Galactosidasa	0	0	0	0	0	0	0
13. β -Galactosidasa	3	3	3	2	2	2	2
14. α -Glucosidasa	2	1	1	3	2	3	1
15. β -Glucosidasa	3	3	3	0	1	1	4
16. N-acétil- β -glucosaminidasa	3	2	3	0	1	1	0
17. α -Fucosidasa	0	0	0	0	0	0	3

Grupo: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6). * Valores entre 0 y 5: 0, 0 nmol de sustrato hidrolizado; 1, 5 nmol de sustrato hidrolizado; 2, 10 nmol de sustrato hidrolizado; 3: 20 nmol de sustrato hidrolizado; 4, 30 nmol de sustrato hidrolizado; 5, \geq 40 nmol de sustrato utilizado.

Tabla 4.18. Actividad enzimática* de los diferentes grupos genéticos y especies de los aislamientos identificados como *Lactococcus spp.* y *Leuconostoc spp.* por medio de la secuenciación parcial del gen 16S RNAr

Grupo	<i>L. lactis</i>			<i>Le. lactis</i>
	I (n=9)	II (n=3)	Total (n=19)	Total (n=1)
1. Fosfatasa alcalina	0	0	0	0
2. Esterasa (C4)	1	1	1	2
3. Esterasa lipasa (C8)	1	1	1	1
4. Lipasa (C14)	0	0	0	0
5. Leucina arilamidasa	3	3	3	1
6. Valina arilamidasa	1	0	1	0
7. Cistina arilamidasa	1	1	1	0
8. Tripsina	0	0	0	0
9. α -Quimotripsina	2	1	1	0
10. Fosfatasa ácida	4	3	4	2
11. Fosfoamidasa	1	1	1	1
12. α -Galactosidasa	0	0	0	2
13. β -Galactosidasa	0	0	1	2
14. α -Glucosidasa	0	0	0	0
15. β -Glucosidasa	0	0	0	3
16. N-acétil- β -glucosaminidasa	0	0	0	0
17. α -Fucosidasa	0	0	0	0

Grupo: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6). * Valores entre 0 y 5: 0, 0 nmol de sustrato hidrolizado; 1, 5 nmol de sustrato hidrolizado; 2, 10 nmol de sustrato hidrolizado; 3: 20 nmol de sustrato hidrolizado; 4, 30 nmol de sustrato hidrolizado; 5, \geq 40 nmol de sustrato utilizado.

Tabla 4.19. Actividad enzimática* de los diferentes grupos genéticos y especies de los aislamientos identificados como *Enterococcus spp.* por medio de la secuenciación parcial del gen 16S RNAr

Grupo	<i>E. faecalis</i>																<i>E. faecium</i>
	I (n=1)	II (n=2)	III (n=5)	IV (n=3)	V (n=3)	VI (n=1)	VII (n=7)	VIII (n=3)	IX (n=3)	X (n=4)	XI (n=3)	XII (n=1)	XIII (n=2)	XV (n=3)	XVI (n=3)	Total (n=44)	XIV (n=6)
1. Fosfatasa alcalina	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
2. Esterasa (C4)	2	2	2	2	3	3	2	2	2	3	3	2	3	2	3	2	3
3. Esterasa lipasa (C8)	2	2	2	2	3	3	2	2	2	3	3	2	2	1	3	2	3
4. Lipasa (C14)	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
5. Leucina arilamidasa	2	3	3	1	3	3	3	2	3	2	3	2	1	2	2	3	3
6. Valina arilamidasa	1	1	1	0	0	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1
7. Cistina arilamidasa	1	2	2	0	2	2	3	2	2	2	3	2	1	2	2	2	2
8. Tripsina	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9. α-Quimotripsina	1	3	3	2	3	2	3	2	1	3	3	2	1	1	2	2	2
10. Fosfatasa ácida	2	2	1	2	3	3	2	1	1	1	3	1	1	2	2	2	2
11. Fosfoamidasa	1	2	2	1	3	2	2	1	2	1	3	2	1	1	2	2	2
12. α-Galactosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
13. β-Galactosidasa	0	0	0	0	1	1	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0
14. α-Glucosidasa	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
15. β-Glucosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16. N-acétil- β-glucosaminidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
17. α-Fucosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Grupo: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6).

* Valores entre 0 y 5: 0, 0 nmol de sustrato hidrolizado; 1, 5 nmol de sustrato hidrolizado; 2, 10 nmol de sustrato hidrolizado; 3: 20 nmol de sustrato hidrolizado; 4, 30 nmol de sustrato hidrolizado; 5, ≥ 40 nmol de sustrato utilizado.

4.3.7. Características tecnológicas

4.3.7.1. Velocidad de acidificación

En las Tablas 4.20 a 4.22 se recogen los resultados de la velocidad de acidificación de las cepas aisladas del queso Oaxaca de los géneros *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. y *Enterococcus* spp., sucesivamente. De acuerdo con Roushdy (1999), la BAL pueden clasificarse en tres clases según su capacidad acidificante: I, cepas que descienden el pH de la leche a valores ≥ 6 ; II, cepas que acidifican la leche hasta valores entre 5,5 y 6 ($6,0 > \text{pH} \geq 5,5$); y III, cepas que acidifican la leche hasta un pH inferior a 5,5.

Los aislamientos de *Lactococcus* spp. (Tabla 4.20), como era de esperar, mostraron la mayor velocidad de acidificación y capacidad acidificante, obteniéndose con ellas un pH final de la leche considerablemente inferior al obtenido con los lactobacilos y enterococos (Tabla 4.21 y 4.22). La gran mayoría de los lactococos, salvo los aislamientos 509, 2017a y 2016, ya a las 6 horas de acidificación se incluirían en la clase III. Además, en promedio, el pH de la leche a las 12 h y 24 h descendió hasta 4,7 y 4,6, respectivamente. Para la fermentación de la leche en el proceso de elaboración de queso es esencial la producción de ácido de forma rápida y suficientemente intensa. Los lactococos seguramente son los responsables principales de la fermentación en la elaboración del queso Oaxaca. En este estudio se ha observado un número de cepas de lactococos con buena capacidad de adificación como es el caso de los aislamientos 1506, 1502, 2019, 1002, 518 y 1004. Todas ellas fueron capaces de hacer descender el pH de la leche hasta valores inferiores a 5,0 en 6 horas y conseguir disminuir el pH en la leche hasta valores de 4,5 o inferiores en 24 horas.

En relación a los lactobacilos, a las 6 horas de incubación, la gran mayoría de los aislamientos se incluirían en la clase II, a las 12 horas aproximadamente la mitad se incluirían de la clase II y la otra mitad en la clase III y a las 24 horas, la mayoría (todas menos dos, 55 y 2005a) se clasificarían en la categoría III. Por otra parte, la velocidad de acidificación de los aislamientos de *Enterococcus* spp. fue

similar a la presentada por los aislamientos *Lactobacillus* spp. El pH promedio de la leche para los aislamientos de *Lactobacillus* spp. y *Enterococcus* spp. a las 6 h, 12 h y 24 h de incubación fue de 5,8, 5,4 y 5,2, respectivamente. Teniendo en cuenta que el pH de la leche de partida fue de 6,4, la acidificación a las 6 h fue de poco más de media unidad, a las 12 h de una unidad y a las 24 h de poco más de una unidad. Estos valores de acidificación para los aislamientos de lactobacilos y enterococos fueron semejantes a los encontrados en otros estudios de cepas de estos géneros aisladas de quesos (Cogan *et al.*, 1997; Morea *et al.*, 1998; Giraffa, 2003; Herreros *et al.*, 2003).

Los resultados indican que la capacidad de acidificación de la mayor parte de los aislamientos de lactobacilos y enterococos no fue suficientemente elevada como para hacer queso Oaxaca (obtener en pocas horas un pH de la cuajada de 5,2) – cabe observar una excepción en la cepa 1514 *E. faecium* (Tabla 4.22). Por lo tanto, esas cepas no podrían utilizarse como cultivos iniciadores por no cumplir con una de sus principales características: una gran capacidad de acidificación (Beresford *et al.*, 2001). Sí que servirían, por el contrario, como cepas adjuntas del cultivo iniciador, con otros fines específicos distintos de la acidificación como: formación de aroma, proteólisis, actividad antimicrobiana, efecto probiótico, etc. (Shakeel-Ur-Rehman *et al.*, 2000).

Tabla 4.20. Velocidad de acidificación de los aislamientos de *Lactobacillus spp.* aisladas del queso Oaxaca (valores medios \pm desviación estándar)

Especies	Grupo	Origen	pH		
			6 h	12 h	24 h
<i>Lb. plantarum</i>					
21	I	CA	5,9 \pm 0,01	5,6 \pm 0,01	5,5 \pm 0,00
24a	I	CA	5,8 \pm 0,01	5,4 \pm 0,01	5,2 \pm 0,00
24b	I	LA	5,8 \pm 0,01	5,4 \pm 0,01	5,2 \pm 0,00
55	I	LA	6,2 \pm 0,03	5,8 \pm 0,01	5,6 \pm 0,01
57	I	LA	5,5 \pm 0,01	5,2 \pm 0,02	5,1 \pm 0,02
58	I	LF	5,3 \pm 0,03	5,3 \pm 0,02	5,2 \pm 0,01
66b	I	LF	6,1 \pm 0,01	5,4 \pm 0,02	5,2 \pm 0,01
67b	I	LA	5,9 \pm 0,01	5,5 \pm 0,02	5,2 \pm 0,02
505a	I	CA	5,8 \pm 0,01	5,1 \pm 0,02	4,8 \pm 0,02
1017	I	Q	5,6 \pm 0,02	5,6 \pm 0,01	5,3 \pm 0,00
1019	II	CA	5,6 \pm 0,02	5,1 \pm 0,01	4,9 \pm 0,02
67a	II	LA	6,1 \pm 0,01	5,6 \pm 0,00	5,3 \pm 0,02
68	II	LF	6,2 \pm 0,17	5,5 \pm 0,02	5,3 \pm 0,03
22b	II	LF	5,8 \pm 0,01	5,6 \pm 0,01	5,5 \pm 0,01
3	SG	LF	5,7 \pm 0,05	5,3 \pm 0,04	5,0 \pm 0,00
22a	SG	LF	5,8 \pm 0,01	5,6 \pm 0,01	5,5 \pm 0,01
54	SG	LF	5,8 \pm 0,02	5,5 \pm 0,01	5,3 \pm 0,03
1511	SG	LA	5,4 \pm 0,01	4,9 \pm 0,02	4,6 \pm 0,01
<i>Promedio</i>			<i>5,8 \pm 0,08</i>	<i>5,4 \pm 0,02</i>	<i>5,2 \pm 0,01</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>					
2004	SG	Q	5,5 \pm 0,03	4,8 \pm 0,01	4,7 \pm 0,70
<i>Lb. paracasei</i>					
2005a	III	CA	6,0 \pm 0,00	5,7 \pm 0,02	5,5 \pm 0,02
2007	III	Q	5,8 \pm 0,01	4,6 \pm 0,02	4,5 \pm 0,00
2013	III	CA	5,9 \pm 0,02	5,5 \pm 0,01	4,9 \pm 0,02
51	IV	LF	6,0 \pm 0,04	5,3 \pm 0,03	5,2 \pm 0,02
59	IV	LA	5,5 \pm 0,02	5,4 \pm 0,01	5,3 \pm 0,04
<i>Promedio</i>			<i>5,8 \pm 0,02</i>	<i>5,3 \pm 0,02</i>	<i>5,1 \pm 0,02</i>

GR: Grupo genético asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6); SG: Sin grupo asignado. LF; leche fresca, LA; leche ácida, CA; cuajada antes del malaxado, Q; queso recién elaborado.

Tabla 4.21. Velocidad de acidificación de los aislamientos de *Lactococcus spp.* y *Leuconostoc spp.* del queso Oaxaca (valores medios \pm desviación estándar)

Especies	Grupo	Origen	pH		
			6 h	12 h	24 h
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>					
501	I	LF	5,2 \pm 0,02	4,8 \pm 0,01	4,7 \pm 0,69
502	I	LF	5,3 \pm 0,03	4,8 \pm 0,01	4,6 \pm 0,02
509	I	Q	5,5 \pm 0,01	4,7 \pm 0,03	4,6 \pm 0,01
511	I	LA	5,1 \pm 0,01	4,7 \pm 0,02	4,6 \pm 0,01
1502	I	LF	4,9 \pm 0,01	4,4 \pm 0,01	4,3 \pm 0,00
1506	I	CA	4,5 \pm 0,73	4,4 \pm 0,02	4,3 \pm 0,00
1510	I	LA	5,1 \pm 0,01	4,7 \pm 0,02	4,6 \pm 0,01
2002	I	LF	5,0 \pm 0,01	4,4 \pm 0,01	4,3 \pm 0,00
2017a	I	CA	5,8 \pm 0,01	4,6 \pm 0,02	4,5 \pm 0,00
2019	I	Q	4,9 \pm 0,02	4,5 \pm 0,04	4,3 \pm 0,00
506	II	CA	5,1 \pm 0,02	4,7 \pm 0,01	4,6 \pm 0,00
519	II	Q	5,3 \pm 0,05	4,6 \pm 0,00	4,6 \pm 0,00
1520	II	LF	5,1 \pm 0,02	4,4 \pm 0,01	4,2 \pm 0,01
1002	SG	LF	4,9 \pm 0,02	4,5 \pm 0,01	4,4 \pm 0,00
518	SG	CA	4,9 \pm 0,01	4,5 \pm 0,01	4,4 \pm 0,00
2016	SG	CA	6,3 \pm 0,00	5,8 \pm 0,23	5,8 \pm 0,02
1003	SG	LA	5,0 \pm 0,00	4,5 \pm 0,01	4,4 \pm 0,00
520a	SG	Q	5,0 \pm 0,01	4,6 \pm 0,01	4,4 \pm 0,00
1004	SG	LA	4,9 \pm 0,00	4,6 \pm 0,00	4,5 \pm 0,01
1007	SG	Q	5,1 \pm 0,00	4,7 \pm 0,01	4,6 \pm 0,00
Promedio			5,2 \pm 0,05	4,7 \pm 0,02	4,6 \pm 0,04
<i>Le. lactis</i>					
517	SG	CA	6,4 \pm 0,00	6,2 \pm 0,02	6,0 \pm 0,00

GR: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6); SG: Sin grupo asignado.

LF; leche fresca, LA; leche ácida, CA; cuajada antes de malaxado, Q; queso recién elaborado.

Tabla 4.22. Velocidad de acidificación de los aislamientos de *Enterococcus spp.* del queso Oaxaca (valores medios \pm desviación estándar)

Especies	Grupo	Origen	6 h	pH	
				12 h	24 h
<i>E. faecalis</i>					
10a	I	CA	5,7 \pm 0,02	5,5 \pm 0,01	5,4 \pm 0,02
15b	I	LA	5,7 \pm 0,01	5,5 \pm 0,00	5,3 \pm 0,01
17a	I	CA	5,9 \pm 0,01	5,4 \pm 0,00	5,3 \pm 0,01
19a	II	CA	5,7 \pm 0,01	5,4 \pm 0,01	5,3 \pm 0,01
1011	II	LF	6,0 \pm 0,02	5,7 \pm 0,03	5,5 \pm 0,01
17b	III	CA	5,9 \pm 0,01	5,4 \pm 0,00	5,3 \pm 0,01
504	III	LA	6,1 \pm 0,01	5,7 \pm 0,01	5,7 \pm 0,01
1014	III	LA	5,8 \pm 0,02	5,5 \pm 0,02	5,2 \pm 0,01
1016	III	CA	5,7 \pm 0,01	5,5 \pm 0,02	5,3 \pm 0,02
1509	III	Q	5,9 \pm 0,01	5,5 \pm 0,01	5,5 \pm 0,01
2015	III	LA	5,8 \pm 0,02	5,2 \pm 0,01	5,0 \pm 0,01
14b	IV	LA	5,8 \pm 0,01	5,6 \pm 0,01	5,5 \pm 0,01
510a	IV	LA	5,9 \pm 0,00	5,5 \pm 0,00	5,3 \pm 0,00
1020	IV	Q	5,9 \pm 0,00	5,5 \pm 0,01	5,3 \pm 0,02
1516	IV	Q	5,8 \pm 0,01	5,3 \pm 0,01	4,9 \pm 0,01
2008	IV	Q	6,0 \pm 0,00	5,6 \pm 0,01	5,3 \pm 0,00
2011	IV	LF	6,0 \pm 0,02	5,6 \pm 0,01	5,4 \pm 0,02
4a	V	LA	5,8 \pm 0,01	5,6 \pm 0,03	5,4 \pm 0,02
13	V	LA	5,7 \pm 0,04	5,6 \pm 0,03	5,4 \pm 0,00
510b	V	LA	5,9 \pm 0,00	5,5 \pm 0,00	5,3 \pm 0,00
2001	V	LF	5,9 \pm 0,02	5,5 \pm 0,02	5,2 \pm 0,01
20	VI	LF	5,8 \pm 0,01	5,4 \pm 0,02	5,2 \pm 0,01
512	VI	LA	5,3 \pm 0,02	4,8 \pm 0,03	4,6 \pm 0,01
4b	VII	LA	5,8 \pm 0,01	5,6 \pm 0,03	5,4 \pm 0,02
10b	VII	CA	5,7 \pm 0,02	5,5 \pm 0,01	5,4 \pm 0,02
28	VII	LF	5,8 \pm 0,01	5,4 \pm 0,01	5,3 \pm 0,01
39	VII	CA	6,0 \pm 0,05	5,5 \pm 0,01	5,3 \pm 0,12
41	VII	CA	5,8 \pm 0,01	5,5 \pm 0,04	5,3 \pm 0,01
60	VII	LF	5,8 \pm 0,01	5,2 \pm 0,02	5,3 \pm 0,03
1006	VII	CA	5,9 \pm 0,03	5,7 \pm 0,01	5,4 \pm 0,02
1008	VII	Q	5,9 \pm 0,02	5,5 \pm 0,01	5,2 \pm 0,00
1013	VII	LA	5,9 \pm 0,01	5,5 \pm 0,00	5,3 \pm 0,01
2012	VII	LF	6,0 \pm 0,01	5,7 \pm 0,00	5,5 \pm 0,01
26a	VIII	CA	5,7 \pm 0,01	5,4 \pm 0,02	5,3 \pm 0,01
30b	VIII	CA	5,9 \pm 0,01	5,1 \pm 0,01	5,1 \pm 0,01
32b	VIII	LF	5,7 \pm 0,01	5,4 \pm 0,01	5,3 \pm 0,01
34	VIII	LA	5,7 \pm 0,01	5,4 \pm 0,01	5,2 \pm 0,01
56	VIII	LF	5,8 \pm 0,03	5,4 \pm 0,01	5,3 \pm 0,02
513	VIII	LF	6,0 \pm 0,03	5,6 \pm 0,01	5,4 \pm 0,01
35	IX	LA	5,7 \pm 0,01	5,4 \pm 0,01	5,1 \pm 0,01
45	IX	CA	5,8 \pm 0,02	5,5 \pm 0,00	5,2 \pm 0,02
47	IX	CA	5,9 \pm 0,01	5,5 \pm 0,01	5,2 \pm 0,74
52	IX	Q	5,6 \pm 0,01	5,3 \pm 0,01	5,2 \pm 0,04
15a	X	LA	5,7 \pm 0,01	5,5 \pm 0,00	5,3 \pm 0,01
29	X	LA	5,7 \pm 0,01	5,4 \pm 0,00	5,2 \pm 0,12
1009	X	Q	6,0 \pm 0,02	5,7 \pm 0,05	5,4 \pm 0,01
1010	X	LF	6,0 \pm 0,01	5,7 \pm 0,01	5,4 \pm 0,00
1012	X	LF	5,8 \pm 0,01	5,5 \pm 0,02	5,3 \pm 0,01
11	XI	LA	5,7 \pm 0,01	5,6 \pm 0,07	5,6 \pm 0,01

18	XI	CA	5,8 ±0,03	5,6 ±0,01	5,4 ±0,01
50	XI	LA	5,9 ±0,01	5,5 ±0,00	5,3 ±0,05
37	XII	CA	5,8 ±0,01	5,4 ±0,01	5,2 ±0,01
40	XII	LA	5,8 ±0,01	5,4 ±0,01	5,2 ±0,02
43	XII	LA	5,8 ±0,03	5,4 ±0,01	5,2 ±0,01
53	XIII	LF	5,7 ±0,03	5,4 ±0,02	5,3 ±0,03
516	XIII	CA	5,9 ±0,01	5,5 ±0,01	5,2 ±0,01
14a	XV	LA	5,8 ±0,01	5,6 ±0,01	5,5 ±0,01
36	XV	CA	5,9 ±0,00	5,3 ±0,02	5,2 ±0,01
66a	XV	LF	5,8 ±0,03	5,6 ±0,02	5,4 ±0,01
6	XVI	LA	5,8 ±0,01	5,6 ±0,00	5,5 ±0,12
8	XVI	LF	5,8 ±0,00	5,4 ±0,01	5,2 ±0,00
26b	XVI	CA	5,7 ±0,01	5,4 ±0,02	5,3 ±0,01
19b	SG	CA	5,7 ±0,01	5,4 ±0,01	5,3 ±0,01
49	SG	LA	5,9 ±0,01	5,6 ±0,03	5,6 ±0,05
33	SG	LF	5,7 ±0,00	5,4 ±0,01	5,3 ±0,01
515	SG	LF	5,3 ±0,02	4,8 ±0,03	4,6 ±0,01
25	SG	LF	5,8 ±0,01	5,6 ±0,01	5,3 ±0,04
27	SG	LF	5,7 ±0,01	5,4 ±0,00	5,3 ±0,00
<i>Promedio</i>			<i>5,8 ±0,01</i>	<i>5,5 ±0,01</i>	<i>5,3 ±0,03</i>
<i>E. faecium</i>					
44	XIV	CA	6,2 ±0,03	6,0 ±0,04	5,7 ±0,01
62	XIV	LF	6,1 ±0,02	5,3 ±0,01	5,2 ±0,04
63	XIV	LA	5,6 ±0,02	5,2 ±0,04	5,1 ±0,01
64	XIV	Q	5,6 ±0,01	5,3 ±0,01	5,3 ±0,01
1514	XIV	Q	5,0 ±0,01	4,6 ±0,02	4,5 ±0,00
1518	XIV	Q	5,2 ±0,01	4,3 ±0,01	4,2 ±0,02
<i>Promedio</i>			<i>5,6 ±0,02</i>	<i>5,1 ±0,02</i>	<i>5,0 ±0,02</i>

GR: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6); SG: Sin grupo asignado.
 LF; leche fresca, LA; leche ácida, CA; cuajada antes de malaxado, Q; queso recién elaborado.

4.3.7.2. Actividad proteolítica

La actividad proteolítica de las cepas de BAL aisladas del queso Oaxaca se presenta en la Tabla 4.23. En ella se recogen solo las cepas positivas a la prueba; mientras que las negativas se listan en el pie de Tabla. Aproximadamente el 30% de los aislamientos del género *Lactobacillus* spp. fueron positivos a la prueba de proteólisis. A nivel de especie 7 de los 18 aislamientos de *Lb. plantarum* y uno de los 5 de *Lb. paracasei* fueron positivos. La actividad proteolítica de los aislamientos positivos fue débil (halos de inhibición pequeños), en general, excepto en el caso de la cepa 2005a de *Lb. paracasei*. La variabilidad en la actividad proteolítica entre cepas de lactobacilos es un aspecto ya descrito en otros estudios (Garabal *et al.*, 2008; Nieto-arribas *et al.*, 2009)

Por otra parte, muy pocos aislamientos de *Lactococcus* spp. fueron positivos para la prueba de proteólisis (14%; 2 de 14). Sin embargo, la actividad proteolítica de esos dos aislamientos fue considerable; la mayor de todas los aislamientos analizados. En otros estudios, al igual que en el presente, se ha encontrado que la actividad proteolítica de los lactococos fue baja, inferior a la de los otros géneros de BAL como lactobacilos o enterococos, y variable entre cepa y cepa (Piraino *et al.*, 2008).

Finalmente, el 30% de los aislamientos de enterococos mostraron actividad proteolítica. Todos los aislamientos positivos pertenecieron a la especie *E. faecalis*; ninguno fue *E. faecium*. La intensidad de la proteólisis mostrada por las cepas positivas no fue elevada, aunque ligeramente mayor que la observada para lactobacilos, lo que coincide con las observaciones de otros estudios de caracterización de enterococos aislados de quesos (Marino *et al.*, 2003).

Uno de los papeles positivos atribuidos a los enterococos en los quesos es su contribución a la formación de aroma, lo que se debe al metabolismo de los citratos y a la actividad proteolítica y lipolítica de este género (Cogan *et al.*, 1997; Suzzi *et al.*, 2000). No obstante, y en concordancia con lo encontrado en este estudio, la actividad proteolítica de los enterococos se puede considerar como débil y hay mucha variación entre cepas (Suzzi *et al.*, 2000; Girafa, 2003). Además, comparando *E. faecalis* con *E. faecium*, los aislamientos de este último especie presentaron una actividad proteolítica inferior los del primero (Suzzi *et al.*, 2000; Sarantinopoulos *et al.*, 2001; Giraffa, 2003). También en concordancia con estudios previos (Giraffa, 2003), no se observó correlación entre la actividad proteolítica de los enterococos y su actividad acidificante.

Tabla 4.23. Evolución de la actividad proteolítica (diámetro de los halos, mm) de los aislamientos de bacterias ácido-lácticas obtenidos del queso Oaxaca*

Cepa	Origen	Grupo	Tiempo de incubación (días)						
			2	4	6	8	10	12	14
<i>Lactobacillus</i> spp.									
<i>Lb. plantarum</i>									
(7/18)#									
21	CA	I	0	0	1,5	1,5	1,5	2,0	2,0
24a	CA	I	0	0	0	1,0	1,5	1,5	1,5
67b	LA	I	0	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
57	LA	I	0	0	0	0	1,0	1,0	1,0
67a	LA	II	0	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
22b	LF	II	0	0	2,0	2,0	2,0	3,0	3,0
22a	LF	SG	0	0	2,0	2,0	2,0	3,0	3,0
<i>Lb. paracasei</i> (1/5)#									
2005a	CA	III	8	10	16	-	-	-	-
<i>Lactococcus</i> spp.									
<i>L. lactis</i> (2/14)#									
1510	LA	I	0	0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
2016	CA	SG	4,0	7,0	10	10	10	10	10
<i>Enterococcus</i> spp.									
<i>E. faecalis</i> (21/68)#									
10a	CA	I	0	1,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
15b	LA	I	0	1,0	2,0	2,0	2,0	3,0	3,0
17a	CA	I	0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
19a	CA	II	0	1,0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0
17b	CA	III	0	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0
14b	LA	IV	0	1,0	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0
13	LA	V	0	1,0	2,0	3,0	3,0	-	-
20	LF	VI	0	0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0
39	CA	VII	0	0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
30b	CA	VIII	0	2,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
32b	LF	VIII	0	0	0	0	0	3,0	3,0
34	LA	VIII	0	0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0
35	LA	IX	0	0	0	4,0	0,4	0,4	0,4
11	LA	XI	0	1,0	2,0	2,0	3,0	3,0	3,0
18	CA	XI	0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
37	CA	XII	0	1,0	2,0	2,0	2,0	3,0	3,0
40	LA	XII	0	0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
14a	LA	XV	0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
36	CA	XV	0	0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
8	LF	XVI	0	1,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
33	LF	SG	0	0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0

GR: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6); SG: Sin grupo asignado.

LF; leche fresca, LA; leche ácida, CA; cuajada antes de malaxado, Q; queso recién elaborado.

Cociente entre cepas de cada especie que mostraron actividad proteolítica (halos) y las que no.

*Las cepas que presentaron actividad proteolítica se muestran en la tabla. El resto de las cepas, que no presentaron actividad proteolítica, se enumeran a continuación.

Lactobacillus spp.: *Lb. plantarum*, grupo I. 24b, 55, 58, 66b, 505a, 1017, 1019, 1515, 1517; grupo II. 68; *Lb. paracasei*, grupo III. 2007, 2013; grupo IV. 51, 56.

Lactococcus spp.: *L. lactis*, Grupo I. 501, 502, 509, 511, 1502, 1506, 2002, 2017a, 2019; grupo II. 506, 519, 1520.

Leuconostoc spp.: *Le. lactis*, 517.

Enterococcus spp.: *E. faecalis*, grupo II. 1011; grupo III. 504, 1014, 1016, 1509, 2015; grupo IV. 510a, 1020, 1516, 2008, 2011; grupo V. 4a, 510b, 2001; grupo VI. 512; grupo VII. 4b, 10b, 28, 41, 60, 1006, 1008, 1013, 2012; grupo VIII. 26a, 32b, 24, 56, 513; grupo IX. 45, 47, 52; grupo X. 15a, 29, 1009, 1010, 1012; grupo XI. 50; grupo XII. 43; grupo XIII. 53, 516; grupo XV. 66a; grupo XVI. 6, 26b; *E. faecium*, grupo XIV. 44, 62, 63, 64, 1514, 1518.

4.3.8. Características de inocuidad de las bacterias ácido-lácticas aisladas

4.3.8.1. Sensibilidad a antibióticos

En este trabajo se utilizó el método de Etest (AB BioDisk) para la evaluación de la sensibilidad de aproximadamente 100 cepas de BAL aisladas del queso Oaxaca frente a 11 antibióticos: ampicilina, bencilpenicilina, vancomicina, cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, estreptomina y ciprofloxacino. Este método permitió determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aislamientos. En la Tablas 4.24, 4.25 y 4.26 se muestra la CMI de las cepas de *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp., y *Enterococcus* spp., respectivamente.

En la Tabla 4.24 se aprecia que la CMI promedio de *Lb. plantarum* fue menor que la de *Lb. paracasei* frente a las penicilinas (ampicilina y bencilpenicilina), el cloranfenicol y los aminoglucósidos (gentamicina, kanamicina y estreptomina); sin embargo, fue mayor frente a la vancomicina, la eritromicina, la tetraciclina y el ciprofloxacino. Comparando la sensibilidad frente a antibióticos (valor promedio) de las cepas de *Lactobacillus* spp. (Tabla 4.24) con las de *Lactococcus* spp. (Tabla 4.25) se observa una mayor sensibilidad de los últimos respecto a los primeros frente a la inmensa mayor parte de los antibióticos. Esta

diferencia fue especialmente elevada para la vancomicina y el ciprofloxacino. Solo en la estreptomicina se observó mayor sensibilidad en los *Lactobacillus* spp.

En relación con los enterococos (Tabla 4.26), la CMI promedio de *E. faecalis* fue superior a la de *E. faecium* frente a todos los antibióticos excepto frente al ciprofloxacino. La diferencia fue especialmente marcada (diez o más veces) en la CMI de la vancomicina, la clindamicina, la kanamicina y la estreptomicina. Sorprende cómo cepas de dos especies del mismo género presentan tan diferente sensibilidad a los antibióticos.

Cuando se compara la sensibilidad frente los antibióticos de los enterococos (Tabla 4.26) con la encontrada en las otras bacterias lácticas (lactobacilos y lactococos; Tablas 4.24 y 4.25), se observa lo siguiente: i) menor sensibilidad de los enterococos frente a ampicilina y bencilpenicilina, clindamicina y eritromicina y a los tres aminoglucosidos (gentamicina, kanamicina y estreptomicina) y ii) mayor sensibilidad de los enterococos frente a vacomicina, tetraciclina y ciprofloxacina.

La diferencia en las CMI (resistencia) encontrada entre especies en el presente trabajo se explica en parte por la resistencia innata y en parte por la resistencia adquirida. Los ensayos de CMI se relacionan con la resistencia innata y adquirida a los antibióticos. Por ejemplo, los enterococos tienen una resistencia innata o intrínseca frente a los aminoglucósidos, lo que se traduce en una elevada CMI en todas las cepas de ese género (Cabrera *et al.*, 2007). La resistencia adquirida por el contrario es lo que hace que unas cepas de un mismo género o especie presenten mayores valores de CMI que otras del mismo género y especie, bien sea por mutación debida a exposición al antibiótico o por adquisición de plásmidos o transposones.

Hay numerosos estudios que establecen la resistencia innata de las especies bacterianas utilizando para ello los puntos de corte o CMI por debajo de las cuales la resistencia se puede considerar innata, mientras que con valores iguales o superiores se considera adquirida (Katla *et al.*, 2001; Danielsen y Wind (2003); Flórez *et al.*, 2005; NCCLS, 2007; SCAN, 2002; EFSA, 2012). El criterio utilizado en estos estudios para establecer los puntos de corte se basa en

determinar la CMI de una población bacteriana, especie por especie, y establecer en qué rango se sitúa la mayor parte de la población y buscar brechas o picos en la distribución de las CMI individuales, asumiendo que la resistencia innata presenta una distribución normal. De esta forma, hay organismos internacionales (NCCLS, SCAN y EFSA) que proponen puntos de corte para establecer que una cepa es, o no, resistente a los antibióticos.

En la Tabla 4.27 se muestra la distribución de las cepas de cada una de las especies en función de su CMI. En esa Tabla también se incluye el % de resistencia que presentaron los aislamientos de cada especie. Los aislamientos fueron caracterizadas como sensibles o resistentes para cada antibiótico específico de acuerdo con los puntos de corte propuestos por diversos los organismos internacionales anteriormente mencionados o en investigaciones relevantes. El aislamiento 24a (*Lb. plantarum*) mostró en el ensayo puntos formados por crecimiento en colonias dentro del halo de inhibición y por eso no se consideró en la Tabla.

La resistencia de los 100 aislamientos ensayados se puede resumir de la siguiente manera:

- I) Centrándose en los antibióticos.
 - Ampicilina: 1 aislamiento de las 100 estudiadas mostró resistencia a la ampicilina, ésta fue de la especie *Lb. plantarum*
 - Bencilpenicilina: 9 aislamientos se consideraron resistentes, todos ellos del género *Lactobacillus* spp.
 - Vancomicina: 20 aislamientos mostraron resistencia a la vancomicina, todos menos uno pertenecieron al género *Lactobacillus* spp.
 - Cloranfenicol: 5 aislamientos resistentes en total, todos de la especie *Lb. paracasei*
 - Clindamicina: 56 aislamiento resistentes; 3 aislamientos del género *Lactobacillus* spp., 3 *Lactococcus lactis* y 50 *E. faecalis* (el total de cepas de *Enterococcus* spp. fue de 58 y de *E. faecalis* 52)
 - Eritromicina: 22 aislamientos resistentes; 3 aislamientos del género *Lactobacillus* spp., 4 *Lactococcus lactis* y 15 *E. faecalis*

- Tetraciclina: 2 aislamientos resistentes; 1 aislamiento *Lb. paracasei* y 1 *E. faecalis* mostraron resistencia.
- Gentamicina: 4 aislamientos resistentes; 2 aislamientos de *Lactobacillus* spp., 1 *Lb. plantarum* y 1 *Lb. paracasei*.
- Kanamicina: 11 aislamientos resistentes; 8 aislamientos de *Lactobacillus* spp. y 3 de *Lactococcus lactis*.
- Estreptomina: 30 aislamientos resistentes; 16 de los 22 aislamientos de *Lactobacillus* spp. y 14 de los de 19 *Lactococcus lactis*.
- Ciprofloxacino: 26 aislamientos resistentes; 15 de los 16 aislamientos de *Lb. plantarum*, 1 *Lb. paracasei*, 5 *E. faecalis* y 5 de los 6 *E. faecium*.

II) Focalizándose en los géneros estudiados

- Lactobacilos: resistencia importante (más del 20% de los aislamientos) frente a (en orden de mayor a menor resistencia): vancomicina, estreptomina, ciprofloxacino, benzilpenicilina y cloranfenicol. La resistencia a los tres primeros antibióticos superó el 70%.
- Lactococos: resistencia importante (más del 20% de los aislamientos) solo frente a estreptomina (68%) y eritromicina (21%); cierta resistencia frente a clindamicina y kamamicina (16%).
- Enterococos: resistencia muy elevada a la clindamicina (86% de los aislamientos de enterococos; 96% de los de *E. faecalis*), importante resistencia (26%) a la eritromicina (todos los aislamientos resistentes de *E. faecalis*) y cierta resistencia al ciprofloxacino (17%; 10% de los aislamientos de *E. faecalis* y 83% de los de *E. faecium*).

Tabla 4.24. Resistencia a antibióticos (concentración mínima inhibitoria, µg/ml*) de los aislamientos del género *Lactobacillus spp.* obtenidos del queso Oaxaca (Etest, AB BioDisk)

Especie/Cepa (GR)	Penicilinas		Glucopéptidos	Fenicoles	Lincosamidas	Macrólidos	Tetraciclinas	Aminoglucósidos			Fluoroquinolonas
	Ampicilina	Bencilpenicilina	Vancomicina	Cloranfenicol	Clindamicina	Eritromicina	Tetraciclina	Gentamicina	Kanamicina	Estreptomicina	Ciprofloxacino
<i>Lb. plantarum</i>											
21 (I)	0,38	0,50	≥ 256	1,0	0,38	0,38	1,5	4,0	≥ 256	192,0	≥ 32
24a (I)	0,19	1,0	≥ 256	1,5	0,38	0,25	1,5	8,0	≥ 256	96,0	≥ 32
24b (I)	0,125	0,75	≥ 256	1,0	-	-	1,0	-	96,0	-	≥ 32
55 (I)	1,5	0,75	≥ 256	2,0	0,094	0,032	0,50	2,0	≥ 256	32,0	3,0
57 (I)	0,75	2,0	≥ 256	1,5	0,032	0,032	3,0	0,75	12,0	8,0	≥ 32
58 (I)	0,25	1,0	≥ 256	1,5	0,047	0,094	2,0	6,0	12,0	12,0	≥ 32
66b (I)	0,38	4,0	≥ 256	2,0	0,38	0,38	3,0	0,50	8,0	8,0	≥ 32
505a (I)	0,50	2,0	≥ 256	1,5	≤0,016	0,016	3,0	0,19	6,0	3,0	16,0
1017 (I)	0,38	3,0	≥ 256	2,0	≤0,016	0,094	4,0	0,50	12,0	8,0	≥ 32
1517 (I)	0,38	3,0	≥ 256	2,0	≤0,016	0,94	3,0	0,38	8,0	6,0	≥ 32
67 (II)	0,50	1,5	≥ 256	2,0	0,38	0,125	3,0	0,75	16,0	8,0	≥ 32
22b (II)	0,50	3,0	≥ 256	1,5	0,032	0,94	3,0	0,75	12,0	8,0	≥ 32
3 (SG)	0,50	3,0	≥ 256	2,0	0,032	0,032	3,0	0,75	16	12	≥ 32
22a (SG)	0,38	2,0	≥ 256	2,0	0,094	0,064	2,0	0,75	16,0	8,0	≥ 32
54 (SG)	0,75	4,0	1,5	2,0	32,0	0,25	0,098	12,0	128,0	192,0	2,0
1511 (SG)	0,75	3,0	≥ 256	2,0	≤0,016	0,125	6,0	0,50	12,0	12,0	≥ 32
Promedio	0,51	2,2	240	1,7	2,24	0,250	2,5	2,52	70,0	40,0	27,0
<i>Lb. paracasei</i>											
2005a (III)	1,5	1,0	≥ 256	3,0	0,032	0,023	0,25	3,0	96,0	32,0	1,5
2007(III)	2,0	2,0	≥ 256	8,0	0,125	0,032	0,75	4,0	192	48,0	1,5
2013 (III)	1,5	3,0	1,5	3,0	64,0	0,25	0,125	24,0	≥ 256	512,0	1,5
51 (IV)	0,38	2,0	≥ 256	2,0	0,047	0,047	4,0	0,75	16,0	12,0	≥ 32
59 (IV)	2,0	1,5	≥ 256	2,0	0,064	0,032	0,38	2,0	128	24,0	1,5
Promedio	1,5	1,9	205	5,6	12,8	0,077	1,10	6,8	138	126	7,6
<i>Lb. rhamnosus</i>											
2004 (SG)	1,0	3,0	1,5	1,5	12,0	2,0	0,125	12,0	96,0	192,0	0,75

* El gradiente máximo de concentración de la tira antimicrobiana es de 32 µg/ml para el ciprofloxacino y bencilpenicilina, 256 µg/ml para el resto excepto para la estreptomina que fue 1024 µg/ml para el resto.

GR: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6); SG: Sin grupo asignado.

-: en el ensayo aparecieron puntos de colonias dentro del halo de inhibición

Tabla 4.25. Resistencia a antibióticos (concentración mínima inhibitoria, µg/ml*) de los aislamientos del género *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. obtenidos del queso Oaxaca (Etest, AB BioDisk)

Especie /Cepa (GR)	Penicilinas		Glucopéptidos	Fenicoles	Lincosamidas	Macrólidos	Tetraciclinas	Aminoglucósidos			Fluoroquinolonas
	Ampicilina	Bencilpenicilina	Vancomicina	Cloranfenicol	Clindamicina	Eritromicina	Tetraciclina	Gentamicina	Kanamicina	Estreptomina	Ciprofloxacina
<i>L. lactis</i>											
501 (I)	0,19	0,125	0,38	1,0	0,032	0,032	0,19	0,25	1,5	6,0	1,5
502 (I)	0,19	0,125	0,25	1,0	0,023	0,023	0,125	0,50	2,5	6,0	1,5
509 (I)	1,0	2,0	2,0	2,0	24,0	3,0	0,19	16,0	96,0	256,0	1,0
511 (I)	0,25	0,125	0,38	1,5	0,064	0,125	0,19	0,75	2,0	12,0	2,0
1502 (I)	0,19	0,125	0,38	2,0	0,047	0,125	0,125	0,75	2,0	8	2,0
1506 (I)	0,25	0,125	0,25	1,0	0,16	0,032	0,25	3,0	1,5	6,0	1,5
1510 (I)	0,25	0,19	0,125	0,75	0,38	0,50	0,064	4,0	12,0	64,0	2,0
2002 (I)	≤0,016	0,19	0,38	1,5	0,047	0,125	0,125	0,75	6,0	24,0	2,0
2019 (I)	0,50	0,25	0,38	1,0	0,047	0,032	0,125	0,75	2,0	16,0	1,5
506 (II)	0,38	0,25	0,25	1,5	0,047	0,064	0,094	0,75	2,0	8,0	0,75
519 (II)	0,38	0,19	0,38	1,5	0,032	0,032	0,19	1,0	3,0	12,0	1,5
1520 (II)	0,25	0,38	0,38	0,38	0,50	0,75	0,064	3,0	2,0	16,0	3,0
1002 (SG)	0,25	0,19	0,25	0,5	0,38	0,75	0,064	0,75	3,0	12,0	2,0
518 (SD)	0,38	0,25	0,094	0,75	0,19	0,75	0,047	3,0	3,0	12,0	1,5
2016 (SG)	0,38	0,125	0,125	1,5	0,032	0,064	0,047	3,0	12,0	64,0	2,0
1003 (SG)	0,25	0,25	0,19	2,0	0,064	1,5	0,38	1,5	1,5	8,0	1,5
520a (SG)	0,25	0,19	0,19	1,0	0,38	0,50	0,047	3,0	3,0	12,0	1,0
1007 (SG)	0,75	2,0	1,5	2,0	32,0	3,0	0,125	12,0	96,0	192,0	0,75
1004 (SG)	0,25	0,50	0,75	1,0	12,0	2,4	0,032	16,0	≥ 256	384,0	1,0
Promedio	0,33	0,40	0,45	1,5	3,71	0,73	0,13	3,72	26,7	58,8	1,6
<i>Le. lactis</i>											
517 (I)	0,38	0,19	0,19	1,5	0,16	1,5	0,38	1,5	1,5	6,0	1,5

*El gradiente máximo de concentración de la tira antimicrobiana es de 32 µg/ml para el ciprofloxacina y bencilpenicilina, 256 µg/ml para el resto excepto para la estreptomina que fue 1024 µg/ml para el resto.

GR: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6); SG: Sin grupo asignado.

Tabla 4.26. Resistencia a antibióticos (concentración mínima inhibitoria, µg/ml*) de los aislamientos del género *Enterococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. obtenidos del queso Oaxaca (Etest, AB BioDisk)

Especie/Cepa (GR)	Penicilinas		Glucopéptidos	Fenicoles	Lincosamidas	Macrólidos	Tetraciclinas	Aminoglucósidos			Fluoroquinolonas
	Ampicilina	Bencilpenicilina	Vancomicina	Cloranfenicol	Clindamicina	Eritromicina	Tetraciclina	Gentamicina	Kanamicina	Estreptomina	Ciprofloxacina
<i>E. faecalis</i>											
10a (I)	1,0	1,5	2,0	3,0	48,0	0,25	0,125	16,0	≥ 256	512,0	3,0
15b (I)	1,0	2,0	1,5	2,0	48,0	0,25	0,125	32,0	≥ 256	384,0	2,0
19a (II)	1,0	3,0	3,0	2,0	48,0	0,25	0,125	32,0	≥ 256	512	3,0
1011 (II)	1,0	2,0	2,0	2,0	48,0	3,0	0,125	12,0	96,0	384,0	1,5
17b (III)	1,0	3,0	2,0	2,0	24,0	0,25	0,125	32,0	≥ 256	512,0	2,0
504 (III)	0,75	1,5	2,0	2,0	32,0	4,0	0,094	24,0	96,0	384,0	1,5
1016 (III)	1,0	3,0	2,0	3,0	32,0	4,0	0,19	16,0	96,0	192,0	0,75
1509 (III)	1,0	3,0	2,0	3,0	32,0	0,25	0,125	16,0	≥ 256	384,0	4,0
2015 (III)	0,75	3,0	2,0	3,0	12,0	3,0	0,125	12,0	48,0	192,0	1,0
14b (II)	1,0	2,0	2,0	2,0	32,0	0,25	0,125	24,0	256,0	384,0	3,0
510a (IV)	0,75	1,5	2,0	1,5	16,0	3,0	0,094	8,0	64,0	128,0	1,0
2008 (IV)	1,0	3,0	1,5	2,0	32,0	3,0	0,125	8,0	64,0	192,0	1,0
1516 (IV)	1,0	3,0	2,0	2,0	32,0	0,19	0,125	24,0	≥ 256	256,0	1,5
4a (V)	0,50	3,0	2,0	2,0	48,0	0,25	0,125	24,0	128,0	384,0	2,0
13 (V)	1,0	3,0	2,0	2,0	24,0	0,125	0,125	24,0	256,0	256,0	1,5
510b (V)	1,5	3,0	2,0	2,0	48,0	3,0	0,125	6,0	96,0	192,0	1,5
20 (VI)	1,0	3,0	3,0	3,0	48,0	0,19	0,098	16	192,0	256,0	2,0
512 (VI)	1,0	2,0	1,5	2,0	48,0	2,0	0,064	12,0	96	192	1,0
4b (VII)	1,0	3,0	2,0	2,0	48,0	0,19	0,125	24,0	128,0	256,0	2,0
10b (VII)	1,5	3,0	3,0	2,0	48,0	0,19	0,19	24,0	≥ 256	384,0	2,0
28 (VII)	1,5	3,0	2,0	2,0	48,0	0,19	0,125	24,0	256,0	384,0	2,0
39 (VII)	1,5	3,0	3,0	3,0	96,0	0,25	0,19	24	≥ 256	384,0	2,0
60 (VII)	1,0	3,0	3,0	2,0	48,0	0,19	0,25	24	192,0	256,0	2,0
1006 (VII)	1,0	3,0	3,0	3,0	48,0	2,0	0,094	16	192,0	256,0	2,0
1008 (VII)	1,0	3,0	1,5	2,0	48,0	3,0	0,094	8,0	48,0	192,0	1,0
1013 (VII)	0,25	0,19	0,38	2,0	0,032	0,094	0,125	0,75	1,5	3,0	1,5
26a (VIII)	0,75	8,0	≥ 256	2,0	0,047	0,047	6,0	0,75	16,0	12,0	
30b (VIII)	1,0	2,0	3,0	2,0	32,0	3,0	0,125	16	128,0	256,0	1,5
56 (VIII)	1,5	2,0	3,0	3,0	32,0	0,19	0,19	24,0	≥ 256	256	2,0

513 (VIII)	0,5	1,0	1,5	3,0	32,0	0,19	0,19	8,0	128,0	192,0	0,75
35 (IX)	1,0	3,0	2,0	3,0	32,0	2,0	0,19	24,0	128,0	256,0	2,0
47 (IX)	1,0	4,0	2,0	3,0	32,0	0,125	0,19	32,0	192,0	256,0	2,0
52 (IX)	1,5	3,0	3,0	3,0	32,0	0,19	0,19	6,0	192,0	384,0	2,0
15a (X)	1,5	3,0	2,0	2,0	48,0	0,19	0,19	32,0	≥ 256	384,0	2,0
29 (X)	1,0	4,0	2,0	3,0	48,0	0,19	0,19	16	192,0	192,0	2,0
1009 (X)	2,0	3,0	2,0	1,5	24,0	2,0	0,125	12,0	128,0	192,0	0,75
1012 (X)	1,5	4,0	2,0	2,0	24,0	2,0	0,19	12,0	96,0	384,0	1,0
11 (XI)	1,5	3,0	3,0	2,0	32,0	0,094	0,38	16,0	192,0	128,0	1,5
18 (XI)	1,5	6,0	3,0	3,0	32,0	0,125	0,25	16,0	128,0	256,0	2,0
50 (XI)	1,5	4,0	2,0	3,0	24,0	0,125	0,19	16,0	256,0	256,0	1,5
37 (XII)	1,5	4,0	3,0	3,0	48,0	0,125	0,50	16,0	128,0	256,0	2,0
53 (XIII)	1,0	3,0	2,0	2,0	128,0	0,125	0,19	12,0	192,0	256,0	3,0
516 (XIII)	1,0	3,0	2,0	1,5	24,0	3,0	0,094	16,0	96,0	96,0	1,5
14a (XV)	1,0	4,0	3,0	3,0	32,0	0,125	12,0	12,0	256,0	512,0	1,5
36 (XV)	1,0	2,0	1,5	3,0	32,0	0,125	0,125	8,0	64,0	128,0	0,75
66a (XV)	1,5	4,0	2,0	3,0	24,0	0,125	0,25	12,0	128,0	256,0	2,0
19b (XV)	1,5	4,0	3,0	3,0	32,0	0,125	0,25	8,0	192,0	384,0	2,0
25 (SG)	2,0	3,0	3,0	3,0	48,0	0,19	0,38	16,0	128,0	256,0	2,0
49 (SG)	1,5	3,0	-	1,5	32,0	0,094	0,19	16,0	96,0	192,0	-
6 (XVI)	2,0	4,0	3,0	3,0	24,0	0,19	0,25	8,0	96,0	256,0	1,5
8 (XVI)	1,5	3,0	3,0	2,0	32,0	0,032	0,38	24,0	128,0	192,0	2,0
26b (XVI)	1,5	4,0	2,0	2,0	24,0	0,19	0,19	8,0	192,0	384,0	1,5
Promedio	1,2	3,0	7,2	2,4	37,3	0,93	0,51	16,7	160,0	276,6	1,8
<i>E. faecium</i>											
44 (XIV)	0,25	0,19	0,50	2,0	0,19	0,125	0,094	3,0	24,0	48,0	3,0
62 (XIV)	0,38	0,75	1,0	2,0	0,125	0,125	0,19	2,0	12,0	24,0	4,0
63 (XIV)	0,38	0,50	0,50	2,0	0,094	0,19	0,125	3,0	12,0	32,0	3,0
64 (XIV)	0,38	3,0	1,0	1,5	2,0	0,19	0,125	3,0	8,0	16,0	0,75
1514 (XIV)	0,25	0,25	0,50	1,5	0,25	0,19	0,125	1,5	4,0	16,0	8,0
1518 (XIV)	0,38	0,75	0,75	1,5	0,064	0,125	0,125	2,0	12,0	24,0	4,0
Promedio	0,34	0,91	0,71	1,75	0,454	0,158	0,131	2,4	12,0	26,7	3,79

* El gradiente máximo de concentración de la tira antimicrobiana es de 32 µg/ml para el ciprofloxacino y bencilpenicilina, 256 µg/ml para el resto excepto para la estreptomicina que fue 1024 µg/ml para el resto.

GR: Grupo asignado a partir de los árboles filogenéticos (Fig. 6); SG: Sin grupo asignado.

-: en el ensayo aparecieron puntos de colonias dentro del halo de inhibición

Tabla 4.27. Distribución de los aislamientos de queso Oaxaca en función de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) frente a 11 agentes antimicrobianos (Etest; AB BioDisk)

	Especies	Número de cepas distribuidas en función de su concentración mínima inhibitoria (µg/ml)													n	Resistencia*	
		≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128			256
Ampicilina	<i>Lb. plantarum</i>			1	2	9	3	1								16	6 (2 ^{a,b})
	<i>Lb. paracasei</i>					1		4								5	0 (4 ^{a,c})
	<i>Lb. rhamnosus</i>						1									1	0 (4 ^{a,c})
	<i>L. lactis</i>	1			11	5	2									19	0 (2 ^a)
	<i>Le. lactis</i>					1										1	0 (2 ^a)
	<i>E. faecalis</i>				1	2	29	20								52	0 (8 ^b)
	<i>E. faecium</i>				2	4										6	0 (8 ^b)
Bencilpenicilina	<i>Lb. plantarum</i>					1	4	4	7							16	44 (4 ^c)
	<i>Lb. paracasei</i>						1	3	1							5	20 (4 ^c)
	<i>Lb. rhamnosus</i>								1							1	100 (4 ^c)
	<i>L. lactis</i>			6	9	2		2								19	0 (4 ^e)
	<i>Le. lactis</i>				1											1	0 (4 ^e)
	<i>E. faecalis</i>			1			1	10	38	2						52	0 (16 ^d)
	<i>E. faecium</i>				2	1	2		1							6	0 (16 ^d)
Vancomicina	<i>Lb. plantarum</i>							1						15		16	94 (4 ^{b,c})
	<i>Lb. paracasei</i>							1						4		5	80 (4 ^{b,c})
	<i>Lb. rhamnosus</i>							1								1	0 (4 ^{b,c})
	<i>L. lactis</i>			3	6	7	1	2								19	0 (4 ^a)
	<i>Le. lactis</i>				1											1	-
	<i>E. faecalis</i>					1		32	17					1		51	2 (8 ^b)
	<i>E. faecium</i>					3	3									6	0 (8 ^b)
Cloranfenicol	<i>Lb. plantarum</i>						2	14								16	0 (8 ^a)
	<i>Lb. paracasei</i>							2	1	2						5	60 (4 ^a)
	<i>Lb. rhamnosus</i>							1								1	0 (4 ^a)
	<i>L. lactis</i>					2	8	9								19	0 (8 ^a)
	<i>Le. lactis</i>							1								1	0 (4 ^a)
	<i>E. faecalis</i>							30	22							52	0 (16 ^b)
	<i>E. faecium</i>							6								6	0 (16 ^{a,b})
Clindamicina	<i>Lb. plantarum</i>	7	1	2		4					1					15	0 (1 ^a)
	<i>Lb. paracasei</i>	1	2	1								1				5	20 (1 ^a)
	<i>Lb. rhamnosus</i>											1				1	100 (1 ^a)
	<i>L. lactis</i>	4	6	1	1	4						1	2			19	16 (1 ^a)
	<i>Le. lactis</i>				1											1	0 (1 ^a)
	<i>E. faecalis</i>	1	1								2	28	18	2		52	96 (1 ^a)
<i>E. faecium</i>		1	2	2			1								6	0 (4 ^a)	
Eritromicina	<i>Lb. plantarum</i>	4	1	4	2	2	2									15	13 (1 ^a)

	<i>Lb. paracasei</i>	3	1		1									5	0 (1 ^a)			
	<i>Lb. rhamnosus</i>						1							1	100 (1 ^a)			
	<i>L. lactis</i>	5	2	3		2	3	2	2					19	37 (1 ^a)			
	<i>Le. lactis</i>							1						1	100 (1 ^a)			
	<i>E. faecalis</i>	1	1	13	22			5	10					52	20 (4 ^b)			
	<i>E. faecium</i>			3	3									6	0 (4 ^{a,b})			
Tetraciclina	<i>Lb. plantarum</i>			1		1	1	4	8	1				16	0 (32 ^a)			
	<i>Lb. paracasei</i>			1	1	1	1		1					5	20 (4 ^a)			
	<i>Lb. rhamnosus</i>			1										1	0 (8 ^a)			
	<i>L. lactis</i>	1	6	6	5	1								19	0 (4 ^a)			
	<i>Le. lactis</i>					1								1	0 (8 ^a)			
	<i>E. faecalis</i>		1	25	20	4				1	1			52	2 (16 ^b)			
	<i>E. faecium</i>			5	1									6	0 (4 ^a)			
Gentamicina	<i>Lb. plantarum</i>				1	4	5	1	1	2	1			15	7 (16 ^a)			
	<i>Lb. paracasei</i>						1	1	2			1		5	20 (32 ^a)			
	<i>Lb. rhamnosus</i>									1				1	0 (16 ^a)			
	<i>L. lactis</i>				1	1	7	1	6		3			19	0 (32 ^a)			
	<i>Le. lactis</i>							1						1	0 (16 ^a)			
	<i>E. faecalis</i>						2			10	22	18		52	0 (500 ^b)			
	<i>E. faecium</i>							3	3					6	0 (32 ^a)			
Kanamicina ^c	<i>Lb. plantarum</i>									3	8		1	3	15	27 (64 ^a)		
	<i>Lb. paracasei</i>										1		2	2	5	80 (64 ^a)		
	<i>Lb. rhamnosus</i>											1			1	0 (64 ^a)		
	<i>L. lactis</i>							9	4	1	2		2	1	19	16 (64 ^a)		
	<i>Le. lactis</i>							1							1	0 (16 ^a)		
	<i>E. faecalis</i>							1			1	5	20	25	52	0 (1024 ^b)		
	<i>E. faecium</i>						1	1	1	3	1				6	0 (1024 ^a)		
Estreptomicina	<i>Lb. plantarum</i>									1	7	3	1	1	2	16	50 (16 ^b)	
	<i>Lb. paracasei</i>											1	2	1	1	5	100 (32 ^a)	
	<i>Lb. rhamnosus</i>														1	100 (64 ^b)		
	<i>L. lactis</i>										6	7	1	2	1	2	19	68 (32 ^a)
	<i>Le. lactis</i>										1					1	0 (64 ^a)	
	<i>E. faecalis</i>						1				1		4	28	18	52	0 (1024 ^b)	
	<i>E. faecium</i>										2	3	1			6	0 (1024 ^b)	
Ciprofloxacino	<i>Lb. plantarum</i>							1	1		1	13				16	94 (4 ^b)	
	<i>Lb. paracasei</i>							4				1				5	20 (4 ^b)	
	<i>Lb. rhamnosus</i>						1									1	0 (4 ^b)	
	<i>L. lactis</i>						5	13	1							19	5 (4 ^a)	
	<i>Le. lactis</i>							1								1	0 (4 ^e)	
	<i>E. faecalis</i>						10	35	5							50	10 (4 ^d)	
	<i>E. faecium</i>						1	4	1							6	83 (4 ²)	

n=número total de cepas analizadas

*: Resistencia, % de cepas resistentes de cada especie para cada antibiótico (el punto de corte considerado va incluido entre paréntesis). Los superíndices indican la referencia de los puntos de corte considerados: ^(a) EFSA (2012) para *Lb. plantarum/pentosus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei/paracasei*, *Leuconostoc*, *L. lactis* y *E. faecium*; ^(b) SCAN (2002) para *Lactobacillus*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*; ^(c) Danielsen and Wind (2003) para *Lactobacillus*; ^(d) NCCLS (2007) para *Enterococcus* spp; ^(f) Katla *et al.* (2001) para *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*; ^(g) Flórez *et al.* (2005) para bacterias ácido lácticas.

Hay estudios experimentales específicos en los que se evalúa la resistencia bacteriana de diversas especies por medio de la CMI y que sugieren puntos de corte experimentales, específicos de cada estudio, en función de los resultados obtenidos. Estos puntos de corte pueden diferenciar en cierta medida de los propuestos por organismos internacionales anteriormente mencionados (NCCLS, SCAN y EFSA). La robustez de los puntos de corte experimentales de estos estudios está en función directa del número de cepas. En el presente estudio se han analizado los resultados experimentales de las CMI y se han establecido puntos de corte propios para aquellas especies con un número de cepas relativamente elevado (<15). Los resultados se muestran en la Tabla 4.28, en la que se comparan los puntos de corte experimentales estimados en el presente estudio con los obtenidos de la bibliografía.

Tabla 4.28. Comparación de las concentraciones mínimas inhibitorias ($\mu\text{g/ml}$) estimadas en el presente trabajo (parte de arriba del cociente) y las obtenidas de la bibliografía[#] (parte de abajo).

	<i>Lactobacillus</i> <i>Plantarum</i> (n=16)	<i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> (n=19)	<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> (n=52)
Ampicilina	4/2*	2/2	4/8
Bencilpenicilina	8/4*	1/4	16/16
Vancomicina	512/4*	4/4	8/8
Cloranfenicol	4/8	4/8	4/16
Clindamicina	0,5/1	1/1	128/1*
Eritromicina	2/1*	8/1*	8/4*
Tetraciclina	16/32	1/4	1/16
Gentamicina	32/16*	8/32	64/500
Kanamicina	32/64	32/64	512/1024
Estreptomina	512/16*	512/32*	512/1024
Ciclofloxacino	64/4*	8/4*	8/4

* Se señalan con asterisco los cocientes mayores de uno.

Teniendo en cuenta los puntos de corte experimentales y los de la bibliografía surgen las siguientes diferencias entre ambos:

- *Lactobacillus plantarum*: los puntos de corte experimentales estimados para la vancomicina y estreptomina fueron mucho más elevados que los de la bibliografía.
- *Lactococcus lactis*: los puntos de corte experimentales estimados para la eritromicina y estreptomina fueron mucho más elevados que los de la bibliografía.
- *Enterococcus faecalis*: el punto de corte experimental estimado para la clindamicina fue mucho más elevado que los de la bibliografía.

Estas diferencias ponen en duda si la resistencia de las cepas de estas tres especies frente a los correspondientes antibióticos es innata o fue adquirida.

El principal fin de evaluar la resistencia frente a antibióticos de las BAL es saber si éstas pueden albergar genes de resistencia adquirida que se puedan transferir a los microorganismos patógenos. Es para evitar esa transferencia, que si se quiere utilizar una cepa de BAL como probiótico o cultivo iniciador, debe estar libre de genes de resistencia.

Como se dijo anteriormente bastantes cepas de *Lactobacillus* spp. presentaron resistencia a la vancomicina, estreptomina y ciprofloxacino. La elevada resistencia de frente al glicopéptido vancomicina se ha descrito previamente en otro estudio sobre microbiología del queso Oaxaca (Caro *et al.*, 2013). También en el trabajo de Danielsen y Wind (2003) se recoge la elevada resistencia frente a este antibiótico mostrada por cepas de *Lb. plantarum* y *Lb. paracasei*. La resistencia a la vancomicina podría deberse al uso clínico de este antibiótico (De Fabrizio *et al.*, 1994). La resistencia a este antibiótico es transferible, estando ligada a plásmidos (Vescovo *et al.*, 1982). Por otra parte, la elevada resistencia a la estreptomina encontrada en el presente trabajo coincide con lo descrito en otros estudios (Curragh y Colins, 1992; Danielsen y Wind, 2003). Sin embargo, este hallazgo discrepa con la alta susceptibilidad detectada en el trabajo de Caro *et al.* (2013) para cepas de este género bacteriano. Finalmente, la CMI para el ciprofloxacino detectada en el presente trabajo para *Lb.*

plantarum y *Lb. paracasei* fue comparable a la encontrada en el estudio de Danielsen y Wind (2003). Estos autores, al igual que en este estudio, proponen un punto de corte de 32 µg/ml, que es superior al de 4 µg/ml propuesto por SCAN (2002).

Los enterococos se caracterizan por su resistencia innata a un número considerable de antibióticos como las cefalosporinas, los aminoglucósidos y la clindamicina (Teuber *et al.*, 1999; Mathur y Singh, 2005). De hecho, los puntos de corte, principalmente los de los antibióticos aminoglucosidos (kanamicina, gentamicina y estreptomina) son comparativamente elevados en relación con otros géneros (Tabla 4.27). Los resultados de este trabajo muestran una posible resistencia innata a la clindamicina, al superar los puntos de corte dados por la EFSA. Por otra parte, en el presente trabajo no se ha encontrado resistencia a la tetraciclina, lo que difiere de la alta prevalencia de resistencia a la tetraciclina encontrada por Huys *et al.* (2004) en cepas aisladas de quesos Europeos. Esta diferencia puede atribuirse a la distinta localización geográfica entre ambos estudios. Además, es destacable, aunque esperable, la baja resistencia mostrada frente a la vancomicina (solo 1 cepa de *E. faecalis* mostró resistencia). La importancia de este hecho radica en que la resistencia a este antibiótico se asocia positivamente a la patogenicidad de enterococos (infecciones nosocomiales; Mathur y Singh, 2005). Finalmente, en relación con los lactococos, cabe resaltar la alta resistencia frente a la eritromicina mostrada, por 4 de las 19 cepas estudiadas, y frente a la estreptomina, por 13 de las 19 cepas que superan el punto de corte de la EFSA.

Las cepas que tienen resistencia adquirida no deben ser seleccionadas para su uso potencial como cultivos iniciadores o adjuntos. La resistencia adquirida puede transmitirse horizontalmente a otras bacterias y ser un peligro de índole sanitario, por el hecho de la transmisión de la resistencia desde las BAL a microorganismos patógenos (Mathur y Singh, 2005). La resistencia innata, por el contrario no se transmite, por lo que esta característica en microorganismos no patógenos no es preocupante, no implica riesgo. En el presente trabajo fueron pocas las cepas que mostraron claramente una resistencia adquirida, es decir,

aquellas que presentaron una resistencia anormalmente superior que la media. Entre ellas se puede sugerir que tengan resistencia adquirida la cepa de 26a *E. faecalis* frente a la vancomicina y tetraciclina; la cepa 14a *E. faecalis* frente a la tetraciclina; y las cepas 54 *Lb. plantarum*, 2013 *Lb. paracasei*, 509, 1007 y 1004 *L. lactis* frente a la clindamicina.

4.3.8.2. Actividad hemolítica

Los resultados de la prueba de la hemólisis indicaron que ninguna de las cepas estudiadas expresó la actividad hemolítica. Ninguna cepa mostró capacidad de lisar los glóbulos rojos de la sangre. Esta prueba debería complementarse con estudios genéticos que detecten la presencia del gen de la enterohemolisina. La observación de actividad hemolítica de una cepa implicaría que dicha cepa no podría ser incluida en los cultivos iniciadores, como adjunto o como probiótico, ya que las cepas que presentan esta actividad llevan asociado un factor de patogenicidad, especialmente importante para las bacterias del género *Enterococcus* spp. (Franz *et al.*, 1999; WHO/FAO, 2002).

CAPÍTULO 5

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

PRIMERA. Los principales cambios que ocurren en el queso Oaxaca elaborado con leche cruda y envasado al vacío durante su almacenamiento a refrigeración (8°C) son los siguientes: descensos en el pH, la dureza y la luminosidad e incremento en la capacidad de extensión durante el fundido. Estos cambios podrían atribuirse a una fermentación de los azúcares residuales presentes en el queso y a cambios en la matriz proteica debidos a la hidratación o la pérdida de calcio.

SEGUNDA. Durante el periodo de almacenamiento de 24 días bajo las condiciones mencionadas anteriormente, no pudo evidenciarse actividades proteolítica y lipolíticas significativas en el queso Oaxaca.

TERCERA. El queso Oaxaca elaborado con leche cruda en fábricas de pequeño tamaño del centro de México tiene una vida útil sensorial inferior a 16 días, lo que podría deberse a la aparición de olores atípicos y a cambios no deseados en la textura (textura pastosa y arenosa).

CUARTA. Los recuentos de los lactococos mesófilos fueron los más elevados en el queso recién elaborado y a lo largo de todo el periodo de almacenamiento. Sin embargo, los recuentos de lactobacilos mesófilos, que fueron inicialmente dos unidades logarítmicas inferiores a los de lactococos mesófilos, se incrementaron paulatinamente durante almacenamiento hasta alcanzar niveles similares a los de lactococos en el día dieciséis.

QUINTA. Se encontraron elevados recuentos de bacterias coliformes, *Escherichia coli* y *Enterococcus spp.*, lo que sugiere la existencia de prácticas higiénicas deficientes en la obtención y la manipulación de la leche y/o en las prácticas de la elaboración de los quesos.

SEXTA. Según este estudio, la microflora ácido-láctica aislada durante la elaboración de queso Oaxaca con leche cruda (la leche, la cuajada y el queso), está compuesta principalmente, en orden de importancia, por bacterias de las especies *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* y *Enterococcus faecium*.

SÉPTIMA. La metodología utilizada para la identificación taxonómica de estas bacterias por medio de la secuenciación parcial del gen 16S ARN ribosómico permitió identificar la bacterias ácido-lácticas aisladas del queso Oaxaca a nivel de especie.

OCTAVA. Respecto a la resistencia a antibióticos de los aislamientos cabe señalar i) que la gran mayoría de *Lactobacillus plantarum* y *L. paracasei* subsp. *paracasei* presentaron una resistencia inusualmente elevada frente a la vancomicina (≥ 256 $\mu\text{g/ml}$), ii) que aproximadamente la mitad de aislamientos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* mostraron una resistencia superior a la descrita por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) frente a la eritromicina y estreptomicina, iii) que a diferencia de lo indicado por la EFSA, la gran mayoría de las cepas de *E. faecalis* presentaron elevada resistencia, probablemente intrínseca, frente a la clindamicina (≥ 16 $\mu\text{g/ml}$).

NOVENA. Por un lado y teniendo en cuenta que el proceso de elaboración del queso Oaxaca requiere una acidificación rápida de la cuajada y que tres de las más importantes características sensoriales deseables del queso Oaxaca son su sabor suave, su textura fibrosa (pechuga de pollo) y su estiramiento al fundir, que durante el almacenamiento del queso no se evidenció proteólisis, ni lipólisis y que la composición de la microflora ácido-láctica del queso Oaxaca, aparte de los enterococos, estuvo compuesta principalmente por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*; y por otro lado teniendo en cuenta las características bioquímicas, tecnológicas y de resistencia a antibióticos de las cepas estudiadas, se puede concluir lo siguiente:

- Se propone el desarrollo de un cultivo iniciador para elaborar queso Oaxaca con leche pasteurizada compuesto por cepas de *Lactococcus*

lactis subsp. *lactis*, seleccionando aquellas con mayor capacidad acidificante, baja actividad proteolítica y lipolítica y sin elevada resistencia frente a los antibióticos eritromicina y estreptomicina, como son las cepas 1506, 2002, 2019, 1520, 1002 y 518.

- Se propone adicionar al cultivo iniciador como microorganismos adjuntos cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* por su posible aportación positiva al aroma de queso. La selección de estas cepas debe tener en cuenta alta su capacidad de acidificación, su baja actividad proteolítica y lipolítica y su baja resistencia frente a la estreptomicina y la kanamicina, como son las cepas de *Lactobacillus plantarum* 57, 1017, 3 y 1511 y de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 51 y 59.

CAPÍTULO 6

CAPÍTULO 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adimpong, D. B., Nielsen, D. S., Sorensen, K. I., Derkx, P. M., Jespersen, L. (2012). Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. *BM Microbiology*, 12, 75.
- Aguilar-Uscanga, B., Montero-Lagunes, M., De la Cruz, J., Solís-Pacheco, J. R., García, H. S. (2006). Using fermented cheese whey to reduce acidification time of Oaxaca cheese. *Agrociencia*, 40, 569-575.
- Akkerman, J. C., Waltra, P., van Dijk H. J. M. (1989). Holes in Dutch-type cheese. 1. Conditions allowing eye formation. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 43, 453-476.
- Alba, L. A., de Staff, C., Richter, R. L., Dill, C. V. (1991). Mexican Asadero cheese: A survey of its composition. *Cultured Dairy Product Journal*, 26, 11-12.
- Altieri, C., Scrocco, S., Sinigaglia, M., Del Nobile, M. A. (2005). Use of chitosan to prolong Mozzarella cheese shelf life. *Journal of Dairy Science*, 88, 2683-2688.
- Amiel, C., Mariey, L., Denis, C., Pichon, P., Travert, J., (2001). FTIR spectroscopy and taxonomic purpose: contribution to the classification of lactic acid bacteria. *Lait*, 81, 249-255.
- Ammor, M. S., Flórez, A. B., Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24, 559-570.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17, 454-461.
- AOAC (1999). Official methods of analysis of the AOAC International. 16th Edition, 5th Revision. Cunniff, P. (Editor). Gaithersburg, Maryland, USA.

- Apostolopoulos, C. (1993). Sample empirical and fundamental methods to determine objectively the stretchability of Mozzarella cheese. *Journal Dairy Research*, 61, 405-413.
- Aquilanti, L., Silvestri, G., Zannini, A., Osimani, A., Santarelli, S., Clementi, F. (2007). Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. *Journal Applied Microbiology*, 103, 948–960.
- Arizcum, C., Barcina, Y., Torre, P. (1997). Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus spp.* Isolated from milk and Roncal and Idiazábal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 17-24.
- Arribas, M., Polo, C. (2008). Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. *Food Microbiology*, 25, 875-881.
- Axelsson, L. T., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J., Lindgren, S. E. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2, 131-136.
- Ayyash, M. M., Shah, N. P. (2010). Proteolysis of low-moisture Mozzarella cheese as affected by substitution of NaCl with KCl. *Journal of Dairy Science*, 94, 3769-3777.
- Balestrieri, M., Spagnuolo, M. S., Cigliano, L., Storti, G., Ferrara, L., Abrescia, P., Fedele, E. (2002). Evaluation of oxidative damage in Mozzarella cheese produced from bovine or water buffalo milk. *Food Chemistry*, 77, 293–299.
- Barbano, D. M., Yun, J. J., Kindstedt, P. S., Kiely, L. J. (1992). Rod-to-coccus ratio: change in cell count during Mozzarella manufacturing and impact on proteolysis during refrigerated storage. A Proceeding. 29th Annu. Marschall Italian cheese Sem. Rhône-Poulenc, Madison, WI. USA. Pág. 1-12.
- Barry, A. L., Pfaller, M. A., Brown, S. D., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M. A., Knapp C., Rennie, R. P., Rex, J. H., Rinaldi, M. G. (2000). Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *Journal Clinical Microbiology*, 38, 3457-3459.

- Beresford, T., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.
- Beresford, T., Williams, A. (2004). The microbiology of cheese ripening. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, general aspects*. Eds. Fox P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., Guinee, T. P. Academic Press, UK. Págs. 287-317.
- Bettenbrock, K., Alpert, C. A. (1998). The gal genes for the Leloir pathway of *Lactobacillus casei* 64H. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2013-2019.
- Bills, D. D., Day, E. A. (1964). Determination of the major free fatty acids of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 43, 588-597.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., Valdezated, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29, 601–608.
- Bourne C. M. (1973). Texture measurement of individual cooked dry beans by the puncture test. *Journal of Food Science*, 37, 751-753.
- Bourne, C. M. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62.
- Bruna, J. M., Hierro, E. M., de La Hoz, L., Mottram, D. S., Fernández, M., Ordoñez, J. A. (2003). Changes in selected biochemical and sensory parameters as affected by the superficial inoculation of *Penicillium camemberti* on dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 111-125.
- Buhnik-Rosenblau, K., Matsko-Efimov, V., Danin-Poleg, Y., Franz, Ch. M. A. P., Klein, G., Kashi, Y. (2013). Biodiversidad of *Enterococcus faecalis* based on genomic typing. *International Journal of Food Microbiology*. 165, 27-34.
- Busse, H. J., Denner, E. B. M., Lubitz, W. (1996). Classification and identification of bacteria: Current approaches to an old problem. Overview of method used in bacterial systematic. *Journal Biotechnology*, 47, 3-38.
- Cabrera, C. C., Gómez, R. R., Zúñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una

- manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia Médica, 38, 149-158.
- Califano, A. N., Bevilacqua, A. E. (1999). Freezing low moisture Mozzarella cheese: changes in organic acid content. Food Chemistry, 64, 193-198.
- Caplice, E., Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology, 50, 131–149.
- Caro, I., Mateo, J., Franco, F. J. (1999). Quesos de pasta filata: Tecnología del queso Mozzarella II. Características reológicas y/o propiedades funcionales del queso Mozzarella. Alimentaria, 303, 159-163.
- Caro, I., Soto, S., Franco, M. J., Meza-Nieto, M., Alfaro-Rodríguez, R. H., Mateo, J. (2011). Composition, yield and functionality of reduced-fat Oaxaca cheese: Effects of using skim milk or a dry milk protein concentrate. Journal of Dairy Science, 94, 580-588.
- Caro, I., Mateo, J., Sandoval, M. H., Soto, S., García-Armesto, M. R., Castro, J. M. (2013). Characterization of Oaxaca raw milk cheese microbiota with particular interest in *Lactobacillus* strains. Journal Dairy Science, 96, 3461-2470.
- Caro, I., Soto, S., Álvarez Contreras, I. L., Mateo, J. (2007). Thermal inactivation of *Escherichia coli* and coliform in Oaxaca cheese curd during a simulated kneading process. A Proceeding. Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 412-415
- Caro, I., Soto, S., Fuentes, L., Gutiérrez-Méndez, N., García-Islas, B., Monroy-Gayosso, K. E., Mateo, J. (2014). Compositional, functional and sensory characteristics of selected Mexican cheeses. Food and Nutrition Sciences, 5, 366-375.
- Carpino, S., Home, J., Melilli, C., Licitra, G., Barbano, D. M., Van Soest, P. J. (2004). Contribution of naive pasture to the sensory properties of Ragusano cheese. Journal of Dairy Science, 87, 308-315.
- Carr, F. J., Hill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria. A literature survey. Critical reviews in Microbiology, 28, 281-370.

- Cervantes, E. F., Cesin, V. A., Mamani, O. I. (2013). La calidad estándar de la leche en el estado de Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4, 75-86.
- Chamba, J. F., Irlinger, F. (2004). *Secondary and adjunct cultures, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 191-206.
- Chamorro, M. C., Lozada, M. M. (2002). El análisis sensorial de los quesos. Ed. Mundi prensa, España.
- Cintas, L. M., Herranz, C., Hernández, P. E., Casaus, M. P., Nes, L. F. (2001). Bacteriocins of lactic acid bacteria. A review. *Food Science and Technology International*, 7, 281-305.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C., Comi, G. (2004). Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1883-1894.
- Cogan, T. M. (1996). History and taxonomy of starter culture. En: *Dairy Starter Cultures*. Ed. Cogan, T. M., Acoolas, J. P. VCH, USA. Pág.1-23.
- Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., Fernández, I., Gómez, J., Gómez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M. C., Rodríguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64, 409-421.
- Cogan, T. M. (2000). Cheese microbiology. En: *Fundamentals of Cheese Science*. Ed. Fox, P. F., Guinee, T. M., McSweeney, P. L. Gaithersburg: Aspen Publishers, UK. Págs. 1-608.
- Colín-Cruz, M. A., Dublán-García, O., Espinoza-Ortega, A., Domínguez-López, O. (2011). The effect of varying fat content on the microstructure of Oaxaca cheese, a typical pasta filata cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 71-80.
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L. M., Wilkinson, M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13, 841-866.

- Conte, A., Scrocco, C., Sinigaglia, M., Del Nobile, M. A. (2007). Innovative active packaging systems to prolong the shelf life of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 90, 2126-2131.
- Coppola, S., Valiota, G., Ercolini, D., Moschetti, G. (2001). Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 414-420.
- Costabel, L., Pauletti, M. S., Hynes, E. (2007). Proteolysis in Mozzarella cheeses manufactured by different industrial processes. *Journal Dairy Science*, 90, 2103-2112.
- Cowan, S. T., Steel, K. J. (1999). Theory and practice of bacterial identification. En. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Ed. Barrow, G. I., Feltham, R. K. A. Cambridge University Press, UK. Págs. 44-89.
- Creamer, L. K. (1976). Casein proteolysis in Mozzarella-type cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science Technology*, 11, 130-131.
- Curioni, P. M. G., Bosset, J. O. (2002). Key odorants in various cheese type as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12, 959–984.
- Curragh, H. J., Collins. M. A. (1992). High-levels of spontaneous drug resistance in *Lactobacillus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 31-36.
- Dalgleish, D. G., Law, A. J. R. (1989). pH-induced dissociation of bovine casein micelles II. Mineral solubilization and its relation to casein release. *Journal of Dairy Research*, 56, 727-735.
- Dalsgaard, T. K., Sorensen, J., Bakman, M., Vognsen, L., Nebel, C., Albrechtsen, R., Nielsen, J. H. (2010). Light-induced protein and lipid oxidation in low-fat cheeses: whey proteins as antioxidants. *Dairy Science and Technology*, 91, 171–183.
- Danielsen, M. y Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus spp.* to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 1-11.
- Das, A., Sasidharan, S., Achuthan, T., Sindhuja, M. E. (2014). Isolation, characterization and estimation of antimicrobial activity of novel

- bacteriocin from *Lactobacillus plantarum*. International Journal Current Microbiology Applied Science, 3, 227-232.
- De Angelis, M., de Candia, S., Calasso, M. P., Faccia, M., Guinee, T. P., Simonetti, M. C., Gobbetti, M. (2008). Selection and use of autochthonous multiple strain cultures for the manufacture of high moisture traditional Mozzarella cheese. International Journal Food Microbiology, 125, 123-132.
- De Fabrizio, S. V., Parada, J. L., Ledford, R. A. (1994). Antibiotic resistance of *Lactococcus lactis*-An approach of genetic determinants locations through a model system. Microbiologie, Aliments, Nutrition, 12, 307–315.
- De Oca-Flores, E. M., Castelán-Ortega, O. A., Estrada-Flores, J. E., Espinoza-Ortega, A. (2009). Oaxaca cheese: Manufacture process and physicochemical characteristics. International Journal Dairy Technology, 62, 535-540.
- De Vos, W. M. (2011). Systems solutions by lactic acid bacteria: from paradigms to practice. Microbial Cell Factories.10, S1-S2.
- De Vuyst, L., Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Review, 23, 153-177.
- Deeth, H. C., Fitz-Gerald, C. H. (1995). Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products. En: Advanced Dairy Chemistry – 2 Lipids. Ed. Fox, P. F. Chapman and Hall, UK. Págs. 247-308.
- Deeth, H. C., Touch, V. (2000). Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. Australian Journal of Dairy Technology, 55, 153-168.
- Devirgiliis, C., Caravelli, A., Coppola, D., Barile, S., Perozzi, G. (2008). Antibiotic resistance and microbial composition along the manufacturing process of Mozzarella di Bufala Campana. International Journal Food Microbiology, 128, 378 –384.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. A review. International Dairy Journal. 14, 273-285.
- Diana, M., Tres, A., Quílez, J., Llombart, M., Rafecas, M. (2014). Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high

- gamma-aminobutyric acid production. *Food Science and Technology*, 56, 351-355.
- Dicks, L. M. T., Du Plessis, E. M., Dellaglio, F., Lauer, E. (1996). Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. Rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 337-340.
- Domínguez-López, A., Villanueva-Carvajal, A., Arriaga-Jordán, C., Espinoza-Ortega, A. (2011). Artisan-made and traditional foods: The Oaxaca fresh cheese as study case in central Mexico. *Estudios Sociales*, 19, 165-193.
- Donkor, N. O., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, P. N. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Dairy Science and Technology*, 87, 21-38.
- Drake, M. A., Mcingvale, S., Gerard, P., Cadwallader, J. R., Cville, G. V. (2001). Development of a descriptive language for Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 66, 1422-1427.
- Early, R. (1998). *Tecnología de los productos lácteos*. Ed. Acribia, España.
- Eck, A. (1990). *El queso*. Ed. Omega, España.
- Effendi, G., Chen, H., Kindstedt, P. S., Yun, J. J., Rasmussen, R. R., Barbano, D. M. (1992). The influence of rod:coccus starter ratio and storage time on the rheological properties of unmelted Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 75 (S1), 118.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10 (6): 2740
- EFSA (European Food Safety Authority). (2013). Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed. *EFSA Journal*, 11 (11): 3349.

- El Soda, M., Abd-El-Wanab, H., Ezzat, N., Desmazeaud, M. J., Ismael, A. (1986). The esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli. II. Detection of the esterase system of *Lactobacillus helveticus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis* and *Lb. acidophilus*. Lait, 66, 431-443.
- El-Soda, M., Macedo, A., Olson, N. (1991). Aminopeptidase and dipeptidylaminopeptidase activities of several cheese-related microorganisms. Milchwissenschaft, 46, 223-226.
- Ennahar, S., Cai, Y., Fujita, Y. (2003). Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. Applied and Environmental Microbiology, 69, 444–451.
- Facklam, R. R. y Wilkinson, H. W. (1981). The family Streptococcaceae (medical aspects). En. The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation end Identification of Bacteria Ed. Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G. Springer-Verlag, USA. Págs. 1572-1597.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2012). Global market analysis. World Food Outlook. Página consultada el 14 de febrero de 2012. [http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/newsroom/docs/Final%20web%20version%202%20May%20\(2\).pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/newsroom/docs/Final%20web%20version%202%20May%20(2).pdf)
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2013). Milk and dairy product composition. Página consultada el 09 de Enero de 2013. <http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>
- Farkye, N. Y., Kiely, L. J., Allshouse, R. D., Kindstedt, P. S. (1991). Proteolysis in Mozzarella cheese during refrigerated storage. Journal of Dairy Science, 74, 1433-1438.
- Felis, G. E., Dellaglio F. (2007). Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. Current Issues in Intestinal Microbiology, 8, 44-61.
- Felsenstein, J. (2009). PHYLIP (Phylip inference package) version 3.69. Seattle: Department of Genome Sciences. University of Washington.

- Feng, D. F., Doolittle R. F. (1987). Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *Journal of Molecular Evolution*, 25, 351-360.
- Fenster, K. M., Parkin, K. L., Steele, J. L. (2000). Characterization of a arylesterase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal Applied Microbiology*, 88, 572-583.
- Ferain, T., Schanck, A. N., Delcour J. (1996). ¹³C nuclear magnetic resonance analysis of glucose and citrate end products in an *ldhL-ldhD* double-knockout strain of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, 178, 7311–7315
- Fernández, C. M. A. (2012). Tesis doctoral. Estudio de los microorganismos responsables del proceso madurativo del queso San Simón Da Costa artesanal, con vistas a la elaboración de un cultivo iniciador propio para esta variedad. Universidad de León.
- Fife, R. L., McMahon, D. J., Oberg, C. J. (1996). Functionality of low fat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 79, 1903-1910.
- Fleet, G. H. (1990). Yeasts in dairy products. A review. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 199–211.
- Flórez, A. B., Delgado, S., Mayo, B. (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 51-58.
- Flórez, A. B., Ladero, V., Alvarez-Martín, P., Ammor, M. S., Alvarez, M. A., Mayo, B. (2007). Acquired macrolide resistance in the human intestinal strain *Lactobacillus rhamnosus* E41 associated with a transition mutation in 23S rRNA genes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30 341–344.
- Floury, J., Camier, B., Rousseau, F., Lopez, Ch., Tissier, J. P., Famelart, M. H. (2009). Reducing salt level in food: Part 1. Factors affecting the manufacture of model cheese systems and their structure-texture relationships. *Food Science and Technology*, 42, 1611-1620.
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72, 1379-1400.

- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., Mc Sweeney, P. L. H., (2000). Fundamental of Cheese Science. Ed. Aspec Publishers, Inc. USA. Págs. 1-333.
- Fox, P. F. Law, J., McSweeney, P. L. H., Wallace, J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. En. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Ed. Fox, P. F. Chapman & Hall, UK. Págs. 389-438.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. A review. Food Reviews International, 12, 457-509.
- Fox, P. F., Wallace, J. M. (1997). Formation of flavor compounds in cheese. Advances in Food Microbiology, 45, 17-85.
- Franz, C. M. A. P., Hotzapfel, W. H., Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety?. International Journal of Food Microbiology, 47, 1-24.
- Gallardo-Escamilla, F. J., Kelly, A. L., Delahunty, C. M. (2005). Influence of starter on flavor and headspace volatile profiles of fermented whey and whey produced from fermented milk. Journal of Dairy Science, 88, 3745-3753.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Lucas-López, R., Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. International Journal of Food Microbiology, 120, 51-70.
- Ganesan, B., Irish, D. A., Brothersen, C., McMahon, D. J. (2012). Evaluation of microbial survival post-incidence on fresh Mozzarella cheese. Journal of Dairy Science, 95, 6891-6896.
- García-Islas. G. (2006). Caracterización Físico-química de diversos tipos de quesos elaborados en el valle de Tulancingo Hidalgo con el fin de proponer normas de calidad. Tesis de licenciatura, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Garde, S., 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.
- Gaspar, P, Neves, A. R., Ramos, A, Gasson, M. J., Shearman, C. A., Santos, H. (2004). Engineering *Lactococcus lactis* for production of

- mannitol: High yields from food-grade strains deficient in lactate dehydrogenase and the mannitol transport system. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1466-1474.
- Gasperi, F., Gallerani, G., Boschetti, A., Biasioli, F., Monetti, A., Boscaini, E., Jordan, A., Lindinger, W., Iannotta, S. (2000). The Mozzarella cheese flavor profile: A comparison between judge panel analysis and proton transfer reaction mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 357-363.
- Georgieva, R., Lliev, L.I. Haertlé, T., Chobert, J-M., Ivanova, I., Danova, S. (2009). Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Dairy Journal*. 19, 696-702.
- Gernigon, G., Piot, M., Beaucher, E., Jeantet, R., Schuck, P. (2009). Physicochemical characterization of Mozzarella cheese wheys and stretchwaters in comparison with several other sweet wheys. *Journal of Dairy Science*, 92, 5371-5377.
- Gilliland, S. E. (1986). The lactobacilli: milk product. En. *Bacterial Starter Cultures for Foods*. Ed. Gilliland S. E. CRC Press Inc., USA. Pág. 6-19.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.
- Giraffa, G., Neviani, E. (2001). DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 19-34.
- Gobbetti, M., Morea, M., Baruzzi, F., Corbo, M. R., Matarante, A., Considine, T., Cagno, R., Guinee, T., Fox, P. F. (2002). Microbiological compositional, biochemical and textural characteristics of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 12, 511-523.
- Gobbetti, M., Smacchi, E., Fox, P., Stepaniak, L., Corsetti, A. (1996). The sourdough microflora. Cellular localization and characterization of proteolytic enzymes in lactic acid bacteria. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29, 561-569.

- Goosseens, H. (2007). Assessing the safety of probiotics with regard to antibiotic resistance. En: Functional Dairy Product. Ed. Saarela, M. Woodhead Publishing Limited, UK. Págs. 427-442.
- Gopal, P. K., Richardson, R. K. (1996). A rapid and sensitive method for estimation of galactose in Parmesan cheese. International Dairy Science, 6, 399-406.
- Guinee, T. P., Harrington, D., Corcoran, M. O., Mulholland, E. O., Mullins, C. (2000). The compositional and functional properties of commercial Mozzarella, Cheddar and analogue pizza cheeses. International Journal of Dairy Technology, 53, 51-56.
- Guinee, T. P., Feeney, E. P., Auty, M. A. E., Fox, P. F. (2002). Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of Mozzarella cheese. Journal of Dairy Science, 85, 1655-1669.
- Guinee, T. P., Kilcawley K. N. (2004). Cheese as an ingredient. En: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Eds. Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., Guinee. T. P. Elsevier Academic Press, USA. Págs. 395-428.
- Harrigan, W. F. (1998). Techniques for the microbiological examination of foods. Laboratory Methods in Food Microbiology. Academic Press. UK. Pág.143-210.
- Heilig, H. G., Zoetendal, E. G., Vaughan, E. E., Marteau, P., Akkermans, A. D. de Vos, W. M. (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus spp.* and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. Applied and Environmental Microbiology, 68, 114-123.
- Hennelly, P. J., Dunne, P. G., O'Sullivan, M., O'Riordan, E. D. (2005). Increasing the moisture content of imitation cheese: effects on texture, rheology and microstructure. European Food Research and Technology, 220, 415-420.
- Hennelly, P. G. (2006). Texture, rheological and microstructural properties of imitation cheese containing inulin. Journal of Food Engineering, 75, 388-395.

- Herreros, M. A., Fresno, J. M., González Prieto, M. J., Tornadijo, M. E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *International Dairy Journal*, 13, 469-479.
- Herrero, M., Mayo, B., González, B., Suarez, J. E. (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 565-570.
- Hillis, D. M., Bull. J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Journal Systematic Biology*, 42, 182-192.
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S., Nes, I. F. (2001). Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*, 147, 643-651.
- Hughenoltz, J. (2008). Review the lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient product. A. review. *International Dairy Journal*, 18, 466-475.
- Humble, M. W., King, A., Phillips, I. (1978). API ZYM: a simple rapid system for the detection of bacterial enzymes. *Journal of Clinical Pathology*, 30, 275-277.
- Huys, G., D'Haene, K., Collard, J.-M., Swings, J., (2004). Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 1555–1562.
- Imm, J. Y., Ong, E. J., Han, K. S., Oh, S., Park, Y. M., Kim, S. H. (2003). Funtionality and physico-chemical characteristics of bovine and caprine Mozzarella cheeses during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 86, 2790-2798.
- ISO (International Standard Organization) (2012). Milk and milk products. Determinación of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non enterococcal lactic acid bacteria (LAB). 10932. Pág.1-20.
- Izco, J. M., Tormo, M., Jiménez-Flores, R. (2002). Rapid simultaneous determination of organic acids, free amino acids, and lactose in

- cheese by capillary electrophoresis. *Journal Dairy Science*, 85, 2122-2129.
- Jakobsen, M., Narvhus, J. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal*, 6, 755-768.
- Jany, J. L., Barbier, G. (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*, 25, 839-848.
- Jett, B. D., Huycke, M. M., Gilmore, M. S., (1994). Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 462-478.
- Jordan, K. N., Cogan, T. M. (1993). Identification and growth of non starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 32, 47-55.
- Joshi, N. S., Muthukumarappan, K., Dave, R. I. (2004). Effect of calcium on microstructure and meltability of part skim Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 87, 1975-1985.
- Juric, M., Bertelsen, G., Mortensen, G., Petersen, M. A. (2003). Light-induced colour and aroma changes in sliced, modified atmosphere packaged semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 13, 239-249.
- Kamaly, K. M., Marth, E. H. (1989). Enzymes activities of streptococci and their role in maturation of cheese. A. Review. *Journal of Dairy Science*, 72, 1945-1966.
- Kandler, O., Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901. En. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Ed. Williams and Wilkins, UK. Págs. 1209-1234.
- Kaneko, T., Watanabe, Y., Suzuki, H. (1990). Enhancement of diacetyl production by a diacetyl-resistant mutant of citrate-positive *Lactococcus lactis ssp. lactis* 3022 and by aerobic conditions of growth. *Journal of Dairy Science*, 73, 291-298.
- Katla, A.-K., Kruse, H., Johnsen, G., Herikstad, H. (2001). Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 147-152.

- Kaya, S. (2002). Effect of salt on hardness and whiteness of Gaziantep cheese during short-term brining. *Journal of Food Engineering*, 52, 155–159.
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 3, 1-13.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Kindstedt, P. S. (1991). Functional properties of Mozzarella cheese on pizza. A review. *Cultured Dairy Products Journal*, 26, 27-31.
- Kindstedt, P. S. (1993a). Mozzarella and pizza cheese. En. *Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology*. Ed. Fox, P. F., Elsevier Applied Science, UK. Págs. 337-362.
- Kindstedt, P. S. (1993b). Effect of manufacturing factors, composition and proteolysis on the functional characteristics of Mozzarella cheese, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 167–187.
- Kindstedt, P. S. (2004). Mozzarella cheese: 40 years of scientific advancement. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 85-90.
- Kindstedt, P. S., Guo, M. R., Vitto, W. H., Yun, J. J., Barbano, D. M. (1995). Effect of screw speed and residence time at high temperature on composition, proteolysis, functional properties, and the water phase of Mozzarella cheese. En. *Proceeding. 32nd Annual Marshall Italian and Specialty Cheese Seminar*. Rhone Poulenc Dairy Ingredients, USA. Págs. 56-72.
- Kindstedt, P. S., Mayes, J., Hillier, A. (2010). Pasta Filata/Pizza Cheese. En. *Technology of Cheesemaking*. Ed. Law, B. A. Sheffield Academic Press Ltd, UK. Págs. 330-359.
- Kinsella, J. E. (1975). Butter flavor. *Food Technology*, 29, 82-98.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J.,

- O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M., Siezen, R. (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 29-58.
- Klare, I., Konstabel, I., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W., Goossens, H. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 900-912.
- Kongo, J. M. (2013). Lactic acid bacteria as starter-culture for cheese processing: Past, present and future developments. En. *Lactic acid bacteria R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. Ed. Kongo, J. M. Croatia. Págs. 3-22.
- Korhonen, J. M., van Hoek, A. H. A. M., Saarela, M., Huys, G., Tosi, L., Mayrhofer, S., von Wright, A. (2010). Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus*. *Beneficial Microbes*, 1, 75-80.
- Kristensen, D., Orlien, V., Mortensen, G., Brockho, P., Skibsted, L. H. (2000). Light-induced oxidation in sliced Havarti cheese packaged in modified atmosphere. *International Dairy Journal*, 10, 95-103.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., Von Wright, A. (2012). Lactic acid bacteria. Microbial and functional aspects. *International Journal of Dairy Technology*, 66, 149-150.
- Law, B. A. (1984). Flavour development in cheese. En. *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. Ed. David, F. L., Law, B. A. Elsevier Applied Science Publishers, UK. Págs. 187-208.
- Law, B. A. (1987). Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. En. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Ed. Fox, P. F. Elsevier Applied Science Publisher, UK. Págs. 365-392
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K., Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 70, 1748-1760.

- Laws, A. P., Marshall, V. M. (2001). The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented withropy strains of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 709-721.
- LeBlanc, J. G., Taranto, M. P., Molima, V., Sesma, F. (2010). B-group vitamins production by probiotic lactic acid bacteria. En. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Ed. Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M. Wiley-Blackwell, USA. Pág. 211.
- 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.
- Lin, T., Chang, M. (2007). Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*, 100, 1419-1423.
- Lucey, J. A., Fox, P. F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1714-1724.
- Lucey, J. A., Jhonson, M. E., Horne, D. S. (2003). Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. A review. *Journal of Dairy Science*, 86, 2725-2743.
- Lues, J. F. R., Botha, W. C. (1998). Relationship amongst South African processed, young and matured Cheddar cheese pertaining to organic acid content and non-starter population. *Food Research International*, 31, 449-457.
- Luyten, H., van Vliet, T. (1996). Effect of maturation on large deformation and fracture properties of semi-hard cheeses. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 50,295-307.
- Luyten, H., van Vliet, T., Walstra, P. (1991). Characterization of the consistency of Gouda cheese: Rheological properties. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 45, 33-53.
- Ly, M. H., Covarrubias- Cervantes, M., Dury-Brum, C., Bordet, S., Voilley, A., Le, T. M., Belin, J. M., Wache, Y. (2008). Retention of aroma compounds by lactic bacteria in model food media. *Food Hydrocolloids*, 22, 211-217.

- Lyhs, U., Korkeala, H., Bjorkroth, J. (2002). Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged “gravad” rainbow trout using ribotyping. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 147-153.
- Ma, X., James, B., Zhang, L., Emanuelsson-Patterson, E. (2011). Correlating Mozzarella cheese properties to production processes by rheological and microstructure study: meltability study and activation energy. *Procedia Food Science*, 1, 536-544.
- Madrid, A. (1999). *Tecnología quesera*. Ed. Mundi-Prensa, España.
- Mansson, H. L. (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food & Nutrition Research*, 52. DOI: 10.3402/fnr.v52i0.1821. Disponible en Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2596709/pdf/FNR-52-1821.pdf> (último acceso, 20 de febrero de 2014).
- Marino, M., Maifreni, M., Rondinini, G. (2003). Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 229, 133-140.
- Matheson, A. R. (1981). The immunological determination of chymosin activity in cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 16, 33-41.
- Mathur, S., Sing, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281-295.
- Matzdorf, B., Cuppett, S. L., Keeler, L., Hutkins, R. W. (1994). Browning of Mozzarella cheese during high temperature pizza baking. *Journal of Dairy Science*, 77, 2850-2853.
- McMahon, D. J., Oberg, C. J., McManus, W. (1993). Functionality of Mozzarella cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 48, 99-104.
- McMahon, D. J., Fife, R. L., Oberg, C. J. (1999). Water partitioning in Mozzarella cheese and its relationship to cheese meltability. *Journal of Dairy Science*, 82, 1361-1369.
- McMahon, D. J., Paulson, B., Oberg, C. J. (2005). Influence of calcium, pH, and moisture on protein matrix structure and functionality in direct-

- acidified nonfat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 88, 3754-3763.
- McSweeney, P. L. H., Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for de production of flavour compounds in cheeses during ripening. A review. *Lait*, 80, 293-324.
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F. (2004). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. En. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Eds. Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Timothy, M. C., Timothy, P. G. Elsevier Academic Press, UK. Págs. 361–371.
- Melili, C., Barbano, O. D., Manenti, M., Lynch, J.; Carpino, S., Licitra, G. (2004). Lipolysis and proteolysis in Ragusano cheese during brine salting at different temperatures. *Journal of Dairy Science*, 87, 2359–2374.
- Metzger, L. E., Barbano, D. M., Kindsted, P. S., Guo, M. R. (2001). Effect of milk preacidification on low fat Mozzarella cheese: II. Chemical and functional properties during storage. *Journal of Dairy Science*, 84, 1348-1356.
- Molimard, P., Spinnler, H. E. (1996). Compounds involved in the flavour of surface mould-ripened cheeses: Origins and properties. A review. *Journal of Dairy Science*, 79, 169–184.
- Monroy, K. E. (2007). Propiedades funcionales de los principales quesos elaborados en el Valle de Tulancingo, Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Montel. M. Ch., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Dominique, A., Vuitton, D. A. D. A., Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal Food Microbiology*, 177, 136-154.
- Moore, S., Stein, W. H. (1948). Photometric ninhidrin method for use in the chromatography of amino acids. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 367-388.
- Morales-Celaya, M. F., Lobato-Callerosa, C., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E. J. (2012). Effect of milk pasteurization and acidification method on the chemical composition and microstructure of a

- Mexican pasta filata cheese. *Food Science and Technology*, 45, 132-141.
- Morea, M., Baruzzi, F., Cappa, F., Cocconcelli, P. S. (1998). Molecular characterization of the *Lactobacillus community* in traditional processing of Mozzarella cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 53-60.
- Mortensen, G., Bertelsen, G., Mortensen, B. K., Stapelfeldt, H. (2004). Light-induced changes in packaged cheeses. A review. *International Dairy Journal*, 14, 85-102.
- Moschopoulou, E., Anisa, T., Katsaros, G., Taoukis, P., Moatsou, G. (2010). Application of high-pressure treatment on ovine brined cheese: Effect on composition and microflora throughout ripening. *Innovate and Emerging Technologies*, 11, 543-550.
- Mozzi, F., Ortiz, M. E., Bleckwedel, J., a, Luc De Vuyst, L, D., Pescuma, M. (2013). Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. *Food Research International* 54, 1152-1161.
- Mullin, W. J., Emmons D. B. (1997). Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. *Food Research International*, 30, 147-151.
- Murkherjee, K. K., Hutkins, R. W. (1994). Isolation of galactose-fermenting thermophilic cultures and their use in the manufacture of low browning Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 77, 2839-2849.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. M100-S17, 27 (1). Página consultada el 25 de marzo de 2014. <http://www.microbiolab-bg.com/CLSI.pdf>
- NCCLS (National Council of Clinical Laboratory Services). (1999). Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline in Clinical and Laboratory Standards Institute, 19.

- Neves, A. R., Ramos, A., Sherman, C., Gasson, M. J., Almeda, J. S., Santos, H (2002). Catabolism of mannitol in *Lactococcus lactis* MG1363 and a mutant defective in lactate dehydrogenase. *Microbiology*, 148, 3467-3476.
- Nieto-Arribas P., Poveda, J. M., Seseña, S., Palop, Ll., Cabezas, L. (2009). Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control*, 20, 1092-1098.
- Nieto-Arribas P., Seseña, S., Poveda, J. M., Chicón, R., Cabezas, L., Palop, Ll. (2011). *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiology*, 28, 891-899.
- Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J. Golic, N., Topisirovic, L., (2008). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 162-170.
- NOM-243-SSA1-2010 (2010). Norma Oficial Mexicana, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Página consultada el 03 de abril de 2014. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5160755&fecha=03/04/2010
- Oberg, C. J., Meril, R. K., Brown, R. J., Richardson, G. H. (1992). Effects of milk-clotting enzymes on physical properties of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 75, 669-675
- Oberg, C., Wang, L., Moyes, R., Brown, J., Richardson, G. (1991). Effects of proteolytic activity of termolactic cultures on physical properties of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 74, 389-397.
- Oliszewski, R., Cisint, J. C., Núñez de Kairúz, M. (2007). Manufacturing characteristics and shelf life of Quesillo, an Argentinean traditional cheese. *Food Control*, 18, 736–741.
- Olivares, J.C., Rua, B., Susaeta, I., Aldámiz-Echeverría, P. (1993). Growth kinetics of several lactic bacteria useful as starter for ewe's cheese production. *Biotechnology Letters*, 15, 1071–1076.

- Olson, N. F. (1990). The impact of lactic acid bacteria on cheese flavour. A review. *FEMS Microbiology Reviews*, 87, 131-148.
- Ong, L., Henriksson, A., Shah, N. P. (2006). Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid Lactic. *International Dairy Journal*, 16, 446–456.
- Ong, L., Shah, N. P. (2009). Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. *Food Science and Technology*, 42, 1260–1268.
- Orla-Jensen, S. (1924). La classification des bacteries lactiques. *Lait*, 4, 468-480.
- Ostlie, H. M., Eliassen, L., Florvaag, A., Skeie, S. (2005). Phenotypic and PCR-based characterization of the microflora in Präst cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 15, 911-920.
- Ottogalli, G. (2000). A global comparative method for the classification of World cheeses (with special reference to microbiological criteria). *Annals of Microbiology*, 50, 151-155.
- Ouoba, LI., Lei, V., Jensen, L. B. (2008). Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *International Journal Food Microbiology*, 121, 217–224.
- Page, R. D. M. (1996). TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applied in the Biosciences*, 12, 357-358.
- Pagliarini, E., Monteleone, E., Wakeling, I. A. N. (1997). Sensory profile description of Mozzarella cheese and its relationship with consumer preference. *Journal of Sensory Studies*, 12, 285-301.
- Papademas, P., Robinson, R. K. (2000). A comparison of the chemical, microbiological and sensory characteristics of bovine and ovine Halloumi cheese. *International Dairy Journal*, 10, 761-768.

- Parente, E., Rota, M. A., Ricciardi, A., Clementi, F. (1998). Characterization of natural starter cultures used in the manufacture of pasta filata cheese in Basilicata (Southern Italy). *International Dairy Journal*, 7, 775-783.
- Parra, H. R. A. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. A review. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 8, 93-105.
- Paulson, B. M., McMahon, D. J., Oberg, C. J. (1998). Influence of salt on appearance, functionality, and protein arrangements in nonfat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 81, 2053-2064.
- Pérez, J. C. (1999). Manual de control de calidad de los productos lácteos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Piatkiewicz, A. (1987). Lipase and esterase formation by mutants of lactic acid streptococci and lactobacilli. *Milchwissenschaft*, 42, 561-564.
- Piraino, P., Zotta, T., Ricciardi, A., McSweeney, P. L. H., Parente, E. (2008). Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheese: A multivariate screening study. *International Dairy Journal*, 18, 81-92.
- Piraino, P., Zotta, T., Ricciardi, A., Parente, E. (2005). Discrimination of commercial Caciocavallo cheeses on the basis of the diversity of lactic microflora and primary proteolysis. *International Dairy Journal*, 15, 1138-1149.
- Plutowska, B., Wardencki, W. (2007). Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry*, 101, 845–872.
- Poste, L. M., Mackie, D. A., Butler, G., Larmond, E. (1991). *Laboratory Methods for Sensory Analysis of Foods*. Ed. Agriculture Canada Publication 1984/E, Canada. Págs. 1-90.
- Prentice, J. H., Langley, K. R., Marshall, R. J. (1993). Cheese rheology. En. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Ed. Fox, P. F. Chapman & Hall, UK. Págs. 303-321.
- PROFECO (Procuraduría Federal del Consumidor). (2012). Secretaría de Economía. México, D. F. Página consultada el 17 de febrero de

- 2012.http://www.profeco.gob.mx/encuesta/brujula/bruj_2012/bol227_com_rapida.asp
- Qingqiang, Y., Qiuhong, Z. (2005). Isolation and identification of the dominant *Lactobacillus* in gut and faeces of pigs using carbohydrate fermentation and 16S rDNA analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 68-71.
- Ramírez-Nolla, S., Vélez-Ruiz, J. F. (2012). Queso Oaxaca: panorama del proceso de elaboración, características fisicoquímicas y estudios recientes de un queso típico Mexicano. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6, 1-12.
- Randazzo, C. I., Caggia, C., Neviani, E. (2008). Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, 78, 1-9.
- Ray, B., Bhunia, A. (2013). Characteristics of predominant microorganism in food. En. *Fundamental Food Microbiology*. Ed. Taylor & Francis Group LLC. CRC Press, USA. Págs. 13-34.
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., Kumar, E. V. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 26, 22-34.
- Retiveau, A., Chambers, D. H., Esteve, E. (2005). Developing a lexicon for the flavor description of French cheeses. *Food Quality and Preference*, 16, 517–527.
- Richoux, R., Roset, G., Famelart, M. H., Kerjean, J. R. (2001). Diversité de quelques propriétés fonctionnelles á chaud de l'Emmental Français. *INRA, EDP Sciences*, 81, 547-559.
- Richoux, R., Aubert, L., Roset, G., Briard-Bion, V., Kerjean, J. R., Lopez, C. (2008). Combined temperature–time parameters during the pressing of curd as a tool to modulate the oiling-off of Swiss cheese. *Food Research International*, 41, 1058–1064.
- Rizzello, C. G., Curiel, J. A., Nionelli, L., Vincentin, O., Di Cagno, R., Silano, M., Gobbetti, M., Coda, R. (2014). Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for marking wheat bread with an intermediate content of gluten. *Food Microbiology*, 37, 59-68.

- Rodicio, M., Mendoza, M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22, 238-245.
- Rojas, C., Vargas P., (2008). Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha*, 21, 9-16.
- Romano, P., Ricciardi, A., Salzano, G., Suzzi, G. (2001). Yeasts from Water Buffalo Mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 45-51.
- Ross, R. P., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G. F., Coffey, A. (2000). Novel cultures for cheese improvement. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 96-104.
- Roushdy, I. M. (1999). Molecular and phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from laban rayeb. *Annals of Agricultural Science – Cairo*, 44, 617–630.
- Rowney, M., Roupas, P., Hickey, M. W., Everett, D. W. (1999). Factors affecting the functionality of Mozzarella cheese. *Austrian Journal of Dairy Technology*, 54, 94-102.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon. P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163-171.
- Rudan, M. A., Barbano, D. M., Guo, M. R., Kinsdtedt, P. S. (1998). Effect of the modification of fat particle size by homogenization on composition, proteolysis, functionality, and appearance of reduced fat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 81, 2065-2076.
- Rudan, M. A., Barbano, D. M., Ming, R. G., Kinstedt, P. S. (1999). Effects of the modification of fat particle size by homogenization on composition, proteolysis, functionality, and appearance of reduced fat Mozzarella cheese. *Journal Dairy Science*, 81, 2065-2076.
- Rynne, N. M., Beresford, T. P., Kelly, A. L., Guinee, T. P. (2007). Effect of milk pasteurization temperature on age-related changes in lactose metabolism, pH and the growth of non-starter lactic acid bacteria in half-fat Cheddar cheese. *Food Chemistry*, 100, 275-282.

- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Journal Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Samelis, J., Bleicher, A., Delbes-Paus, C., Kakouri, A., Neuhaus, K., Montel, M. C. (2011). FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese. *Food Microbiology*, 28, 76-83.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, Ch. Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 11, 621-647.
- Savadogo, A., Quattara, C. A. T., Bassole, I. H. N., Traore, S. A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria- a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5, 678-683.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology Biotechnology*, 7, 394-406.
- Saxer, S., Scheweninger, S. M., Lacroix, C. (2013). Characterization of the microflora of industrial Mexican cheeses produced without added chemical preservatives. *Food Science and Technology*, 53, 314-320.
- SCAN (Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition). (2002). On the criteria for assessing the safety of micro-organisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. Página consultada el 23 de marzo de 2014. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/outcome_en.html
- Schleifer, K. H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmam, E., Ludwig, W., Amann, R. (1995). Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Journal Dairy Research*, 5, 1081-1094.
- Segura, B. M. D. (2002). Análisis poblacional y evolutivo en *Bactrocera Oleae* (GMelin) mediante el uso de marcadores moleculares. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

- Serres, L., Amariglio, S., Petransxiene, D. (1973). Controle de la qualité des produits laitiers. En. Analyse Physique et Chimique. Ministère de l'Agriculture, Francia.
- Sheehan, J. J., Guinee, T. P. (2004). Effect of pH and calcium level on the biochemical, textural and functional properties of reduced-fat Mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, 14, 161–172.
- Sheehan, J. J., Huppertz, T., Hayes, M. G., Kelly, A. L., Beresford, T. P., Guinee, T. P. (2005). High pressure treatment of reduced-fat Mozzarella cheese: effects on functional and rheological properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 73-81.
- Shirai, k., Guerrero, I., Lara, P. (1996). Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*, 47, 125-137.
- Siek, T. J., Albin, I. A., Sather, L. A., Lindsay, R. C. (1971). Comparison of flavour thresholds of aliphatic lactones with those of fatty acids, esters, aldehydes, alcohols, and ketones. *Journal of Dairy Science*, 54, 1-4.
- Singh, S., Singh, R. (2014). Phenotypic and genotypic characterization of non starter *Lactobacillus* species diversity in Indian Cheddar cheese. *Food Science and Technology*, 55, 415-420.
- Smit, G., Verheul, A., van Kranenburg, R., Ayad, E., Siezen, R., Engels, W. (2000). Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Research International*, 33, 153-160.
- Smit, G., Smit, B. A., Engels, W. J. M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. A review. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 591–610.
- Sneath, P. H. A., Sokal, R. R. (1973). Numerical taxonomy: the principles and practice of numeral classification En. Medical Research Council Microbial Systematics Unit. Ed. Freeman, W. H., USA. Págs. 1-573.
- Song, Y., Liu, C., McTeague, M., Finegold, S. M. (2003). 16S ribosómico DNA sequence-based analysis of clinically significant Gram-positive anaerobic cocci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1363-1369
- Soriano, A., Cruz, B., Gómez, L., Mariscal, C., García Ruiz, A. (2006). Proteolysis, physicochemical and free fatty acid composition of dry

- sausages made with deer (*Cervus elaphus*) or wild boar (*Sus Scrofa*) meat. Preliminary study. Food Chemistry, 96, 173-184.
- Sousa, M. J., Malcata, F. X. (1997). Comparative biochemical evolution during ripening of bovine, ovine and caprine cheeses manufactured with extracts of *Cynara cardunculus*. Z Lebensm Unters Forsch A, 205, 97-103.
- Sousa, M. J. Ard, Y., McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. International Dairy Journal, 11, 327–345.
- Stackebrandt, E., Goebble, B. M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic Bacteriology, 44, 846-849.
- Stadhouders, J., Veringa, H. A. (1973). Fat hydrolysis by lactic acid bacteria in cheese. Netherlands Milk and Dairy Journal, 27, 77–91.
- Steele, J., Broadbent, J., Jan Kok, J. (2013). Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. Current Opinion in Biotechnology, 24:135–141
- Steffen, C., Eberhard, P., Bosset, J. O., Ruegg. M. (1993). Swiss-type cheeses. En. Chemistry, Physics and Microbiology. Ed. Fox, P. F. Chapman & Hall, Uk. Pág. 93-120.
- Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular, 70, 331-345.
- Stiles, M. E., Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36, 1–29.
- Stiles, J., Plocková, M., Toth, V., Chumchalová, J. (1999). Inhibition of *Fusarium* sp. DMF 0101 by *Lactobacillus* strains grown in MRS and Elliker broth. Advances Food Sciences, 21, 117–121.
- Sundar, R., Upadhyay, K. G. (1990). Effects of standardization of buffalo milk for casein/fat ratio on Mozzarella cheese composition and cheese making efficiency. Indian Journal of Dairy Science, 43, 588-597.

- Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M. E., Andrighetto, C., Lanorte, M. T. (2000). A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology*, 89, 267-274.
- Szczesniak, A. S. (1963). Objective measurements of food texture. *Journal Food Science*, 28, 410- 420.
- Szczesniak, A. S. (1966). Classification of textural characteristics. *Food Research*, 385-389.
- Temmerman, R., Huys, G., Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: Culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 348-359.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119, 3-10.
- Teuber, M. (1995). The genus *Lactococcus*. En. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Ed. Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H. Blackie Academic & Professional. Chapman & Hall, UK. Págs. 173-234.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensibility of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- Todorov, S. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*—production, genetic organization and more mode of action. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 209-221.
- Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., Bernardo, A., Sarmiento, R. M. Carballo, J. (1995). Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). *Lait*, 75, 551-570.
- Tunick, M. H., Mackey, K. L., Smith, P. W., Holsinger, V. H. (1991). Effects of composition and storage on the texture of Mozzarella cheese. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 45, 117-125.
- Tunick, M. H., Malin, E. L., Smith, P. W., Shieh, J. J., Sullivan, B. C., Mackey, K. L. (1993). Proteolysis and rheology of low fat and full fat

- Mozzarella cheeses prepared from homogenized milk. *Journal of Dairy Science*, 76, 3621–3628.
- Upadhyay, V. K., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A., Fox, P. F. (2004). Proteolysis in cheese during ripening. En. *Chemistry, Physics and Microbiology*. Ed. Fox, P. F., McSweeney, L. H., Cogan, T. M., Guinee, T. P. Elsevier, UK. Págs. 391-433.
- Upreti P., Metzger L. E. (2006). Influence of calcium and phosphorus, lactose and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: manufacture and composition. *Journal of Dairy Science*, 89, 420-428.
- USDA. (1980). USDA. Specifications for Mozzarella Cheeses. Agricultural Marketing Service, Washington, DC, USA.
- USDA (2011). United State Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 26. Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory, Washington, DC, USA.
- Van de Guchte, M., Chaze, T., Jan, G., Mistou, M. Y. (2012). Properties of probiotic bacteria explored by proteomic approaches. *Current opinion in Microbiology*, 15, 381-389.
- Van Hekken, D. L., Tunick, M. H., Malin, E. L., Holseinger V. H. (2007). Rheology and melt characterization of low-fat and full fat Mozzarella cheese made from microfluidized milk. *Food Science and Technology*, 40, 89-98.
- Van Riel, I. A. M., Oheman, C. (1986). HPLC of sugars on a mixed cation exchange resin column. *Journal of Chromatography*, 36, 235-242.
- Van Vliet, T. (1991). Terminology to be used in cheese rheology. En. *Rheological and Fracture Properties of Cheese*. IDF Bull. no. 268, International Dairy Federation, Belgium. Págs 5–15.
- van Vliet, T. (1999). Factors determining small-deformation behavior of gels. En. *Food Emulsions and Foams; Interfaces, Interactions and Stability*. Ed. Dickinson, E., Rodriguez-Patiño, J. M. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. Págs. 307-317.

- Vázquez, S. M., Suárez, H., Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36, 64-71.
- Vescovo, M., Morelli, L., Bottazzi, V. (1982). Drug resistance plasmids in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri*. *Applied Environmental Microbiology*, 43, 50-56.
- Větrovský, T., Baldrian, P. (2013). Analysis of soil fungal communities by amplicon pyrosequencing: current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED. *Biology and Fertility of Soils*, 49, 1027-1037.
- Villani, F., Pepe, O., Coppola, R., Andolfi, R., Coppola, S. (1991). Microbiological aspects of manufacture of Caciocavallo podolico. *Il Latte*, 16, 780-784.
- Villanueva-Carvajal, A., Esteban-Chávez, M., Espinoza-Ortega, A., Arriaga-Jordán, C. M., Domínguez-López, A. (2012). Oaxaca cheese: flavour, texture and their interaction in a Mexican traditional “pasta filata” type cheese. *CyTA Journal of Food*, 10, 63-70.
- Villaseñor, M. J., Valero, E., Sanz, J., Martínez Castro, I. (2000). Analysis of volatile components of Manchego cheese by dynamic headspace followed by automatic thermal desorption-GC-MS. *Milchwissenschaft*, 55, 378–382.
- Vinuesa, N. M. A. (2002). Estudios filogenéticos en la familia *Mycocaliciaceae* (*Mycocaliciales*, *Ascomycota*). Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Wadhvani, R., McMahon, D. J. (2012). Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. *Journal Dairy Science*, 95, 2336-2346.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., van Boekel, M. A. J. S. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Ed. Acribia, S. A., España.
- Wang, H. H., Sun, D. W. (2001). Evaluation of the functional properties of Cheddar cheese using a computer vision method. *Journal of Food Engineering*, 49, 49-53.

- Wang, W., Kindstedt, P. S., Gilmore, J. A., Guo, M. R. (1998). Changes in the composition and meltability of Mozzarella cheese during contact with pizza sauce. *Journal of Dairy Science*, 81, 609-614.
- Wang, H. H., Sun, D. W. (2003). Assessment of cheese browning affected by baking conditions using computer vision. *Journal of Food Engineering*, 56, 339–345.
- Watkinson, P., Coker, C., Crawford, R., Dodds, C., Johnston, K., McKenna, A., White, N. (2001). Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *International Dairy Journal*, 11, 455-464.
- Wessels, D., Joosten, P. J., Mostert, J. F. (1990). Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from milk and dairy products. *International Journal Food Microbiology*, 10, 349–352.
- WHO/FAO. (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London. UK.
- Wishart, D. S. (2008). Metabolomics: Applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 482–493.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*, 51, 221-271.
- Wong, N. P., Walter, H. E., Vestal, J. H., Lacroix, D. E., Alford, J. A. (1972). Cheddar cheese with increased polyunsaturated fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 56, 1271-1275.
- Woo, A. H., Lindsay, R. C. (1984). Concentrations of major free fatty acids and flavor development in Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 67, 960-968
- Yazici, M., Dervisoglu, M., Akgun, A., Aydemir, O. (2010). Effect of whey pH at drainage on physicochemical, biochemical, microbiological and sensory properties of Mozzarella cheese made from buffalo milk during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 93, 5010-5019.
- Yu, J. H. (1986). Studies on the extracellular and intracellular lipase of *Lactobacillus casei*. I. On the patterns of free fatty acids liberated

- from milk reacted with the lipases. *Korean Journal of Dairy Science*, 8, 167-177.
- Yun, J. J., Barbano, D. M., Kiely, L. J., Kinstedt, P. S. (1995). Mozzarella cheese: Impact of rod to coccus ratio on chemical composition, proteolysis and functional characteristics. *Journal of Dairy Science*, 78, 751–760.
- Yun, J. J., Barbano, D. M. (1992). Effect of draw pH on the development of curd structure during the manufacture of Mozzarella cheese. *Food Structure*, 11, 217-224
- Yun, J. J., Kiely, L. J., Barbano, D. M., Kindstedt, P. S. (1993b). Mozzarella cheese: Impact of cooking temperature on chemical composition, proteolysis and functional properties. *Journal of Dairy Science*, 76, 3664-3673.
- Yun, J. J., Kiely, L. J., Kindstedt, P. S., Barbano, D. M. (1993a). Mozzarella cheese: Impact of milling pH on functional properties. *Journal of Dairy Science*, 76, 3639-3647.
- Zarate, V., Belda, F., Perez, C., Cardell, E. (1997). Changes in the microbial flora of Tenerife goats milk cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 7, 635-641.
- Zisu, B., Shah, N. P. (2005). Textural and functional changes in low-fat Mozzarella cheeses in relation to proteolysis and microstructure as influenced by the use of fat replacers, pre-acidification and EPS starter. *International Dairy Journal*, 15, 957–972.
- Zoon, P., Allersman, D. (1996). Eye and crack formation in cheese by carbon dioxide from decarboxylation of glutamic acid. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 309-318.