

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS

“EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS BACTERIAS
PROBIÓTICAS EN QUESO TIPO PARIA”

PRESENTADA POR

YONATHAN TAPIA ARIZANCA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PUNO – PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN

TESIS

“EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS
EN QUESO TIPO PARIA”

PRESENTADA POR

YONATHAN TAPIA ARIZANCA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR

PRESIDENTE

Ph.D. Juan Marcos, ARO ARO

PRIMER MIEMBRO

M.Sc. Florentino Víctor, CHOQUEHUANCA CÁCERES

SEGUNDO MIEMBRO

M.Sc. Roger, SEGURA PEÑA

DIRECTOR

Ing. Edgar, GALLEGOS ROJAS

ASESOR

Ing. Saire Roenfi, GUERRA LIMA

ASESOR

M.Sc. Genny Isabel, LUNA MERCADO

PUNO - PERU
2014

Área: Ingeniería y tecnología

Tema: Desarrollo de procesos y productos agroindustriales sostenibles y eficientes

DEDICATORIA

*Al que me concedió la vida,
iluminándome en todo momento
con sus sabios e incomparables
consejos, permitiendo superarme
hasta llegar muy lejos realizando
su voluntad.*

*Con profundo amor a mis padres:
L. Felix Tapia y Filomena
Arizanca, quienes con gran
esfuerzo y sacrificio desmedido que
me permite llegar a cumplir con
mis metas y seguir más allá.*

*Con inmenso cariño a mis
hermanas Ana y Yola, quienes
inspiran en mí, prudencia y ansias
de superación profesional y en todo
aspecto de mi vida.*

*A mi novia Karina por estar
siempre a mi lado, tanto en los
momentos buenos como en los
malos, por su apoyo incondicional
y salir juntos adelante.*

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por colmarme siempre con sus bendiciones y por ser mi guía todo el tiempo, permitiéndome siempre avanzar y alcanzar mis metas con éxito.

Mi más profundo agradecimiento a la Universidad Nacional del Altiplano - Puno, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, a su plana docente y administrativo por haber cooperado en mi formación profesional.

A la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Altiplano, por brindarme el uso de sus laboratorios: microbiología, fisicoquímicas y evaluación sensorial.

Al Director de tesis, Ing. Edgar Gallegos, a los señores Asesores, Ing. Roenfi Guerra quien con sus conocimientos me guió durante el desarrollo del presente proyecto; A la Ing. Genny Luna Mercado le agradezco por toda la colaboración y sugerencias para el bien y mejora de mi proyecto de titulación.

Profundo agradecimiento a mis padres: Félix y Filomena, mi abuelito Valentín quienes han sido mi apoyo incondicional a lo largo de mi vida; en especial a mi novia Karina, gracias por su amor y por creer siempre en mí.

Yonathan Tapia

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Queso	2
2.1.1. Composición química del queso	3
2.2. Microorganismos probióticos	4
2.2.1. Microorganismos usados como probióticos	6
2.2.2. Aplicación de los probióticos	6
2.2.3. Factores biológicos y tecnológicos en el uso de probióticos	7
2.2.4. Efectos de los probióticos en las propiedades de los productos lácteos	7
2.2.5. Cultivo de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	8
2.2.5.1. Las bacterias ácido lácticas	8
2.2.5.2. Género <i>Lactobacillus</i>	11
2.2.5.3. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	14
2.2.5.4. Potencial probiótico de <i>Lactobacillus acidophilus</i> : beneficios para la salud	16
2.2.6. <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	19
2.2.7. Propiedades benéficas para la salud	20
2.3. Técnica de elaboración de queso fresco probiótico	20
2.3.1. El queso fresco	20
2.3.1.1. Proceso tecnológico	24
2.4. Vida útil de los alimentos	33
2.5. Evaluación sensorial de los alimentos	34
2.5.1. Atributos sensoriales del alimento	35
III. MATERIALES Y METODOLOGÍA	
3.1. Ubicación	37
3.2. Material Experimental	37
3.2.1. Materia prima	37
3.2.2. Equipos, instrumentos de elaboración	37
3.2.3. Instrumentos de vidrio de laboratorio	38

3.2.4. Reactivos	39
3.2.5. Insumos	39
3.2.6. Medios de cultivo	40
3.3. Metodología Experimental	41
3.3.1. Descripción del proceso de la elaboración del queso	42
3.3.1.1. Recepción	42
3.3.1.2. Filtrado	42
3.3.1.3. Pasteurizado	42
3.3.1.4. Enfriado	42
3.3.1.5. Adición de aditivos	42
3.3.1.6. Inoculado del fermento láctico	43
3.3.1.7. Adición de cuajo	43
3.3.1.8. Coagulación	43
3.3.1.9. Corte de la cuajada	43
3.3.1.10. Reposo	43
3.3.1.11. Batido	43
3.3.1.12. Desuerado	44
3.3.1.13. Lavado	44
3.3.1.14. Salado	44
3.3.1.15. Pre-prensado	44
3.3.1.16. Moldeado	44
3.3.1.17. Prensado	44
3.3.1.18. Desmoldeado	45
3.3.1.19. Salado de los quesos	45
3.3.1.20. Oreado	45
3.3.1.21. Almacenamiento	45
3.4. Métodos de Análisis	46
3.4.1. Análisis fisicoquímico	46
3.4.1.1. Análisis fisicoquímico, materia prima	46
3.4.1.2. Análisis fisicoquímico del producto final	47
3.4.2. Análisis microbiológico	50
3.4.3. Análisis sensorial	51
3.5. Diseño Experimental	52
3.5.1. Variables de estudio	52

3.5.2. Variables de respuesta	53
3.6. Diseño Estadístico	53
3.6.1. Evaluación de la calidad microbiológica del queso tipo paria	53
3.5.2. Evaluación sensorial de los quesos	55
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Efecto de los microorganismos Probióticos en los parámetros microbiológicos	56
4.1.1 Efecto de los microorganismos probióticos en <i>Listeria monocytogenes</i> del queso tipo paria	56
4.1.2. Efecto de los microorganismos probióticos <i>Estaphylococcus aureus</i> del queso tipo paria	61
4.1.3. Efecto de los microorganismos probióticos en <i>Salmonella sp.</i> del queso tipo paria	65
4.1.4. Efecto de los microorganismos probióticos en de <i>Coliformes</i> del queso tipo paria	70
4.2. Estudio de la viabilidad de las cepas probióticas	74
4.3. Efecto de los microorganismos probióticos en las cualidades fisicoquímicas del queso tipo paria	80
4.3.1. Determinación de pH	81
4.3.2. Análisis proximal	83
4.4. Análisis sensorial de los quesos tipo paria	84
4.4.1. Apariencia general	85
4.4.2. Color	87
4.4.3. Sabor	90
4.4.4. Aroma	93
4.4.5. Textura	96
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1. Conclusiones	100
5.2. Recomendaciones	101
VI. BIBLIOGRAFÍA	102
VII. ANEXOS	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1:	Bacterias ácido lácticas importantes para la industria láctea	10
Tabla 2.2:	Requerimientos microbiológicos en queso tipo paria	23
Tabla 2.3:	Requerimientos fisicoquímicas del queso tipo paria	23
Tabla 3.1:	Esquema del ANVA	54
Tabla 4.1:	Conteos microbiológicos de <i>Listeria monocytogenes</i> obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico) durante 28 días	57
Tabla 4.2:	Conteos microbiológicos de <i>Staphylococcus aureus</i> obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico) durante 28 días	61
Tabla 4.3:	Conteos microbiológicos de <i>Salmonella sp</i> obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico) durante 28 días	66
Tabla 4.4:	Conteos microbiológicos de coliformes obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico) durante 28 días	70
Tabla 4.5:	Recuentos promedio de las colonias de <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Lactococcus lactis</i>	74
Tabla 4.6:	Los valores de pH de los quesos	81
Tabla 4.7:	Composición química de quesos	83
Tabla 4.8:	Calificaciones promedio obtenidas en el análisis sensorial de apariencia general de los tratamientos T0 (control) , T1, T2, y T3 y valoración asignada según escala hedónica, después de su elaboración hasta 28 días de almacenamiento	85
Tabla 4.9:	Calificaciones promedio obtenidas en el análisis sensorial de color de los tratamientos T0 (control) , T1, T2, y T3 y valoración asignada según escala hedónica, después de su elaboración hasta 28 días de almacenamiento	88
Tabla 4.10:	Calificaciones promedio obtenidas en el análisis sensorial de sabor de los tratamientos T0 (control), T1, T2, y T3 y valoración	

asignada según escala hedónica (1, 2, 3, 4, y 5), después de su elaboración hasta 28 días de almacenamiento 91

Tabla 4.11: Calificaciones promedio obtenidas en el análisis sensorial de aroma de los tratamientos T0 (control), T1, T2, y T3 y valoración asignada según escala hedónica, después de su elaboración hasta 28 días de almacenamiento 94

Tabla 4.12: Calificaciones promedio obtenidas en el análisis sensorial de textura de los tratamientos T0 (control), T1, T2, y T3 y valoración asignada según escala hedónica, después de su elaboración hasta 28 días de almacenamiento 97



LISTA DE GRÁFICOS

Grafico 4.1: Conteos microbiológicos de <i>Listeria monocytogenes</i> obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico), en el día 0 después de la elaboración	59
Grafico 4.2: Conteos microbiológicos de <i>Staphylococcus aureus</i> obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico), en el día 0 después de la elaboración	63
Grafico 4.3: Conteos microbiológicos de <i>Salmonella sp</i> obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico), en el día 0 después de la elaboración	68
Grafico 4.4: Conteos microbiológicos de Coliformes (NMP) obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico), en el día 0 después de la elaboración	72
Grafico 4.5: Recuento de T1 (<i>Lactococcus lactis</i>), T2 (<i>Lb. acidophilus</i>), T3 (<i>Lactococcus lactis</i>) y T3 (<i>Lb. acidophilus</i>) en log UFC/g durante el tiempo de almacenamiento	76
Grafico 4.6: Evolución pH para los quesos, evaluado semanalmente durante 28 días de estudio	82
Grafico 4.7: Apariencia general de los tratamientos (quesos)	86
Grafico 4.8: Color de los tratamientos (quesos)	89
Grafico 4.9: Sabor de los tratamientos (quesos)	92
Grafico 4.10: Aroma de los tratamientos (quesos)	95
Grafico 4.11: Textura de los tratamientos (quesos)	98

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1:** Flujo grama de elaboración del queso tipo paria 41
- Figura 4.1:** Fotografía de una placa de MRS agar inoculada con una muestra de queso del tratamiento T3. En dilución 10^{-4} , después de la incubación por 24 horas a 37°C, conteniendo colonias de *L. acidophilus* 75



ABREVIATURAS

%	: Porcentajes
°C	: Grados Celsius
ALS	: Diferencia Limite Significativa
ANVA	: Análisis de Varianza
BAL	: Bacterias Ácido Lácticas
DCA	: Diseño completamente al Azar
DCBA	: Diseño Bloque completamente al Azar
GL	: Grados de libertad
gr	: Gramos
GRAS	: Generalmente Reconocidos Como Seguros
Lt	: Litros
ml	: Mililitros
MRS	: Man, Rogosa & Sharp
NTP	: Norma Técnica Peruana
pH	: Potencial de iones hidrógeno
TRAM	: Tiempo de Reducción del Azul de Metileno
UFC	: Unidad Formadora de Colonia
TRAT.	: Tratamientos

RESUMEN

La presente investigación titulada: “Evaluación de la influencia de las bacterias probióticas en la vida útil del queso tipo paria”, tuvo como objetivos, evaluar la influencia las cepas probióticas y su viabilidad en las características microbiológicas del queso tipo paria durante su vida útil, determinar la influencia de las cepas probióticas en las características fisicoquímicas y organolépticas durante la vida útil del queso tipo paria. Esta investigación se llevó a cabo en la planta procesadora de Acora – Puno - Perú y los análisis microbiológicos, fisicoquímicos y evaluación sensorial en la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial – FCA- UNA, realizado durante los meses enero – marzo del año 2013. En la investigación se ha obtenido la viabilidad del *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis* durante la vida útil del queso tipo paria con niveles promedio de 10^7 y 10^6 ufc/g respectivamente. Este nivel de viabilidad podría conferir al producto en estudio propiedades dieto- terapéuticas al consumir entre 60 y 100 g de queso tipo paria probiótico diariamente. También la incorporación de microorganismos de las bacterias probióticas, durante el proceso de elaboración de queso tipo paria resultó ser un vehículo ideal para las bacterias probióticas pues las colonias se mantuvieron viables y sobre los niveles mínimos recomendables para considerar al producto como probiótico sobre la inocuidad microbiológica de los agentes patógenos del queso tipo paria, se logró inhibir estas bacterias, gracias a la acción de las bacterias probióticas y su capacidad de producir sustancias antibacterianas, como se demuestra en el tratamiento que contiene la combinación de las bacterias probióticas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis* (T3), reduciendo su carga microbiana inicial de *Streptococcus aureus* de 20×10^2 ufc/gr, *salmonella sp* es 10×10^2 ufc/gr durante el tiempo de vida útil se ha inhibido por completo. También el producto presenta además propiedades sensoriales, fisicoquímicas adecuadas y las características sensoriales favorables durante el tiempo de vida útil, especialmente en el sabor, atributo que, mediante pruebas de análisis sensorial, se encontró en el queso con probióticos en el T3, más agradable que en las muestras de un queso tipo paria comercial y el queso tipo paria control.

I. INTRODUCCIÓN

La Región Puno está considerada dentro de los primeros lugares de producción ganadera bovina por poseer condiciones favorables para la producción lechera y debido a que en estos últimos años se ha incrementado el consumo de leche y productos lácteos.

El queso desde hace mucho tiempo es una forma de conservar los principales componentes de la leche como: caseína y la materia grasa, y ahora también mantener viables las bacterias probióticas, por lo que se considera al queso como un alimento altamente nutritivo que se obtiene por coagulación de la leche con la acción de enzimas (cuajo) y separación de suero hasta obtener el producto.

En la actualidad en el Departamento de Puno se viene desarrollando en producción lechera, del cual la mayor parte va destinada a la transformación de quesos tipo paria, que es bastante consumido por la población de Puno y otras regiones del país. Pero sin embargo es un alimento perecible que se ve afectado por el deterioro principalmente microbiológico, dado que no se realiza controles rigurosos desde la calidad de la materia prima y durante el proceso de elaboración del producto.

Es necesario por lo tanto, buscar la manera de mejorar la calidad y vida útil del queso utilizando las bacterias probióticas: *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis*, que tiene la facultad de producir algunas sustancias antibacterianas conocidas en forma genérica como bacteriocinas, son capaces de inhibir el crecimiento de un amplio rango de microorganismos patógenos que son responsables de frecuentes brotes de intoxicaciones alimentarias.

De acuerdo a lo descrito en los párrafos anteriores, en el presente trabajo de investigación se desarrollaron los siguientes objetivos: a). Evaluar la influencia de las cepas probióticas y su viabilidad en las características microbiológicas del queso tipo paria durante su vida útil, b). Determinar la influencia de las cepas probióticas en las características fisicoquímicas y organolépticas durante la vida útil del queso tipo paria

II. MARCO TEORICO

2.1. QUESO

NTP 202.195 (2004), define al queso como un producto fresco o madurado, sólido o semisólido que se obtiene mediante: 1) coagulación de la leche pasteurizada, entera, descremada, parcialmente descremada, crema, crema de suero, suero de mantequilla o una combinación de cualquiera de estos, por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados y escurriendo parcialmente el suero que se produce de dicha coagulación. 2) técnicas de elaboración que comprende la coagulación de la leche y/o de materiales que fueron obtenidos de leche y que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido.

Oria, (1991), indica que el queso es el resultado de la concentración selectiva de la leche que contiene caseína coagulada, materia grasa, agua y sales minerales, los que hacen al queso como un alimento con un alto valor nutritivo.

Por otro lado, Dubach, (1998), define al queso como una conserva obtenida por la coagulación de la leche, por la acidificación y deshidratación de la cuajada. Es una concentración de sólidos de la leche con la adición de: cuajo para obtener coagulación de la leche, fermentos bacterianos para acidificación de la cuajada, sal al gusto del consumidor y cloruro de calcio para mejorar la disposición a la coagulación.

2.1.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL QUESO

- **HUMEDAD**

Veisseyre, (1980), menciona que el contenido del agua en el queso varía mucho, oscila entre 20 y 65%, esta oscilación comprende entre distintos tipos de queso.

- **PROTEINA**

Veisseyre, (1980), señala que la proteína de la leche más importante en la elaboración de quesos, es la caseína que representa un 80% de la proteína, se encuentra en estado de fosfocaseinato de calcio, que se coagula por la acción del cuajo.

- **GRASA**

Dubach, (1988), indica que la grasa se encuentra en la leche en forma de gránulos formando una emulsión. En la elaboración de quesos se deben contar con una leche de 3% grasa mínima.

- **CENIZA**

Oria, (1991), señala que está compuesto por una diversidad de minerales, los que se encuentran más o menos en cantidades considerables son: K, Na, Ca, Mg, Cl, fosfatos, citratos, sulfatos y bicarbonatos, encontrándose el Ca, P y S en partes combinadas con proteínas.

2.2. MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

En los recientes años, ha surgido un interés renovado en el uso de microorganismos en alimentos debido a su aporte en el sabor y aroma, pero principalmente por sus aspectos beneficiosos como la utilización como biopreservadores en productos alimenticios de diversa índole, incluyendo productos lácteos como quesos frescos y madurados, con el objeto de evitar la proliferación de patógenos como *Listeria monocytogenes*, diversas especies de *Clostridium* y *Staphylococcus aureus*, siendo este último reconocido como responsable de frecuentes brotes de intoxicaciones alimentarias (Chukeatirote, 2003).

Bajo condiciones naturales, se desarrolla una micro flora protectora en el intestino y no es necesario un suplemento bacteriano, pero los cambios en los hábitos alimenticios y el estilo de vida han hecho que se consuman alimentos procesados y estériles, sustancias antibacterianas desde vinagre hasta antibióticos, lo que afecta el acceso y la colonización de ciertos tipos de bacterias (Anuradha y Rajeshwari, 2005).

Los principales efectos benéficos para la salud de humanos y animales de los probióticos son el balance de la micro flora intestinal, el mejoramiento del sistema inmune y prevención de cáncer (Chukeatirote, 2003).

Los cultivos probióticos deben tolerar las condiciones acídicas del estómago, las enzimas digestivas y sales biliares del intestino delgado, por lo tanto están capacitados para colonizar el íleon terminal y el colon. Sin embargo,

cada cepa tiene propiedades únicas con respecto a la velocidad de crecimiento, actividad metabólica y proteolítica y producción de sabor (Vuyst, 2000).

Liong y Shah (2005), encontraron que cepas de *lactobacilos* (*acidophilus* y *casei*) tienen buena tolerancia a los ácidos y bilis, y una alta remoción de colesterol a través de varios mecanismos.

Una bacteria antes de ser seleccionada como probiótico, debe cumplir los siguientes requisitos: no ser patógena, no tóxica, mantener viabilidad durante el almacenamiento y uso, tener la capacidad para sobrevivir y metabolizar en el intestino y finalmente tener efectos en la salud documentados (Anuradha y Rajeshwari, 2005).

Se sugiere que el número mínimo de bacterias probióticas al momento del consumo de un producto probiótico sea de 10^7 células viables por mililitro o gramo de producto. La dosis terapéutica mínima debería ser 10^8 a 10^9 células viables, lo cual se puede conseguir con una ingesta de aproximadamente 100 gramos de un producto que contiene 10^6 - 10^7 células viables por mililitro o gramo (Vuyst, 2000). Además, Roy (2005), señala que la industria láctea, en general, ha establecido poblaciones de 10^6 ufc/g de la cepa que se ha agregado al momento del consumo, y que este estándar se ha adoptado basándose en consideraciones tecnológicas y económicas.

2.2.1. MICROORGANISMOS USADOS COMO PROBIÓTICOS

Según Chukeatirote (2003), las especies más usadas como probióticos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), un grupo de bacterias Gram positivas, que está constituido por varias especies incluyendo los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Bifidobacterium* y *Weissela*. Así mismo, los *lactobacilos* y las *bifidobacterias* constituyen una proporción significativa de las bacterias ácido lácticas probióticas usadas en países desarrollados.

El uso de BAL en alimentos tiene una larga historia y la mayoría de las cepas son consideradas microorganismos comestibles sin potencial patogénico (Salminen y Ouwehand, 2002).

Los miembros del género *Lactobacillus* son generalmente reconocidos como seguros (GRAS), mientras los miembros del género *Streptococcus* y *Enterococcus* contienen muchos patógenos oportunistas (Salminen y Ouwehand, 2002).

2.2.2. APLICACIÓN DE LOS PROBIÓTICOS

Los productos probióticos comercializados actualmente se pueden dividir en tres tipos: a) los alimentos fermentados convencionales a los que se les adicionan probióticos y que se consumen, principalmente, con fines nutritivos (yogures, leche, quesos, etc.); b) las leches cultivadas y fermentadas, utilizadas, básicamente, como vehículos de bacterias probióticas, y c) los suplementos dietéticos o preparaciones farmacéuticas liofilizadas (Sanz et al., 2003).

2.2.3. FACTORES BIOLÓGICOS Y TECNOLÓGICOS EN EL USO DEPROBIÓTICOS

Los factores que deberían ser considerados en el desarrollo de alimentos que contengan probióticos son: selección de la cepa (con respecto a sus propiedades biológicas y tecnológicas), nivel de toxicidad, adaptación al proceso (principalmente tipo de sustrato, competencia con otros cultivos lácticos, calentamiento), identificación y enumeración de la población viable, estabilidad durante el almacenamiento (pH, oxígeno), cambios en las propiedades sensoriales (Champagne y Gardner, 2005).

Del mismo modo, para Shah (2000), la viabilidad de las bacteria probiótica en productos lácteos fermentados hechos con cultivos iniciadores comerciales podría estar dada por adición de micronutrientes en forma de péptidos y aminoácidos o cisteína, además, otras formas para proveer viabilidad incluyen adaptación al estrés, micro encapsulación, fermentación en 2 pasos, selección de cepas resistentes a ácidos y bilis y uso de contenedores apropiados que sean impermeables al oxígeno.

2.2.4. EFECTOS DE LOS PROBIÓTICOS EN LAS PROPIEDADES DE LOS PRODUCTOS LÁCTEOS

Según Champagne y Gardner (2005), cuando las células probióticas representan menos que el 10% de la población total en el producto fermentado, su efecto en las propiedades sensoriales es mínimo. Frecuentemente hay cambios en la composición química y textura de los productos fermentados, pero esos cambios no necesariamente afectan al sabor.

En muchos casos, basados en evaluaciones sensoriales, no se observan

diferencias claras entre los gustos de quesos que contienen probióticos y los controles hechos solo con los cultivos starters (Dinakar y Mistry, 1994)

2.2.5. CULTIVO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

2.2.5.1. LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo de microorganismos benignos que tienen la capacidad de producir ácido láctico como producto final del proceso de fermentación. Se encuentran en grandes cantidades en plantas, animales y en el ser humano, en especial en el tracto digestivo. Principalmente se pueden encontrar dentro de este grupo los géneros *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus lactis* o *Lactococcus lactis* (Prescott y Duna, 1959).

Este tipo de bacterias se caracterizan por ser Gram positivas, con una pared celular gruesa, no forman esporas, y de varias morfologías: cocos o bastones, grandes o pequeños. Son catalasa negativa, aunque en algunos casos pueden encontrarse pseudo-catalasa, pueden formar cadenas y son inmóviles. Son anaerobias pero aerotolerantes (Castillo y Mestres, 2004).

Su metabolismo productor de energía es estrictamente fermentativo, formando principalmente ácido láctico a partir de azúcares. Las hay de dos tipos: las *homofermentadoras* que convierten la glucosa en ácido láctico vía Embden-Meyerhoff (glucólisis), y las *heterofermentadoras* que la convierten en una mezcla de ácido láctico, etanol, dióxido de carbono y otros productos volátiles mediante la ruta de la pentosa fosfato. La capacidad fermentativa varía de acuerdo con la especie. La mayor parte de bacterias

lácticas forman entre 0.5 y 1.5% de ácido láctico, pero algunas alcanzan niveles del 3% (Bylund, 2003).

Las bacterias lácticas se pueden clasificar también según la temperatura óptima para su desarrollo. Pueden ser mesófilas si su temperatura óptima de crecimiento está entre 20 y 30°C, o termófilas si su rango de temperatura está entre 35 y 45°C. La mayor parte mueren por calentamiento a 70°C, aunque algunos soportan hasta 80°C (Bylund, 2003; Castillo y Mestres, 2004).

Otra característica de este grupo de bacterias es su elevada tolerancia a pH ácidos, algunos sobreviven en rangos de pH entre 4.8 y 9.6. Produciendo el ácido láctico y secretando bacteriocinas crean un ambiente hostil que inhibe el crecimiento de algunas bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Shigella sonnei* (Frazier, 1976).

El uso de bacterias ácido lácticas en el método tradicional de preparar alimentos fermentados y productos lácteos, junto con la relación de simbiosis que mantiene con el individuo anfitrión, permite constatar que son seguros para el consumo, y que no tienen ningún o casi ningún efecto patógeno en el hospedero (Hernández, 2006).

En seguida, en la tabla, se describen algunas de las propiedades de las bacterias ácido- lácticas más utilizadas en la industria láctea.

Tabla N° 2.1: Bacterias ácido lácticas importantes para la industria láctea*

Especie	Temperatura optima (°C)	Fermentan Lactosa		Fermentan ácido cítrico a	Enzimas proteolític as	Utilizadas en
		A ácido láctico	A otras sustancias			
<i>Streptococcus termophilus</i>	40-45	0.7-0.8	-	-	Si	Leche acidificada, queso
<i>Streptococcus lactis</i>	25-30	0.5-0.7	-	-	Si	Leche acidificada
<i>Streptococcus cremoris</i>	25-30	0.5-0.7	-	-	Si	Leche acidificada
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	25-30	0.3-0.6	-	CO ₂ , Volátiles diacetilo	Si	Leche acidificada
<i>Leuconostoc cremoris</i>	25-30	0.2-0.4	CO ₂	CO ₂ , Volátiles diacetilo	Si	Queso, mantequilla
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	37	0.6-0.9	-	-	-	Leche acidificada
<i>Lactobacillus casei</i>	30	1.2-1.5	-	-	Si	Queso
<i>Lactobacillus lactis</i>	40-45	1.2-1.5	-	-	Si	Queso
<i>Lactobacillus herveticus</i>	40-45	2.0-2.7	-	-	Si	Leche acidificada
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	40-45	1.5-2.0	-	-	Si	Leche acidificada
<i>Bifidobacteriu m</i>	37	0.4-0.9	Ácido acético	-	-	Leche acidificada

*Bylund, 2003

2.2.5.2. GÉNERO LACTOBACILLUS

Todas las bacterias ácido lácticas de forma bacilar se encuentran dentro del género *Lactobacillus*. El término *Lactobacillus* es la unión del prefijo *lacto-* que significa leche y la raíz *bacillus* que significa vara o bastón. Los lactobacilos se caracterizan por tener forma de cilindros alargados, rectos o curvos. Su tamaño puede variar desde 0.5 hasta 6 m. Frecuentemente se

presentan en forma de cadenas cortas (Frazier, 1976; Rodríguez *et al*, 1994).

Muchos lactobacilos son los únicos seres vivos que no requieren hierro para vivir y tienen una tolerancia extremadamente alta al peróxido de hidrógeno. Son microorganismos microaerófilos, anaerobios o anaerobios facultativos. El crecimiento es óptimo a pH 5.5-5.8, pero resisten mejor las condiciones de acidez que otras bacterias ácido lácticas. Tienen requerimientos nutricionales complejos para aminoácidos, péptidos, nucleótidos, vitaminas, especialmente B, minerales, ácidos grasos y carbohidratos (Prescott y Duna, 1959; Mejía, 2001).

PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas son proteínas o complejos de proteínas sintetizadas por algunas bacterias gram+, con actividad bactericida contra especies que están estrechamente relacionados con la bacteria productora. Tienen la ventaja de que, al biodegradarse, no forman compuestos secundarios. Existen numerosas bacteriocinas producidas por lactobacilos, cada una tiene espectros de inhibición particulares para evitar el crecimiento de sus competidores. Actúan formando poros en la membrana citoplasmática, provocando la salida rápida de metabolitos requeridos para la biosíntesis de la célula (Castillo y Mestres, 2004; González *et al.*, 2003).

El efecto antimicrobiano de las BAL contra otras bacterias se conoce desde hace muchos años que una flora nativa intestinal estable regula la toxemia crónica natural que tiene un papel primordial en el envejecimiento y muerte. Aparte de la competencia por sustratos, los sitios de colonización y los

productos de la fermentación, resultan inhibitorios para muchos patógenos (Fernández, 2000).

El ácido láctico es producido por la vía homofermentativa de las BAL como el principal metabolito, puede interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas. Sin embargo, por la vía heterofermentativa se produce en pequeñas cantidades junto con el ácido acético, etanol y dióxido de carbono. El grado de disociación del ácido láctico depende del pH, donde un bajo pH se encuentra en la forma no disociada, siendo tóxico para hongos, levaduras y varias bacterias. En la actividad antimicrobiana, los esteroisómeros del ácido láctico difieren, de forma que el ácido L-láctico es más inhibitorio que el isómero D-láctico (Ouwehand 1993; Yang, 2000).

La fermentación reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y produce diversas moléculas orgánicas de bajo peso molecular que pueden presentar actividad antimicrobiana, siendo las más comunes el ácido láctico, acético y propiónico. No obstante, también se conoce que las bacterias ácido lácticas producen otras sustancias antagónicas, como son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), reuterina, dióxido de carbono (CO_2), diacetilo (2,3-butanodiona), acetaldehído y compuestos de alto peso molecular como las bacteriocinas (Ouwehand, 1993).

Según Ouwehand (1998), la fermentación reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y resulta en una cadena de moléculas orgánicas de bajo peso molecular que presentan actividad antimicrobiana, siendo las más comunes: el ácido láctico, el ácido acético y el ácido propiónico. No obstante, también se conoce que las bacterias lácticas producen además de ácidos orgánicos,

otras sustancias antagónicas, como el peróxido de hidrógeno y otros radicales libres, diacético, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos y otros metabolitos, como moléculas pequeñas no proteicas y bacteriocinas. Las BAL no sólo son interesantes en la industria alimentaria por inducir características organolépticas y estructurales deseables, sino también por inhibir el desarrollo de microorganismos no deseables, alterantes y patógenos, lo que sugiere la posibilidad de utilizarlas para extender la vida útil e incrementar la calidad higiénica de los alimentos. La reducción del pH y la utilización de los carbohidratos disponibles parecen constituir el principal mecanismo de antagonismo microbiano (Piard & Desmazeud 1991,1992; Ouwehand 1998).

Se han descrito diversos sistemas de inhibición microbiana desarrollada por bacterias lácticas como producción de ácidos orgánicos, formación de metabolitos de oxígeno, compuestos orgánicos, antibióticos y bacteriocinas. Estos mecanismos las hacen capaces de inhibir una gran variedad de microorganismos contaminantes y/o patógenos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Listeria* (Zamora-Rodríguez 2003).

Tradicionalmente se considera a las bacteriocinas como péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo, recientemente este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora (González-Martínez *et al.* 2000).

2.2.5.3 *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*.

La especie *Lactobacillus acidophilus* o *Thermobacterium intestinal* y es una de las más conocidas y estudiadas del género *Lactobacillus*. Es una bacteria comensal que habita normalmente en el ser humano, a lo largo del tracto digestivo y en la vagina, sin causar enfermedad. Es un microaerófilo homo fermentativo pues produce exclusivamente ácido láctico y peróxido de hidrógeno. En la industria láctea se lo utiliza para la fabricación de leche y yogur acidófilos. Este producto es consumido por individuos que padecen intolerancia a la lactosa, afección que la padecen cerca del 75% de la población mundial (Jones, 1999; Garassini, 1964).

En términos generales, es un microorganismo benéfico, ya que colabora con el cuerpo para conseguir más nutrientes de la comida que se ingiere, produce vitamina K, lactasa y sustancias antimicrobianas como acidolina, acidolfina, lactocidina y lactacina. Durante la digestión aumenta la biodisponibilidad de niacina, ácido fólico, vitamina B₆ (piridoxina), B₁₂, biotina, ácidos grasos y calcio. Puede ayudar en la desconjugación y separación de aminoácidos por los ácidos biliares que posteriormente pueden ser reciclados por el cuerpo (Prater, 2009; EBI, 2005).

Acidophilus significa con afinidad por los ácidos, aunque esto no significa que soporte mayor acidez que otros lactobacilos. Crece fácilmente en medios más ácidos que los ideales para otros microorganismos (pH 4.5 o menores hasta 3.5) y crece en condiciones óptimas a 37 °C. La temperatura máxima es de unos 43–48 °C. Por debajo de los 20 °C no se registra crecimiento alguno. Fermenta varios carbohidratos, entre ellos:

glucosa, galactosa, lactosa, maltosa y sucrosa. Se presenta en forma de bacilos medianos aislados o en cadenas cortas. Miden unas 2–6 μ m de largo, y a veces están algo redondeados en los extremos (Zamudio y Zavaleta, 2003; Locascio *et al.*, 2002).

Este microorganismo no resiste la pasteurización de la leche a 65°C por 30 minutos; la coagula en 48 horas. En este medio produce 0.8% de ácido láctico L (+), y si es leche enriquecida puede elevar la producción hasta 2%. Requiere para su crecimiento riboflavina, ácido fólico y cianocobalamina (vitamina B₁₂). A diferencia de otras bacterias ácido lácticas, su desarrollo tolera la presencia de cloruro de sodio (Hui, 2007).

Su clasificación taxonómica puede observarse en:

Clasificación taxonómica de *Lactobacillus acidophilus**

Dominio: Bacteria
Clase: *Bacilli*
Orden: *Lactobacillales*
Familia: *Lactobacillaceae*
Género: *Lactobacillus*
Especie: *L. acidophilus*

* EBI, 2005

2.2.5.4. POTENCIAL PROBIÓTICO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

BENEFICIOS PARA LA SALUD

Estudios realizados han demostrado que la especie *Lactobacillus acidophilus* presenta excelentes características probióticas, por resistir más de 24 horas a pH 3.5 y ser estable frente a ácidos y bilis,

condiciones que normalmente se presentan a lo largo del tracto gastrointestinal. Este microorganismo no es patógeno y es capaz de colonizar el intestino, cuando es de origen humano (Zamudio y Zavaleta, 2003; Wildman, 2006).

El principal beneficio que se le atribuye al *Lactobacillus acidophilus* es el mantenimiento del balance de la microbiota en el intestino al adherirse a las paredes intestinales y acidificar el medio. También existen estudios que demuestran que es eficaz en el tratamiento de diarreas causadas por antibióticos, diarrea del viajero y diarreas virales en niños (Rotavirus) (EBI, 2005; Bratman *et al*, 2009).

Ha demostrado ser efectivo en el tratamiento y prevención de ciertos tumores y cáncer de colon, además de tratar la enfermedad del intestino inflamado y el Síndrome del Intestino Irritable (IBS). Gracias a varias pruebas realizadas, se comprobó que esta especie ayuda a reducir el colesterol gracias a su capacidad de incorporar, durante su crecimiento, el colesterol del medio a la membrana celular (Hui, 2007; Bratman *et al*, 2009; Barberá y Marcos, 2008).

Es ampliamente consumido en leche acidófila por parte de individuos con intolerancia a la lactosa, pues al digerirla, no se presentan las molestias en los consumidores. Del mismo modo, se le atribuye el control de alergias, y ha interesado a investigadores en cuanto a la posibilidad de que *Lactobacillus acidophilus* esté implicado en el alivio de los síntomas de la artritis y los efectos de la quimioterapia y radioterapia (Pratter, 2009; EBI, 2005).

La utilización de cepas de *Lactobacillus acidophilus* se ha orientado también a la prevención y tratamiento de gastritis ocasionada por el uso de antiinflamatorios y *Helicobacter pylori*. Este microorganismo probiótico tiene un efecto protector en la mucosa gástrica, actúa con interferencia bacteriana, limitando el potencial dañino del patógeno y elevando la producción de prostaglandinas a nivel de la mucosa gástrica. Esto, eleva el flujo sanguíneo en la mucosa y la secreción de bicarbonato, aliviando la inflamación, molestia, dolor y el daño que pueda existir (Lazo *et al.*, 2007). Tiene efectos antimicrobianos contra los patógenos y hongos. Inhibe a *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella entérica* y *Salmonella typhimurium*. Impide además el crecimiento de *Candida albicans* causante de candidiasis en boca, esófago y vagina (Jones, 1999; Cabeza, 2006; EBI, 2005; Zamudio y Zavaleta, 2003; Goktepe *et al.*, 2005). Produce cuatro tipos de bacteriocinas: Acidolina, Acidofilina, Lactacina B y F. Actúan contra bacterias gram positivas y negativas, en especial *Clostridium sporogenes* y *Clostridium difficile* y las nombradas anteriormente. Ha sido demostrado que la Acidofilina elimina el 50% de las poblaciones de 27 tipos de patógenos, entre ellos: *Salmonella spp.*, *Shigella*, *E. coli* y *S. aureus* (Dolz, 2008; Hui, 2007; López *et al.*, 2002).

Estudios realizados reportan pocos efectos secundarios del *Lactobacillus acidophilus* en el organismo si se usa en las dosis recomendadas. La dolencia más común por su consumo es el malestar abdominal o gases, lo cual se cura con el uso continuado. Se requiere consumir entre 30 y 50 mil

millones de organismos vivos, tomándolos regularmente, de preferencia a diario. Se puede promover su desarrollo en el intestino gracias al consumo de fructo-oligo-sacáridos. Asimismo se debe considerar que la tasa de supervivencia de este y otros microorganismos probióticos varían con la forma de administración, siendo más alta en productos lácteos que en cápsulas (Hui, 2007; Baschet *al*, 2008; Bratmanet *al*, 2009; Goktepeet *al*, 2005).

2.2.6 LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS

Según, Valbuena E., *et al*, (2005); el *Lactococcus lactis subsp. lactis* es una bacteria ácido-láctica muy utilizada como cultivo iniciador principalmente en quesos madurados, capaz de producir algunas bacteriocinas, entre estas la nisina, por lo cual su uso como preservador es importante.

El *Lactococcus lactis subsp. lactis* es un microorganismo mesófilo, capaz de fermentar la lactosa produciendo ácido láctico en gran cantidad, de la misma forma es capaz de producir algunas sustancias antibacterianas conocidas en forma genérica como bacteriocinas, entre las cuales destacan la nisina y la diplococcina. Ambos factores, acidez y bacteriocinas, son capaces de inhibir el crecimiento de un amplio rango de microorganismos patógenos.

También según, Dermici, Y. y Hemme, D. (1994). Las bacterias ácido-lácticas han sido utilizadas como biopreservadores en productos alimenticios de diversa índole, incluyendo productos lácteos como quesos frescos y madurados, con el objeto de evitar la proliferación de patógenos como *Listeria monocytogenes*, diversas especies de *Clostridium* y *Staphylococcus aureus*, siendo este último

reconocido como responsable de frecuentes brotes de intoxicaciones alimentarias.

Así mismo los componentes de los sustratos que se encuentran incorporados en los medios de cultivo también pueden afectar la producción de nisina. Comparativamente los compuestos proteicos solubles presentes en el medio de MRS permitieron obtener menor cantidad de nisina, (Parente, 1992).

Algunas bacterias lácticas, como, son muy versátiles y su potencial ha aumentado notablemente en los últimos años como resultado de los recientes avances en la estabilización de genes heterólogos y en el control de su expresión, así como con la secuenciación completa de su genoma. De hecho, ya se ha descrito la producción heteróloga a escala industrial de una proteína (la lisosafina, con actividad antibacteriana) en *L. lactis* comprobándose que el escalado, la producción y el posterior procesamiento del producto eran simples y permitían obtener una proteína muy purificada y con actividad biológica (Mierau et al., 2005).

2.2.7 PROPIEDADES BENÉFICAS PARA LA SALUD

Se han reportado varios efectos benéficos en la salud, entre ellas se puede mencionar que *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* puede ser usado en el tratamiento del síndrome de colon irritable post infeccioso (Verdu et al., 2004).

Evidencias señalan que esta bacteria previene desórdenes ecológicos durante la administración de antibióticos como la clindamicina (Urteaga, 2003). Además, sobrevive el tránsito gastrointestinal y coloniza el intestino (Crittenden et al., 2002).

2.3 TÉCNICA DE ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO PROBIÓTICO

2.3.1. EL QUESO FRESCO

La utilización de un microorganismo probiótico como cultivo adjunto en la elaboración de queso solamente dará lugar a un queso funcional si se mantiene la viabilidad del microorganismo durante el período de maduración del queso, y si las características organolépticas no son afectadas negativamente. Por lo tanto, antes de incorporar una bacteria probiótica en un producto lácteo es necesario hacer ensayos de viabilidad y de funcionalidad durante el proceso de elaboración y el período de vida útil del producto. Fruto de esa necesidad son los trabajos realizados por diferentes científicos con diferentes cepas probióticas en distintos tipos de queso (Ross et al., 2002; Stanton et al., 1998).

La producción de estos quesos se restringe a áreas geográficas muy localizadas, a las que a menudo deben su nombre, y se lleva a cabo en pequeñas queserías, frecuentemente unifamiliares. En este contexto, cabe señalar que Asturias es la Comunidad Autónoma española que posee la mayor variedad de quesos artesanales, contabilizándose en este momento más de 40 quesos diferentes, entre los que se encuentran quesos de leche de vaca, de cabra, de oveja, y de mezcla (Alais, 2005).

El queso es un producto lácteo que se viene fabricando desde varios siglos atrás. Se produjo por primera vez por accidente, pero con el paso del tiempo se determinó el proceso de fabricación y se lo difundió alrededor del mundo. Su fabricación ha sido artesanal en muchas regiones, pero hoy en día gran parte de la producción es industrial gracias a su importante

desarrollo en los últimos años debido a su valor nutritivo (Ordóñez, 1998).

La materia prima principal para la elaboración de quesos es la leche. Ésta ha sido definida como el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostro, procedente del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras domésticas sanas y bien alimentadas. La leche es secretada por las glándulas que poseen las hembras mamíferas, siendo su función biológica alimentar a los recién nacidos (Ordóñez, 1998).

Entre las especies que producen leche usada en quesería se encuentran principalmente las vacas, ovejas y cabras. Es la leche de vaca la más usada en quesería en nuestro país (Luquet, 1993).

La norma NTP. 2004, define al queso como el producto lácteo fresco o maduro que se obtiene por separación del suero de la leche entera, parcial o totalmente descremada, coagulada por acción del cuajo u otros coagulantes apropiados.

El queso fresco se caracteriza por tener bordes regulares y caras lisas, una textura suave no esponjosa, su color puede ir del blanco a la crema, libre de colorantes. Deben presentar un sabor y olor lácteo característico, una humedad mayor al 65% pero no superar el 80%; su contenido de grasa puede variar según su condición de semigraso (25%), graso (45%) o rico en grasa (60%), (Norma NTP 202.195).

Microbiológicamente debe cumplir con las características presentadas en la Tabla N° 2.2.

Tabla N° 2.2: Requerimientos microbiológicos en queso tipo paria.

Agente microbiano	Limite por gr	
	m	M
<i>Coliformes</i>	5x10 ²	10 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	10 ²
<i>Escherichia coli</i>	3	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia/25 gr	-
<i>Salmonella sp.</i>	Ausencia/25 gr	-

Fuente: NTS 071 – MINSA/DIGESA V. 01, 2008. “Norma sanitaria, que establece los criterios microbiológicos de calidad e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano”.

Las características fisicoquímicas del queso tipo paria con su consistencia están clasificadas como un queso de pasta semidura. A continuación en la siguiente tabla se muestra:

Tabla N° 2.3: Requerimientos fisicoquímicas del queso tipo paria.

Componentes nutricionales	Composición x 100 gr
PROTEINA	21.7
HUMEDAD	41.8
GRASA	28.5
CENIZAS TOTALES	5.4
CARBOHIDRATOS	2.6
ENERGIA TOTAL (Kcal)	353.7

Fuente: Norma NTP 202.195 (2004).

El queso fresco es una variedad ampliamente producida en Latinoamérica y en

nuestro país por la sencillez del procesamiento, su costo más bajo y el rendimiento mayor al obtenido en comparación con otras variedades (Luquet, 1993; Inda, 2000).

2.3.1.1. PROCESO TECNOLÓGICO

Las operaciones que se aplican para la obtención del queso son principalmente la acidificación y deshidratación de la leche. Existen tres factores que condicionan la elaboración de un queso, su calidad y sus características finales: la leche, la fermentación de la misma y la tecnología empleada en la elaboración (Martegani, 2006).

Preparación de la leche

La leche es una mezcla de proteínas, grasa, carbohidratos, sales y agua, en equilibrio dinámico. Sus compuestos se encuentran en suspensión coloidal, emulsión o solución. La composición de la leche depende de varios factores como tipo y raza de animal, su alimentación, medio ambiente, hora de ordeño, época del año y periodo de lactancia. El contenido de grasa, proteína y minerales (calcio y fósforo) afecta la calidad del queso y su rendimiento (López *et al*, 2002).

Es importante aplicar en la leche una serie de pruebas y procedimientos para acondicionarla y asegurar la calidad del producto final por obtener (López *et al*, 2002).

1. Pruebas de calidad

Las pruebas se realizan al recibir la leche en la planta y son:

Organolépticas

La leche debe ser de un color blanco opalescente o ligeramente amarillento. Su olor debe ser suave, lácteo característico sin olores extraños. Debe tener un aspecto homogéneo libre de materiales extraños (Norma NTP 202.195).

Físico-Químicas

Se debe medir la densidad de la leche con la ayuda de un lactodensímetro. El rango de densidad debe estar entre 1.0296 y 1.034 a 20°C (Norma NTP 202.195).

La acidez expresada en porcentaje de ácido láctico debe estar entre 0.14 y 0.18. También se puede medir el pH que debe estar entre 6.5 y 6.7 (Norma NTP 202.195).

Se debe evitar usar leches contengan inhibidores, antibióticos, higienizantes o detergentes; leches mastíticas o el calostro (Martegani, 2006; Inda, 2000).

Microbiológicas

La leche debe tener buena calidad microbiológica para evitar fermentaciones y reacciones no deseables. Las características nutricionales de la leche la hacen un medio de cultivo ideal para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. La leche obtenida incluso de animales sanos extraída con rutinas de ordeño adecuadas e higiénica, contienen siempre microorganismos en una proporción variada entre 10^3 y 10^6 ufc/ml. Para evitar su crecimiento

exagerado, se debe enfriar la leche inmediatamente después de ordeñada a 4-10°C hasta su procesamiento (Martegani, 2006; López *et al*, 2002).

Para comprobar el grado de contaminación microbiológica se le aplica la prueba TRAM (Tiempo de reducción del Azul de Metileno) o reductasa, en la cual, como mínimo debe tardarse 2 horas en decolorarse (Norma NTP 202.195).

2. Filtración

Se filtra para retirar partículas grandes que han caído en la leche por el manejo y el transporte (Pardo y Almanza, 2003).

3. Estandarización

La mayoría de quesos se fabrican con leche entera, pero se puede normalizar el contenido de grasa según las exigencias de los consumidores. Se puede ajustar aumentando el contenido de grasa al agregar leche con mayor contenido de grasa, crema de leche o aceites de mantequilla. También se puede disminuir por descremado o adición de leche descremada (Ordóñez, 1998; Bedolla *et al*, 2004).

4. Pasteurización

Antes de su utilización, la leche debe ser sometida a un proceso de pasteurización para obtener una calidad higiénica adecuada. Destruye los microorganismos no deseados y patógenos, con lo cual garantiza la salud del consumidor. Además se le da al cultivo a emplear, un medio libre de competencia. Es un procedimiento fundamental en la elaboración de quesos frescos de corta maduración y en los curados no más de 2 meses (Luquet, 1993; Bylund, 2003; Martegani, 2006).

Para quesos frescos las condiciones de pasteurización son 74°C por 15 segundos o 65°C por 30 minutos para la destrucción efectiva de microorganismos patógenos (Ordóñez, 1998; Castillo y Mestres, 2004).

5. Correcciones

Con la pasteurización la leche pierde algunas de sus propiedades coagulantes, pierde entre 8 y 30% de calcio soluble. Por lo tanto, dan coágulos más débiles y más difíciles de desuerar, provocando pérdidas por los tratamientos mecánicos a aplicar. El uso de cloruro de calcio restituye parte de este calcio. Se puede añadir como máximo 20 g por cada 100 litros de leche, a temperaturas no mayores a 40°C y por lo menos 20 minutos antes de cuajar (Pardo y Almanza, 2003; Martegani, 2006; Bylund, 2003).

6. Inoculación de cultivos iniciadores

Los cultivos iniciadores se añaden a la leche para que se produzca la acidificación gracias a la producción de ácido láctico, ya que con la pasteurización se pierde la mayoría de la microbiota natural. Los microorganismos que se añaden son seleccionados de acuerdo con las características que se quiera conferir al queso (Ordóñez, 1998; Castillo y Mestres, 2004).

En los quesos frescos se puede o no utilizar cultivos iniciadores. Los cultivos apropiados son bacterias lácticas homofermentativas mesófilas. Actúan como protectores del queso, al impedir el desarrollo de bacterias no deseables por competencia y por crear un medio inadecuado para estas; promueven la acción del cuajo y la sinéresis (Martegani, 2006).

En cuanto al cultivo del probiótico *Lactobacillus acidophilus* se lo hace en este mismo momento. Se recomienda usar inóculos elevados para asegurar la concentración de microorganismos viables en el producto final. La incubación se realiza a 37-38°C pues el cultivo liofilizado no se desarrolla a 40°C, hasta alcanzar una acidez de máximo 0.6% de ácido láctico, para así mantener una población viable (López *et al.*, 2002; Locascio *et al.*, 2002).

La coagulación de la caseína es el proceso fundamental de la fabricación del queso. Puede ocurrir por dos vías: la láctica y la enzimática. La coagulación láctica se logra por acidificación a causa del ácido láctico producido por bacterias, disminuyendo el pH hasta que se desestabilizan las micelas, se vuelven insolubles y precipitan (pH 4.6). Este método es usado preferiblemente para quesos blandos (Ordóñez, 1998; Bylund, 2003).

La coagulación enzimática, usada de preferencia para quesos duros, consiste en la adición cuajo para lograr la coagulación de las caseínas. La actividad enzimática del cuajo provoca que la leche coagule y pase a formar un gel irreversible (cuajada). El principio activo del cuajo es la quimosina (Bedolla, 2004; Ordóñez, 1998).

La caseína representa el 80% de la proteína total de la leche. Se encuentra en forma de micelas, formadas por fracciones proteicas (αS_1 , αS_2 , β , y κ), compuestos salinos (calcio y fósforo), citrato y una fracción

glucosídica. Las caseínas αS_1 , αS_2 , y β tienen gran afinidad por el calcio. La caseína κ es sensible a la acción hidrolítica de la quimosina (López *et al*, 2002).

El cuajo convierte la caseína en paracaseína al hidrolizar la caseína κ , que es la que la estabiliza la micela. Al estar fraccionada, una parte se queda en la micela y la otra se va al suero. La micela precipita en forma de agregados pequeños. Con el tiempo van formando una red con poros, dentro de la cual se van acomodando los glóbulos grasos. El coágulo se va haciendo más firme por la continua formación de enlaces entre las micelas (Castillo y Mestres, 2004).

El gel formado expulsa el suero y el coágulo se concentra, este proceso se llama sinéresis. El proceso depende de la temperatura. La temperatura óptima de acción del cuajo está alrededor de los 40°C pero se utiliza menores para evitar la dureza del coágulo. El tiempo de precipitación disminuye y la dureza del gel aumenta a medida que disminuye el pH. A pH menores de 6 la dureza disminuye por la desmineralización de la caseína, por acidificación (Ordóñez, 1998).

Después de añadir el cuajo se debe agitar por 2-3 minutos y dejar en reposo por 30-40 minutos (Bylund, 2003).

7. Ecurrimiento

Se le da un tratamiento a la cuajada para separarla del suero, ya sea por filtración o decantación. Para acelerar y controlar el escurrimiento es necesario implementar tratamientos térmicos y mecánicos; es decir aumento de temperatura y corte (Castillo y Mestres, 2004; Bedolla, 2004).

Una vez transcurrido el tiempo de cuajado se realiza el corte. Se rompe la cuajada en granos con un tamaño que depende del tipo de queso. Para queso fresco se debe cortar en tamaño de 1 a 2 cm., en lo posible de forma homogénea. El corte ayuda a expulsar suero por aumento de la superficie. Mientras más fino, menor contenido de humedad, más intenso el desuerado y más duro el tipo de queso (Bylund, 2003)

El lavado y cocción consisten en eliminar una parte del suero y añadir agua caliente. Con el lavado se diluye el lactosuero con el agua con el fin de reducir el contenido de lactosa en el grano por difusión. De esta manera se reduce la acidez porque hay menos lactosa disponible para las bacterias (López *et al*, 2002; Castillo y Mestres, 2004)

La cocción consiste en subir la temperatura de la cuajada. Según el tipo de queso se sube la temperatura en mayor o menor proporción. Para quesos húmedos no es necesario este proceso. En queso fresco se calienta 2 o 3°C. El coágulo se retrae y libera el suero retenido. Es necesario agitar suavemente para ayudar con el desuerado, uniformizar la temperatura y evitar que se peguen los granos (Castillo y Mestres, 2004; Ordóñez, 1998; Martegani, 2006)

8. Moldeo

Al terminar el proceso de escurrido, la cuajada se coloca en moldes agujereados para obtener piezas de queso con formas determinadas y que se drene el lacto suero que se encuentra entre los coágulos (Ordóñez, 1998; Castillo y Mestres, 2004).

Después de haber sido moldeada, la cuajada se somete a un

prensado. Se prensa aplicando presión a los moldes o aprovechando el propio peso de la cuajada, para que los coágulos se unan y formen una masa continua. Con este proceso se determina la textura del queso y le da la forma definitiva. Se recomienda empezar con un prensado suave e ir aumentando progresivamente la intensidad (Martegani, 2006; Bylund, 2003).

9. Salado

El salado es un procedimiento que se aplica en todo tipo de quesos. Se sala para potenciar el sabor, darle cuerpo al producto e inhibir el crecimiento de bacterias no deseables. Como resultado se tiene una mayor conservación del queso (Ordóñez, 1998; López *et al*, 2002).

Se puede salar usando uno de los siguientes métodos: directamente en la leche, en la cuajada antes de moldado, inmersión en salmuera o por aplicación directa de la sal en la superficie del queso (Chamorro y Lozada, 2002).

El método de baño en salmuera consiste en colocar el queso en una tina con salmuera a 12-14°C. La diferencia de presión osmótica entre salmuera y queso provoca que parte de la humedad junto con seroproteínas, minerales y ácido láctico se liberen del queso, intercambiándose con cloruro de sodio. La sal se solubiliza en la fase líquida del queso y disminuye la actividad de agua (a_w), controlando el crecimiento de microorganismos (Bylund, 2003).

La salmuera debe tener una concentración mínima del 16-18% para que el proceso de penetración de la sal y salida del lactosuero sea eficaz, a concentraciones más bajas se desmineraliza el queso y entra agua

en lugar de sal (Castillo y Mestres, 2004).

El tiempo que se debe dejar en la salmuera es función del tamaño del queso y la superficie de contacto, además de la humedad, pues mientras más duro más tiempo le toma a la sal penetrar hasta el interior del queso (Martegani, 2006).

10. Empaque y almacenaje

Para almacenar los quesos se deben cubrir con un film plástico para prevenir una excesiva pérdida de agua y protegerlo de la contaminación microbiana (López *et al*, 2002).

En el almacenaje el pH tiende a subir por el consumo de ácido láctico y formación de compuestos alcalinos. Se debe almacenar los quesos frescos en refrigeración, entre 4 y 10°C, especialmente aquellos que contienen microorganismos vivos, para garantizar su supervivencia y estabilidad del producto (López *et al*, 2002; Luquet, 1993).

2.4. VIDA ÚTIL DE LOS ALIMENTOS

Núñez, (1996), señala que el periodo entre la manufactura y compra de un producto alimenticio durante el cual el producto es de calidad satisfactorio, es conocido comúnmente como su vida en anaquel. Todos los productos tienen una vida en anaquel variable y finito.

Cualquier deficiencia en la vida en anaquel ocasionara quejas de parte del consumidor, las cuales afectaran la aceptación y las ventas de los productos alimenticios de calidad. De una manera concisa, puede afirmarse que la estabilidad y la vida en anaquel de los productos alimenticios está relacionado con:

- Deterioro por microorganismos de alimentos secos y frescos.
- Prevención en la entrada de insectos o de sus ataques en los alimentos envasados.
- Pérdida de propiedades funcionales de los productos.
- Pérdida de cualidades estéticas como: aroma, olor, sabor, textura y apariencia en general.
- Pérdida de valor nutritivo, esto es pérdida de vitaminas y degradación de proteínas.

Labuza, (1994), define que el estudio de la cinética de las reacciones químicas implica el conocimiento de las constantes y de los mecanismos por los cuales una especie química se convierte en otra.

El objetivo es almacenar la combinación producto-envase bajo condiciones abusadas de prueba, examinar el producto periódicamente hasta que ocurra el final de la vida en anaquel y luego usar estos resultados para proyectar la vida en anaquel del producto bajo condiciones reales de distribución.

2.5. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LOS ALIMENTOS

Ureña Y Arrigo, (1999), definen como el método experimental mediante el cual los jueces perciben y clasifican, caracterizando y/o mensurando, las propiedades sensoriales de muestras adecuadamente presentadas, bajo condiciones ambientales preestablecidas y bajo un patrón de evaluación acorde al posterior análisis estadístico. El análisis sensorial es una ciencia multidisciplinaria en la que se utilizan panelistas que utilizan los sentidos de vista, olfato, gusto, tacto y oído para medir las características sensoriales y la aceptabilidad del producto. No existe ningún otro instrumento que pueda reproducir la respuesta humana, por lo

tanto, la evaluación resulta ser un factor esencial en cualquier estudio sobre alimento. El análisis sensorial es importante en el control de calidad de un alimento como es el queso tipo paria. Por lo que el panel debe ser tratado como un instrumento científico; toda prueba debe ser llevada en forma controlada, utilizando diseños experimentales adecuados, métodos de prueba y análisis estadísticos apropiados.

Los análisis afectivos son instrumentos eficaces para tal propósito, pues con ellos se podrá medir la aceptación del producto experimental por parte de los consumidores potenciales y proyectar su posible comercialización. Con las sugerencias recogidas en tales eventos se puede ir mejorando las características organolépticas y de presentación del producto.

2.5.1. ATRIBUTOS SENSORIALES DEL ALIMENTO

Ureña y Arrigo, (1999), describen los atributos sensoriales que presentan los alimentos, para la investigación se tomaron en cuenta los siguientes atributos sensoriales que determinan la aceptabilidad del producto.

- a) **Apariencia general:** En la evaluación sensorial la apariencia se define como el aspecto exterior que presenta el alimento, resultante de apreciar con la vista su color, forma, tamaño, estado y características de su superficie. Entre otras características que definen su calidad viene a ser lo primero que capta el consumidor antes de percibir y comprobar por otros estímulos dicha apreciación.

b) **Color:** Es la impresión que produce en la vista los rayos de la luz reflejada por un cuerpo, convirtiéndose así en un atributo del mismo y por ende, en una propiedad sensorial.

El color de cualquier objeto tiene cuatro características:

1. El tono
2. La intensidad
3. El brillo
4. La luminosidad o valor.

c) **Sabor:** El sabor como sensación, es definido como la interpretación psicológica de la respuesta fisiológica a estímulos físicos y químicos, causada por presencia de componentes volátiles y no volátiles del alimento saboreado en la boca. Luego resulta de la combinación de cuatro propiedades: olor, aroma, gusto y textura, por lo que su medición y apreciación son más complejas que las de cada propiedad por separado.

d) **Aroma:** El aroma como principal componente del sabor, es la sensación causada por la percepción de sustancias olorosas de un alimento que es puesta en la boca. Es la percepción por medio de la nariz de las sustancias volátiles liberadas por ciertos estímulos, presión natural o por objetos.

e) **Textura:** Es la propiedad de los alimentos que es detectada por los sentidos del tacto, la vista y el oído, que se manifiesta cuando el alimento sufre una deformación. El atributo que evalúa la deformación del alimento sólido se llama textura.

III. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. UBICACIÓN

El lugar donde se desarrolló la fase experimental es en la Planta Procesadora de Lácteos del Distrito de Acora de la Provincia de Puno, Departamento de Puno.

Los análisis respectivos de los quesos como el microbiológico, fisicoquímicos y sensoriales del queso fueron realizados en el laboratorio de análisis de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Altiplano - Puno.

3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

3.2.1. MATERIA PRIMA

La leche es obtenida de vacas de la raza Brown Swiss de los establos del Centro Poblado de Molocco del Distrito de Acora, Provincia de Puno, Departamento de Puno.

3.2.2 EQUIPOS, INSTRUMENTOS DE ELABORACIÓN

- Centrifuga de Gerber, 1200 r.p.m.
- Un recipiente para baño maría (65°C)
- Balanza analítica de 300 gr, 4 dígitos.
- Mufra, 1500°C.
- Desecador con desecante silicagel.
- Butiro metro. Escala de 0 a 8%.
- Lactodensímetro (Rango: 1.000-1.140 Kg/m³).
- Termómetro de 150°C.

- pH metro, Rango: 0-14, (HANNA)
- Acidómetro de 500 ml.
- 2 Prensas de 125 moldes c/u (acero inoxidable)
- Paila rectangular de 500Lt.) (Acero inoxidable)
- 8 Porongos de 50Lt. (Aluminio inoxidable)
- Ollas de 50Lt. (acero inoxidable.)
- Cocinas Industrial.
- Empacadora al vacío de 2 moldes /min. (Acero inox.)
- Paletas (Acero inoxidable.)
- Colador de plástico.
- Lira vertical de 0.30m.x0.03m. y 1.20 m. de altura (Acero inox.)
- Baldes de plástico de 20 Lit.
- Moldes de 6 plg. (PVC).
- Paños de tela (playa) de 50cm x 50cm.

3.2.3. INSTRUMENTOS DE VIDRIO DE LABORATORIO

- Pipetas de 1-10 ml.
- Probetas de 100 y 250 ml.
- Crisoles de 20 gr.
- Placas petri (15 ml)
- Vasos precipitados (100, 500 ml)
- Erlenmeyer de 250 ml.
- Tubos de ensayo 15 ml.
- Lunas de reloj 10gr.
- Bombilla de succión.

3.2.4. REACTIVOS

- Fenolftaleína.(solución indicadora 2% en alcohol de 96°)
- Hidróxido de sodio.(NaOH a 0.1 N)
- Ácido sulfúrico. $H_2(SO_4)$, densidad= 1.820 a 1.825
- Alcohol amílico. Densidad de 0.815
- Ácido clorhídrico.(HCl a 0.05N)
- Ácido bórico a 0.05N

3.2.5. INSUMOS

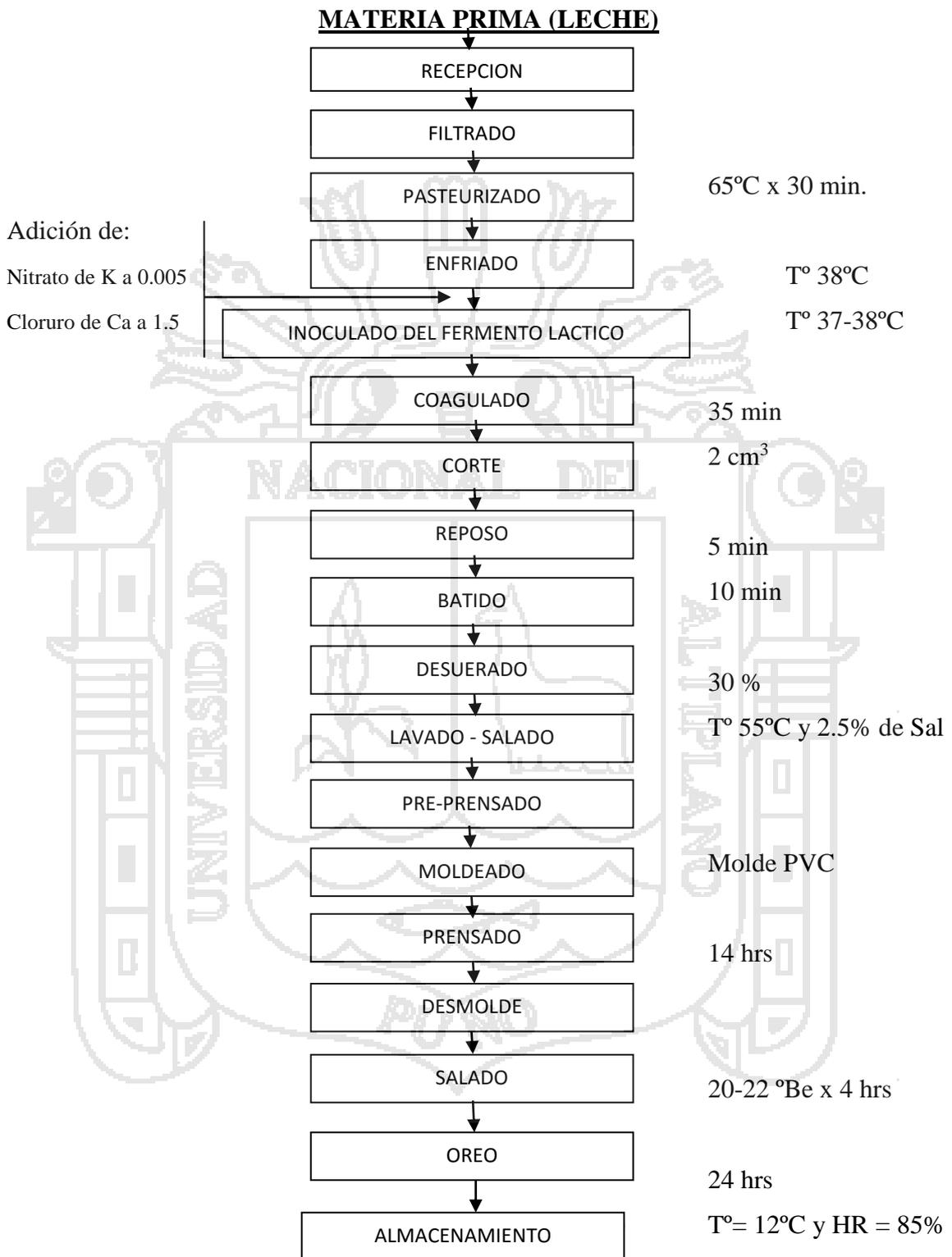
- Bacterias Probióticas: *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis* IPLA 947, marca **Hansen**, proveedor Insumos y Soluciones, LIMA - PERU.
- Cuajo “Hansens”.
- Sal yodada.
- Cloruro de sodio
- Cloruro de calcio

3.2.6. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar M17 – lactosa, (*lactococcus lactis*)
- MRS Agar , (*Lactobacillus acidophilus*)
- Palcam Agar Selective (base), (*Listeria monocytogenes*)
- Mannitol Salt Agar (*Staphylococcus aureus*)
- SS – Agar (*Salmonella sp*)
- Caldo lactosado (*coliformes*)

3.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Figura N° 3.1: FLUJOGRAMA DE ELABORACIÓN DEL QUESO TIPO PARIÁ



Fuente: Elaboración propia.

3.3.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE LA ELABORACIÓN DEL QUESO

3.3.1.1 RECEPCIÓN.- El recojo de la leche del establo fue a las 5:30 am en una forma higiénica en porongos de acero inoxidable La leche debe ser de un color blanco opalescente o ligeramente amarillento. Su olor debe ser suave, lácteo característico sin olores extraños. Debe tener un aspecto homogéneo libre de materiales extraños (Norma NTP 202.195).

3.3.1.2 FILTRADO.- La leche fue sometida a un filtrado mediante una tela o paño con el objetivo de eliminar las impurezas, pajas, pelos, etc. en seguida se realizó un análisis de control de calidad, como determinación de acidez, densidad, grasa.

3.3.1.3 PASTEURIZADO.- La leche es sometida a una pasteurización de 65°C x 30 minutos. Se realizó con la finalidad de inactivar microorganismos y gérmenes patógenos.

3.3.1.4 ENFRIADO.- Se realizó mediante la conducción de agua fría que paso dentro de la doble pared de la paila a fin de obtener la temperatura deseada de 35°C.

3.3.1.5 ADICIÓN DE ADITIVOS.- Se adiciono cloruro de calcio a 1.5%, con el objetivo de conseguir una mejor coagulación, restableciendo el equilibrio del calcio que se perdió después de la pasteurización, y el nitrato de K a 0.005%, con la finalidad de contribuir en la conservación del producto, evitando el hinchamiento del queso.

3.3.1.6 INOCULADO DEL FERMENTO LÁCTICO.- Se utilizó fermentos lácticos, así como las bacterias probióticas (*Lactobacillus*

acidophilus y *Lactococcus lactis* IPLA 946), se adiciona al 0.02% a una temperatura de 37-28°C. Cuando la acidez de la leche alcanza un 0.14% (porcentaje de ácido láctico), luego se añadió el cuajo.

3.3.1.7 ADICIÓN DE CUAJO.- Se utilizó cuajo de marca Hansen's liofilizada 2.5 gr. /100lt. A una temperatura de 35°C.

3.3.1.8 COAGULACIÓN.- Luego de agregar el cuajo a la leche en forma homogénea agitando durante 35 minutos, luego se dejó en reposo y se mantuvo en reposo para su coagulación respectiva a una temperatura de 32°C.

3.3.1.9 CORTE DE LA CUAJADA.- Obteniendo el cuajado de la leche, la operación consiste en cortar la cuajada y se corta en forma transversal con el cual adquiere la apariencia de cuadrulado obteniéndose listones verticales de 2 cm³. de corte pallar.

3.3.1.10 REPOSO.- En esta fase se dejó reposar, por un tiempo de 5 min., para dejar salir el suero de los listones de la cuajada. Luego pasamos a voltear la cuajada con la ayuda de una paleta, manteniendo la temperatura.

3.3.1.11 BATIDO.- Esta operación se realizó con el fin de que los granos de la cuajada ubicados dentro del suero por su mayor densidad aceleren la salida del suero que poseen en su interior, para lo cual se agito por un tiempo de 10 minutos.

3.3.1.12 DESUERADO.- El desuerado se realiza extrayendo 1/3 de suero, y reemplazar con agua pasteurizada caliente (55°C).

3.3.1.13 LAVADO.- El lavado de la cuajada se realiza con agua caliente pasteurizada a 55°C y luego el salado para evitar la contaminación y el descenso de la temperatura que finalmente debe mantenerse entre 40-43°C.

3.3.1.14 SALADO.- El salado se realiza con el objetivo de detener la acidificación, por lo que después de este el pH ya no desciende. Se adiciona sal yodada al 2.5 % sobre la cantidad de volumen de leche inicial, con la finalidad de que la sal disuelta en el suero pueda ser absorbida por la cuajada y le confiera una salazón adecuada al queso.

3.3.1.15 PRE-PRENSADO.- se realizó con la finalidad de eliminar más suero de la cuajada y hacerla más compacta, por un tiempo de 20 minutos con un peso de 2-3 veces mayor del peso de la cuajada.

3.3.1.16 MOLDEADO.- En esta operación se hizo en moldes plásticos (PVC) de 6 plg., en ellos se llenaron los granos de cuajada, previamente cubierto con una tela o paño en el interior del molde.

3.3.1.17 PRENSADO.- El prensado se realizó para retirar una mayor cantidad de suero de la cuajada, pero se hace incrementando gradualmente la presión, después de una hora se procede al volteo y luego se deja prensando hasta obtener una pasta sólida con bajo contenido de humedad, se considera un tiempo de 14 horas y un peso de 6 Kg. /Kg. de queso.

3.3.1.18 DESMOLDEADO.- Se quita el molde después de haber concluido su prensado.

3.3.1.19 SALADO DE LOS QUESOS.- Este salado se realizó con una solución salina de 20-22 °Be a una temperatura de 12°C y por un tiempo de 4-6 horas por Kg. de queso, con la finalidad de darle un buen sabor, una cubierta protectora y contribuir en la formación de la costra en el oreado.

3.3.1.20 OREADO.- El oreado se realizó por 24 horas con la finalidad de que se forme la costra y no provoque exudación en el envase, se realizó a una temperatura de 12°C y a una humedad relativa de 85%.

3.3.1.21 ALMACENAMIENTO.- El almacenamiento del queso tipo paria se realizó a una temperatura de 12°C y 85% de humedad relativa. El tiempo de vida útil se evaluará por los tiempos de almacenamiento de: 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días, periodo en el que se ha observado cambios en sus características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas.

3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO

3.4.1.1 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO, MATERIA PRIMA

a. Determinación de Acidez titulable total

A.O.A.C (1990), indica la siguiente metodología: colocar 9 ml de leche en un vaso de precipitado y agregar como indicador 3-4 gotas de fenolftaleína,

la bureta con hidróxido de sodio 0.1 N. Se titula la muestra hasta que vire a color rosa persistente. Que indica que la titulación está terminada. Expresar el % acidez, expresado en °Dornic, en términos de porcentaje de ácido láctico:

1ml. de NaOH 0.1N = 0.0090ml. ac. Láctico.

b. Determinación de Densidad relativa

Alejo y Morales, (1997), describen la siguiente metodología para el cálculo de la densidad. En una probeta graduada de 500ml. de capacidad, se colocó el lactodensímetro lentamente y se dejó flotar por un tiempo. Cuando está en reposo se realiza la lectura y posteriormente al cálculo de la densidad corregida con la siguiente fórmula:

$$\rho = \rho_1 + (T_1 - T_{CL}) * 0.0002$$

Dónde:

ρ = Densidad corregida.

ρ_1 = Densidad leída.

T_1 = Temperatura de la muestra.

T_{CL} = temperatura de calibrado del lactodensímetro.

c. Determinación de Grasa por el método Gerber

Dubach, J. (1998), indica la metodología como sigue: se añade al butirometro 10 ml de sulfúrico y colocar 11ml de leche haciéndole discurrir por las paredes para que no se queme la leche, completar la mezcla con 1 ml de alcohol amílico y tapar el butirometro y agitar hasta que se homogenice. Colocar el butirometro en la centrifuga durante 5 min, sacar el butirometro y ponerlo en baño maría a 65°C durante 5 min, luego realizar la lectura.

3.4.1.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL PRODUCTO FINAL

a. Determinación de Acidez titulable total

A.O.A.C (1990), describe la siguiente metodología. Se toma 10 gr de queso triturado, se llevó a 50 ml. de agua destilada, titulando con una solución de NaOH, 0.1N y utilizando fenolftaleína se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ acidez} = \frac{V \times N \times E}{10A} \times 100$$

Dónde:

V: ml de NaOH gastado en la titulación.

N: normalidad de NaOH

E: meliequivalente del ácido láctico.

b. Determinación de Humedad

A.O.A.C. (1990), recomienda la siguiente metodología: se pesó 5gr de muestra (queso), en un crisol, se llevó a una estufa a temperaturas entre 90 – 100 °C, por un tiempo aproximado de 8 horas, hasta lograr un peso constante, luego se determina la humedad por diferencia de pesos inicial y final, utilizando la siguiente formula recomendada:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(P_i - P_f)}{\text{Muestra (gr)}} \times 100$$

Dónde:

P_i = Peso inicial de la muestra.

P_f = Peso final de la muestra.

c. Determinación de Proteína

A.O.A.C (1990), recomienda el método micro kjeldahl, usando como factor 6.38 para convertir el nitrógeno a proteína total, el método comprende tres fases: digestión, destilación y titulación. Para ello se tomó una muestra de 0.2 gr seca en la cocina de digestión hasta que quede cristalino. A la muestra digerida se agrega NaOH, e inmediatamente se conecta el vapor para que se produzca la destilación, se conecta el refrigerante y se recibe destilado en un erlemeyer con contenido de ácido bórico más indicadores de pH, la destilación térmica cuando hay viraje de color luego se produce a la titulación con hidrogeno se anota el gasto y se procede a hacer los cálculos con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{\text{HCl(ml)} \times \text{normalidad} \times \text{mili equivalente N}}{\text{gr. de muestra}} \times 100$$

d. Determinación de Grasa

A.O.A.C. (1990), se recomienda por el método soxhleth, empleándose éter de petróleo como solvente, con la finalidad de conocer el contenido de grasa en la muestra, para esto se pesa 5 gr de queso empaquetándose en un papel filtro, y se colocó en el aparato, evaporándose el hexano remanente en una estufa, luego se enfría en una campana, para el cálculo se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{(P1 - P2)}{\text{Muestra (gr)}} \times 100$$

Dónde:

P1 = Peso del matraz (grasa)

P2 = Peso del matraz vacio.

e. Determinación de Cenizas

A.O.A.C. (1990), autoriza el siguiente método para cálculo de cenizas. Se pesa 1.5 gr de muestra en crisol previamente tarado, se llevó a incinerar la muestra a 600°C durante 5 horas, luego se enfrió en un desecador a temperatura ambiente, procediéndose a pesar y se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{cenizas} = \frac{Pc}{\text{Muestra (gr)}} \times 100$$

Dónde: Pc = peso de ceniza.

3.4.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

a. Recuento de *Lactococcus lactis*

Para el recuento de *Lactococcus lactis* se utilizó como medio de cultivo el Agar M17 – lactosa a una temperatura de 32°C por 24-48 horas.

Fuente: Mayo, B. y Belén, A., 2004.

b. Recuento de *Lactobacillus acidophilus*

Para el recuento de *Lactobacillus acidophilus* se utilizó como medio de cultivo el Agar MRS a una temperatura de 37°C durante 24-72 horas.

Fuente: Mayo, B. y Belén, A., 2004.

c. Recuento de *Staphylococcus aureus*

Para el recuento *Staphylococcus aureus* se utilizó como medio de cultivo el Mannitol Salt Agar, a una temperatura 37°C durante 24 horas.

Fuente: Thatcher y Clark, 1998.

d. Recuento de Coliformes

El recuento de coliformes se realizó por medio del cultivo el Caldo lactosado a una temperatura de 35°C durante 24 horas.

Fuente: Thatcher y Clark, 1998.

e. Recuento de *Salmonella sp.*

El recuento de *Salmonella sp.* Se realizara por medio del cultivo el SS – Agar, a una temperatura de 37°C durante 24 horas.

Fuente: Thatcher y Clark, 1998.

3.4.3. ANÁLISIS SENSORIAL

La evaluación sensorial de los quesos se realizaron a través de la degustación de los quesos tipo paria elaborados con leche pasteurizada y la inoculación de las bacterias probióticas como cultivo adjunto, lo que se realizó cada 7 días en un periodo de almacenamiento a 12° y a una HR de 85%, para ello se utilizó una cartilla de evaluación sensorial y 15 panelistas semi entrenados, que recibieron las cartillas de evaluación, la cartilla presenta códigos, atributos sensoriales del queso como: apariencia general, color, sabor, aroma y textura; y la escala hedónica de calificación de las muestra que es de 1-5 puntos, 1 punto es el mínimo puntaje que significa muy malo y 5 puntos el máximo que indica que es muy bueno, a continuación se presenta la escala hedónica de la siguiente forma:

Muy bueno : 5 puntos

Bueno : 4 puntos

Regular : 3 puntos

Malo : 2 puntos

Muy malo : 1 punto

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.5.1. VARIABLES DE ESTUDIO

A. Tiempo de almacenamiento del queso probiótico

- Queso probiótico(0 días)
- Queso probiótico(7 días)
- Queso probiótico (14 días)
- Queso probiótico (21 días)
- Queso probiótico (28 días)

B. Cepas probióticas

- *Lactococcus lactis*------(T1)
- *Lactobacillus acidophilus*------(T2)
- *Lactococcus lactis* + *Lactobacillus acidophilus*------(T3)
- *Control*------(To)

3.5.2. VARIABLES DE RESPUESTA

- N° de microorganismos viables durante el tiempo de vida útil del queso probiótico.
 - ✓ *Lactococcus lactis*
 - ✓ *Lactobacillus acidophilus*
 - ✓ *Coliformes*
 - ✓ *Staphylococcus aureus*
 - ✓ *Escherichia coli*
 - ✓ *Listeria monocytogenes*
 - ✓ *Salmonella sp.*
- Las características físico químicas durante el tiempo de vida útil del queso probiótico.
 - ✓ Acidez
 - ✓ Grasa
 - ✓ Proteína
 - ✓ Humedad
- Características organolépticas durante el tiempo de vida útil del queso probiótico.
 - ✓ Calificación de la apariencia general, color, sabor, aroma y textura del queso probiótico mediante la escala hedónica de cinco puntos.

3.6. DISEÑO ESTADÍSTICO

Para el trabajo de investigación, de acuerdo con los objetivos y variables de estudio, se desarrolló de la siguiente forma.

3.6.1. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL QUESO TIPO PARIA

Para el presente trabajo de investigación se utilizó el experimento factorial bajo el diseño completamente al azar (DBCA) a un nivel de significación: $\alpha = 0.05$.

El modelo lineal aditivo es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij}; \quad \left\{ \begin{array}{l} i = 0,7,14,21,28 \text{ (niveles de tiempo del factor A)} \\ j = 1, 2, 3,4 \text{ (Quesos del factor B)} \\ k = 1, 2,3 \text{ (repeticiones)} \end{array} \right.$$

Dónde:

Y_{ijk} = Es la variable de respuesta de la k-esima observación bajo el j-esimo nivel de queso de factor B, sujeto al i-esimo nivel de tiempo de factor A.

μ = Constante, media de la población a la cual pertenecen las observaciones.

α_i = Efecto del i-esimo nivel de tiempo del factor A.

β_j = Efecto del j-esimo nivel de queso del factor B.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción del i-esimo nivel de tiempo del factor A, en el j-esimo nivel de queso del factor B.

ε_{ij} = Efecto del error experimental.

Tabla N° 3.1: Esquema del ANVA.

F. de V.	G.L.
Tiempo (A)	(A-1) = 4
Queso (B)	(B-1) = 3
AxB	(A-1)(B-1) = 12
Error Experimental	AB(r - 1) = 40
Total	ABr-1 = 59

3.6.2. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LOS QUESOS

La evaluación sensorial se ajustó al diseño estadístico bloque completamente al azar (DBCA), de tal modo se determina cuál de las muestras de queso tiene mejor aceptación por el consumidor de acuerdo a los atributos: apariencia general, color, sabor, aroma y textura que presenta cada tratamiento, realizado con un equipo de 15 panelistas semi entrenados, entonces el modelo lineal es la siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

- Y_{ijk} = Calificación del atributo (puntos)
- μ = Promedio general
- B_k = Efecto del bloque k ; escala hedónica
- α_i = Efecto del nivel a_i ; tratamiento (quesos)
- β_j = Efecto del nivel b_j ; tiempo (días)
- ϵ_{ij} = Error experimental

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN LOS PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

En los tratamientos T0 T1, T2 y T3 se realizaron análisis para determinar la calidad microbiológica de los quesos, en el producto final y la estabilidad durante la vida útil. Para la realización de los análisis, los quesos se mantuvieron a una temperatura de 12°C y HR = 85% durante 28 días.

4.1.1 EFECTO DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN *LISTERIA MONOCYTOGENES* DEL QUESO TIPO PARIÁ

Los resultados obtenidos de los análisis practicados en muestras de queso de los cuatro tratamientos después de un día de fabricación se presentan en la Tabla N° 4.1 y el Grafico 4.1 se puede comparar los contenidos microbiológicos de *Listeria monocytogenes* encontrados en los quesos sin adición de cultivos probióticos o control (T0) y con adición de probióticos (T1, T2, y T3).

El queso control (T0) presentó mayor contaminación de la bacteria *Listeria monocytogenes*, que los quesos adicionados con las bacterias probióticas *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus acidophilus* (T1, T2, T3). En el conteo de microorganismos de la bacteria *Listeria monocytogenes* se observa una diferencia considerable los tratamientos (quesos):

TABLA 4.1 Conteos microbiológicos de *Listeria monocytogenes* (UFC/gr), obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico) durante 28 días.

TRATAMIENTOS	TIEMPO (DIAS)				
	0	7	14	21	28
T0	0	16X10 ³	47X10 ³	72X10 ⁴	55X10 ⁴
T1	0	13X10 ³	20X10 ³	13X10 ³	90X10 ²
T2	0	12X10 ³	15X10 ³	10X10 ³	70X10 ²
T3	0	0	0	0	0

En el día 0 después de su elaboración no hay presencia de microorganismos de la bacteria *Listeria monocytogenes* en ningún tratamiento.

En el día 7 hay presencia de la bacteria *Listeria monocytogenes* en el tratamiento control (T0) de 4.20 log UFC/gr (16x10³ UFC/gr), en el T1 de 4.12 log UFC/gr (13x10³ UFC/gr), el T2 tiene de 4.09 log UFC/gr (12x10³ UFC/gr) y el T3 no hay presencia de ninguna bacteria de *Listeria monocytogenes*, ya que este T3 contiene las bacterias probióticas, y estas lo inhiben totalmente la bacterias patógenas.

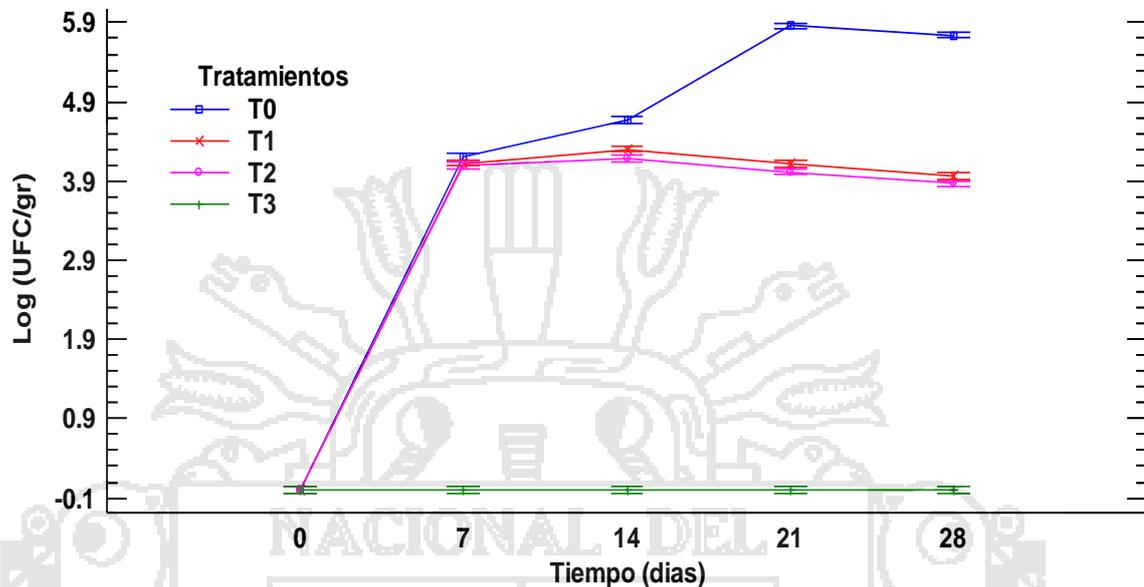
En el día 14, el T3 que tiene las dos bacterias probióticas, tampoco hay presencia de las bacteria *Listeria monocytogenes*. El T0 sigue aumentando la presencia la bacteria *Listeria monocytogenes* de 4.67 log UFC/gr (47x10³ UFC/gr), en el T1 de 4.30 log UFC/gr (20x10³ UFC/gr), el T2 tiene de 4.19 log UFC/gr (15x10³ UFC/gr)

En el día 21, el T3 mantiene la inhibición de la bacteria *Listeria monocytogenes*, mientras el T0, aumenta la presencia de la *listeria monocytogenes* a 5.86 log UFC/gr (72×10^3 UFC/gr), en el T1 de 4.11 log UFC/gr (13×10^3 UFC/gr), el T2 tiene de 4.01 log UFC/gr (10×10^3 UFC/gr).

En el día 28, el T3 mantiene la inhibición de la bacteria patógena, mientras el T0, hay una disminución de la presencia de la *listeria monocytogenes* de 5.74 log UFC/gr (55×10^3 UFC/gr), en el T1 de 3.97 log UFC/gr (90×10^2 UFC/gr), el T2 tiene de 3.86 log UFC/gr (70×10^2 UFC/gr). El contenido alto de microorganismos, deteriora las características organolépticas del producto en menor tiempo, lo cual es negativo para quien produce y para quien consume por la disminución de la vida útil del producto. La acción de las sustancias antibacterianas el pH ácido logran inhibir los microorganismos patógenos.

En el ANVA de la Tabla N° 6.4 en el Anexo 2A, la variabilidad de la *Listeria monocytogenes* (UFC/gr) en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la presencia *Listeria monocytogenes* (log UFC/gr) con un 95.0% de nivel de confianza. Mientras que en la prueba de Tukey de la tabla N° 6.5 en el anexo 2A, indica que hay una variabilidad en el recuento de *Listeria monocytogenes* de los tratamientos: T0, T1, T2, y T3.

Grafico 4.1: Conteos microbiológicos de *Listeria monocytogenes* obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico), en el día 0 después de la elaboración.



En el Grafico 4.1, observamos el crecimiento de las bacteria *Listeria monocytogenes* en el día 0 no se ha encontrado ninguna presencia de la bacteria, pero después de una semana empiezan a crecer en el queso en los T0; T1 y T2, mientras el T3 que contiene la combinación de las bacterias probióticas, no tiene la presencia de la *Listeria monocytogenes*, ya sea por competencia o por la producción de sustancias antimicrobianas de las bacterias *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus acidophilus*. Otra característica de las bacterias probióticas es su elevada tolerancia a pH ácidos, algunos sobreviven en rangos de pH entre 4.8 y 9.6. Produciendo el ácido láctico y secretando bacteriocinas crean un ambiente hostil que inhibe el crecimiento de algunas bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudo tuberculosis* y *Shigella sonnei* (Frazier, 1976).

En los días 7, 14, 21, en el T0, el crecimiento de esta bacteria ha seguido aumentando, hasta llegar que en el día 28 ha disminuido ligeramente, por la

inhibición normal del pH bajo en el queso, esto ocurre hasta que el queso llega a deteriorarse, y no es recomendable para el consumo. Mientras los T1, T2, T3, estos tratamientos contienen microorganismos probióticos y actúan contra la bacteria *Listeria monocytogenes* y lo inhiben en especial el T3 que contiene la combinación de las dos bacterias utilizadas en los T1 y T2, y tenemos buenos resultados, ya que la bacteria patógena ha sido eliminada su crecimiento en el queso, permitiendo buenas características fisicoquímicas y sensoriales.

Las normas NTS 071 – MINSA/DIGESA V. 01, 2008. “Norma sanitaria, que establece los criterios microbiológicos de calidad e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano”, establecen requerimientos microbiológicos para el queso fresco, donde especifica que hay ausencia de *Listeria monocytogenes*. Con base en los requerimientos de la norma los quesos de los tratamientos T3 cumple con las exigencias microbiológicas establecidas, y en el T1 (*Lactococcus lactis*) y T2 (*Lb. acidophilus*), tenemos un crecimiento en la primera semana y después las bacterias probióticas empiezan a actuar lentamente y van inhibiendo la bacteria, por último el T0, tiene un alto crecimiento microbiano de *Listeria monocytogenes*, por ello está fuera de los límites de la norma. No obstante (Casp y Abril 1999), refieren que los microorganismos representan el agente más temible de alteración en alimentos perecederos, haciendo que el alimento tenga muy poca duración de vida útil, cuando hay más población microbiana disminuye la vida útil del queso.

4.1.2 EFECTO DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN STAPHYLOCOCCUS AUREUS DEL QUESO TIPO PARIA

Los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos practicados en las

muestras de queso de los cuatro tratamientos después de un día de fabricación se presentan en el gráfico 4.2. se puede comparar los contenidos microbiológicos de *Staphylococcus aureus* encontrados en los quesos sin adición de cultivos probióticos o control (T0) y con adición de probióticos (T1, T2, y T3).

En la Tabla N° 4.2 y el Gráfico 4.2, observamos el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*, que se ha obtenido mediante el recuento UFC/gr en el análisis microbiológico.

TABLA 4.2: Conteos microbiológicos de *Staphylococcus aureus* (UFC/gr), obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico) durante 28 días.

TRATAMIENTOS	TIEMPO (DIAS)				
	0	7	14	21	28
T0	16x10 ³	36x10 ⁴	38x10 ⁴	44x10 ⁴	42x10 ⁴
T1	90x10 ²	29x10 ³	31x10 ³	28x10 ³	14x10 ³
T2	60x10 ²	23x10 ³	17x10 ³	15x10 ³	40x10 ²
T3	20x10 ²	10x10 ²	0	0	0

De la Tabla N° 4.2. En el día 0 tenemos un crecimiento de la bacteria patógena en los cuatro tratamientos (T0, T1, T2, y T3), donde el T0 (queso control) tiene 4.20 log UFC/gr (16x10³ UFC/gr), el T1 (con *Lactococcus lactis*) con 3.95 log UFC/gr (90x10² UFC/gr), el T3 (con *Lb. acidophilus*) con 3.78 log UFC/gr (60x10² UFC/gr), mientras el T3 (*Lactococcus lactis* y *Lb. acidophilus*) con 3.30 log UFC/gr (20x10² UFC/gr), de donde definimos que tenemos un mayor número de UFC/gr en el T0, Mientras en el T3 tenemos menor, esto por la presencia de bacterias probióticas en este tratamiento.

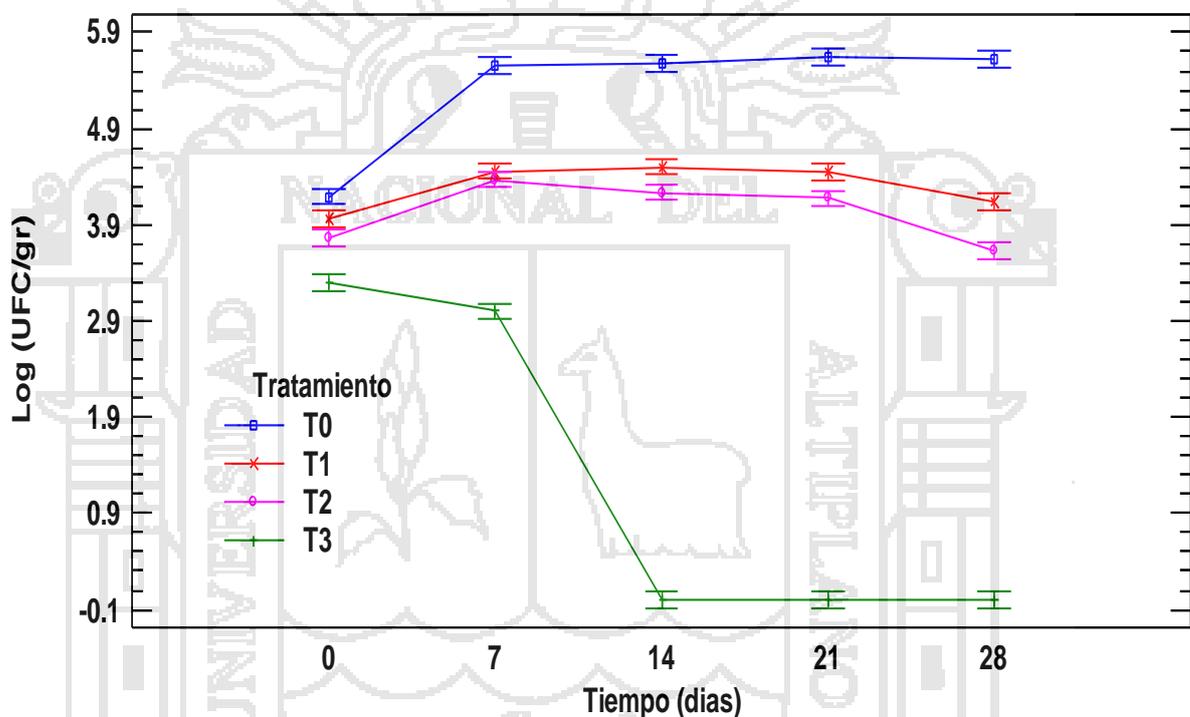
En el día 7 hay presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus* en el tratamiento control (T0) tiene un incremento en el número de UFC/gr de 5.56 log UFC/gr (36×10^4 UFC/gr), en el T1 y T2 también tenemos un ligero incremento de 4.46 log UFC/gr (29×10^3 UFC/gr), y 4.36 log UFC/gr (23×10^3 UFC/gr) respectivamente, a pesar que los dos tratamientos tienen adicionados las bacterias probióticas. Y el T3 hay una inhibición de la bacteria *Staphylococcus aureus* de 3.00 log UFC/gr (10×10^2 UFC/gr), ya que este T3 contiene las bacterias probióticas.

En el día 14, el T0 sigue aumentando la presencia de bacteria *Staphylococcus aureus* con 5.58 log UFC/gr (38×10^4 UFC/gr), al igual que el día 7 el T1 y T2 tienen el mismo número de UFC/gr. mientras el T3 con probióticas, no tiene ninguna presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus*, es decir que ha inhibido por completo, esto gracias a las bacterias probióticas. En el día 21 y 28, el T3 mantiene la inhibición de la bacteria *Staphylococcus aureus*, mientras el T0, aumenta la presencia de la *Listeria monocytogenes* a 5.64 log UFC/gr (44×10^4 UFC/gr), en el T1 y T2, presentan una disminución de *Staphylococcus aureus* hasta 4.15 log UFC/gr (14×10^3 UFC/gr) y 3.60 log UFC/gr (40×10^2 UFC/gr), esto gracias a las bacterias probióticas que componen cada uno de ellos, estos actúan lentamente contra los patógenos.

En el ANOVA de la Tabla N° 6.6 en el Anexo 2A, la variabilidad de *Staphylococcus aureus* (Log UFC/gr) en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Log (UFC/gr) con un 95.0% de nivel de confianza. Mientras que en la prueba de Tukey de la tabla N° 6.7 en el

Anexo 2A, indica que hay una variabilidad en el recuento de *Staphylococcus aureus* de los tratamientos: T0, T1, T2, y T3. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Grafico 4.2: Conteos microbiológicos de *Staphylococcus aureus* obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico), en el día 0 después de la elaboración.



En el Grafico 4.2, observamos el crecimiento de las bacteria *Staphylococcus aureus* en el día 0 y 7 se ha encontrado la presencia de la bacteria, pero después de una semana empiezan a crecer en el queso en los T0; T1 y T2, mientras el T3 que contiene la combinación de las bacterias probióticas, tiene una disminución de la presencia de la *Staphylococcus aureus*: por la producción de sustancias antimicrobianas de las bacterias *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus acidophilus*; El efecto antimicrobiano de las bacterias probióticas contra otras bacterias se conoce desde hace muchos años y señalaba que una

flora nativa intestinal estable regula la toxemia crónica natural que tiene un papel primordial en el envejecimiento y muerte. Aparte de la competencia por sustratos, los sitios de colonización y los productos de la fermentación, resultan inhibitorios para muchos patógenos (Fernández, 2000).

En el día 7, 14, 21, el T0, el crecimiento de esta bacteria ha seguido aumentando, mientras en los T1 y T2, se mantienen y permanece constante el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Y en el día 28 empiezan a disminuir lentamente la cantidad de patógenos, en especial el T3 que contiene la combinación de las dos bacterias utilizadas, ya que la bacteria patógena ha sido inhibido su crecimiento en el queso, permitiendo buenas características fisicoquímicas y sensoriales. Las normas NTS 071 – MINSA/DIGESA V. 01, 2008. “Norma sanitaria, que establece los criterios microbiológicos de calidad e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano”. Establecen requerimientos microbiológicos para el queso fresco, donde especifica que el límite Máximo es de 10×10^2 UFC/gr de *Staphylococcus aureus*. Con base en los requerimientos de la norma los quesos de los tratamientos T3 cumple con las exigencias microbiológicas establecidas, y en el T1 (*Lactococcus lactis*) y T2 (*Lb. acidophilus*), tenemos un crecimiento en la primera semana y después las bacterias probióticas empiezan a actuar lentamente y van inhibiendo la bacteria patógena, por último el T0, tiene un alto crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus*, por ello está fuera de los límites de la norma. No obstante (Casp y Abril 1999), refieren que los microorganismos representan el agente más temible de alteración en alimentos perecederos, haciendo que el alimento tenga muy poca duración de vida útil, cuando hay más población microbiana disminuye la vida útil del queso.

4.1.3 EFECTO DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN *SALMONELLA SP.* DEL QUESO TIPO PARIÁ

Los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos practicados en las muestras de queso de los cuatro tratamientos después de un día de fabricación se presentan en el Gráfico N° 4.3. En el gráfico se puede comparar los contenidos microbiológicos de *Salmonella sp.* encontrados en los quesos sin adición de cultivos probióticos o control (T0) y con adición de probióticos (T1, T2, y T3).

Según la Tabla N° 4.3 y el Gráfico N° 4.3, observamos el crecimiento de la bacteria *Salmonella sp.*, que se ha obtenido mediante el recuento UFC/gr en el análisis microbiológico.

TABLA 4.3: Conteos microbiológicos de *Salmonella sp* (UFC/gr), obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico) durante 28 días.

TRATAMIENTOS	TIEMPO (DIAS)				
	0	7	14	21	28
T0	0	64x10 ³	41x10 ⁴	54x10 ⁴	43x10 ⁴
T1	0	13x10 ³	10x10 ³	50x10 ²	20x10 ²
T2	0	11x10 ³	80x10 ²	23x10 ²	11x10 ²
T3	0	10x10 ²	50x10	0	0

Según la Tabla 4.3, en el día 0 no hay presencia de bacterias patógenas en los cuatro tratamientos (T0, T1, T2, y T3).

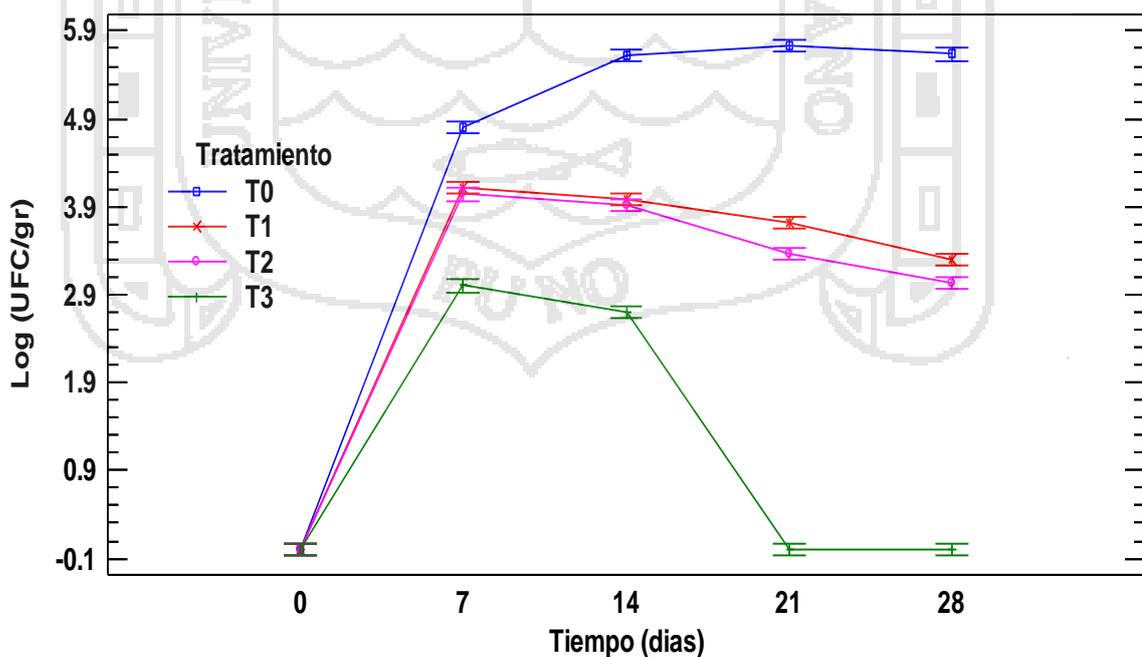
En el día 7 hay presencia de la bacteria *Salmonella sp.*, en el tratamiento control (T0) tiene un incremento en el número de UFC/gr de 4.81 log UFC/gr (64×10^3 UFC/gr), en el T1 y T2 también tenemos un ligero incremento de 4.11 log UFC/gr (13×10^3 UFC/gr), y 4.04 log UFC/gr (11×10^3 UFC/gr) respectivamente, a pesar que los dos tratamientos tienen adicionados las bacterias probióticas. Y el T3 también tiene presencia de la bacteria de *Salmonella sp.*, de 3.00 log UFC/gr (10×10^2 UFC/gr).

En el día 14 y 21, el T0 sigue aumentando la presencia la bacteria *Salmonella sp.*, con 5.73 log UFC/gr (54×10^4 UFC/gr), mientras los T1 y T2 tienen un descenso en el crecimiento de la bacteria patógena de 3.70 log UFC/gr (50×10^2 UFC/gr) y 3.36 log UFC/gr (23×10^2 UFC/gr) esto gracias a la presencia de probióticos en cada tratamiento. Mientras el T3 con probióticas, ha inhibido la presencia de la bacteria *Salmonella sp.*, es decir que ha inhibido más rápido, esto gracias a la presencia de las dos bacterias probióticas juntas en este T3.

En el día 28, el T3 mantiene la inhibición de la bacteria *Salmonella sp.*, mientras el T0, mantiene la presencia de la bacteria *Salmonella sp.*, a 5.63 log UFC/gr (43×10^4 UFC/gr), en el T1 y T2, presentan una disminución de bacteria *Salmonella sp.*, hasta 3.30 log UFC/gr (20×10^2 UFC/gr) y 3.04 log UFC/gr (11×10^2 UFC/gr), esto gracias a las bacterias probióticas que componen cada uno de ellos, estos actúan lentamente contra los patógenos.

En el ANVA de la Tabla N° 6.8 en el Anexo 2A, la variabilidad de la bacteria *Salmonella sp.*, (Log UFC/gr) en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Log (UFC/gr) con un 95.0% de nivel de confianza. Mientras que en la prueba de Tukey de la Tabla N° 6.9 en el Anexo 2A, indica que hay una variabilidad en el recuento de *Salmonella sp.*, de los tratamientos: T0, T1, T2, y T3. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Grafico 4.3: Conteos microbiológicos de *Salmonella sp* obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico), en el día 0 después de la elaboración.



En el Grafico 4.3, observamos que en el día 0 no tiene la presencia del crecimiento de las bacteria *Salmonella sp.*, en el día 0 en ningún tratamiento,

En el día 7 es notable el crecimiento de esta bacteria patógena en todos los tratamientos, en el día 14, 21, el T0, el crecimiento de esta bacteria ha aumentado, mientras en los T1 y T2, disminuyen en la bacteria *Salmonella sp.*, Y el T3 ha inhibido por completo la bacteria *Salmonella sp.*; La actividad antimicrobiana es causada por el ácido láctico, este mismo es producido por la vía homofermentativa de las bacterias probióticas como el principal metabolito a través de la puede interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas, el grado de disociación del ácido láctico depende del pH, donde un bajo pH se encuentra en la forma no disociada, siendo tóxico para hongos, levaduras y varias bacterias. (Ouwehand 1993; Yang, 2000).

En el día 28 empiezan a disminuir lentamente la cantidad de patógenos en los T1 y T2, y el T3 se mantiene inhibiendo la bacteria, esto es gracias a la presencia de las dos bacterias utilizadas, que producen subsustancias antimicrobianas que inhiben al patógeno del queso, permitiendo buenas características fisicoquímicas y sensoriales. Las normas NTS 071 – MINSA/DIGESA V. 01, 2008. “Norma sanitaria, que establece los criterios microbiológicos de calidad e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano”. Establecen requerimientos microbiológicos para el queso fresco, donde especifica que hay ausencia de *Salmonella sp.*. Con base en los requerimientos de la norma los quesos de los tratamientos T3 cumple con las exigencias microbiológicas establecidas, y en el T1(*Lactococcus lactis*) y

T2(*Lb. acidophilus*), tenemos un crecimiento en la primera semana y después las bacterias probióticas empiezan a actuar lentamente y van inhibiendo la bacteria patógena, por último el T0, tiene un alto crecimiento microbiano de *Salmonella sp.*, por ello está fuera de los límites de la norma. Por otro lado (Oria, 1991), señala que es necesario en la industria lechera la destrucción de bacterias para prolongar la conservación de los productos lácteos.

4.1.4 EFECTO DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN DE COLIFORMES DEL QUESO TIPO PARIA

El comportamiento de los microorganismos contaminantes coliformes de los cuatro tratamientos. Los conteos microbiológicos fueron realizados cada 7 días para notar la diferencia en su evolución y los resultados obtenidos de los tratamientos se describen en la Tabla N° 4.4 y el Grafico N° 4.4.

TABLA 4.4: Conteos microbiológicos de coliformes (NMP), obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico) durante 28 días.

TRAT.	TIEMPO (DIAS)				
	0	7	14	21	28
T0	7.00±0011	16.30±0015	25.70±0020	28.00±0023	47.30±0026
T1	6.00±0021	11.00±0018	11.00±0018	7.00±0011	3.33±0020
T2	5.00±0022	7.00±0011	3.33±0020	3.00±0021	0.00
T3	3.33±0020	2.00±0010	0.00	0.00	0.00

Según la Tabla, en el día 0 tenemos un crecimiento de coliformes en los cuatro tratamientos (T0, T1, T2, y T3).

En el día 7 hay un crecimiento de coliformes, en el tratamiento control (T0) tiene un incremento en el número de NMP 16.30 en el T1 y T2 también tenemos un ligero incremento de 11 y 7 NMP respectivamente, a pesar que los dos tratamientos tienen adicionados las bacterias probióticas. Y en el T3 también tiene presencia de coliformes, pero este tratamiento presenta un descenso de los coliformes de 2.00 NMP, del promedio de las repeticiones.

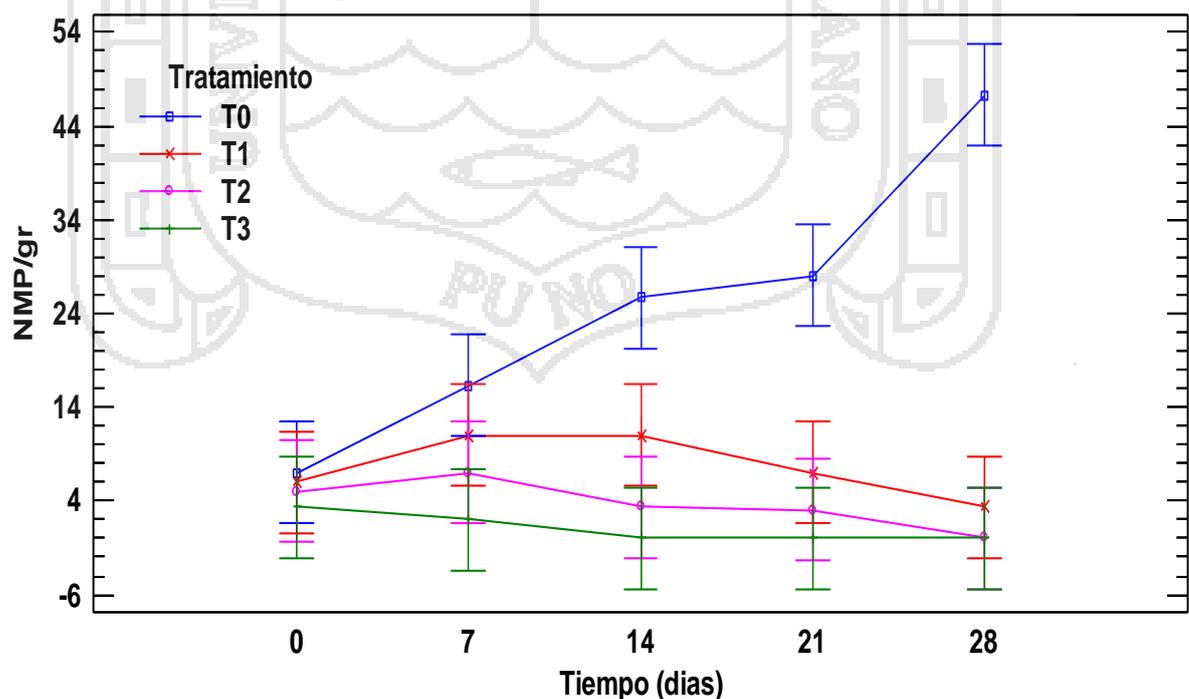
En el día 14 y 21, el T0 sigue aumentando la presencia de coliformes, con 25.70 y 28.00 NMP, mientras los T1 y T2 tienen un descenso en el crecimiento de la bacteria patógena de 11.00 a 7.00 y 3.33 a 3.00 de NMP, esto gracias a la presencia de probióticas en cada tratamiento. Mientras el T3 con probióticas, ha inhibido la presencia de coliformes, es decir que ha inhibido más rápido, esto gracias a la presencia de las dos bacterias probióticas juntas en este T3.

En el día 28, el T3 mantiene la inhibición de coliformes, mientras el T0, mantiene aumentando hasta 47.30 NMP la presencia de coliformes, mientras en el T1 y T2, presentan una disminución de coliformes, hasta 3.33 NMP y 0.00, que significa que el T2 ha logrado inhibir a la bacteria coliformes, por la presencia las bacterias probióticas. Según Ouwehand (1998), la fermentación reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y resulta en una cadena de moléculas orgánicas de bajo peso molecular que presentan actividad antimicrobiana, siendo las más comunes: el ácido láctico, el ácido acético y el ácido propionico. También se conoce que las bacterias lácticas producen además de ácidos orgánicos, otras sustancias antagónicas, como el peróxido de hidrógeno y otros radicales libres, diacetilo, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos y otros metabolitos, como moléculas pequeñas no proteicas y

bacteriocinas.

En el ANVA de la Tabla N° 6.10 en el Anexo 2A, la variabilidad de Coliformes (NMP) en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Log (UFC/gr) con un 95.0% de nivel de confianza. Mientras que en la prueba de Tukey de la Tabla N° 6.11 en el anexo 2A, indica que no hay una variabilidad en los tratamientos T2 y T3 tienen el mismo número de microorganismos. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Grafico 4.4: Conteos microbiológicos de Coliformes (NMP) obtenidos en quesos de los tratamientos T0 (control), T1, T2, T3 (adicionado probiótico), en el día 0 después de la elaboración.



En el Grafico 4.4, observamos que en el día 0 tienen la presencia del crecimiento de las bacterias Coliformes, en los cuatro tratamientos.

En el día 7 es notable el crecimiento de esta bacteria patógena en los T0, T1, y T2, mientras en el T3 ha disminuido. En el día 14, 21, el T0, el crecimiento de esta bacteria ha aumentado, mientras en los T1 y T2, disminuyen en la bacteria Coliformes, Y el T3 ha inhibido por completo la bacteria.

En el día 28 empiezan a disminuir lentamente la cantidad de patógenos en el T1, el T2 nos muestra que se ha inhibido los Coliformes y el T3 se mantiene inhibiendo la bacteria, esto es gracias a la presencia de las dos bacterias utilizadas, que producen sustancias antibacterianas que inhiben al patógeno del queso, permitiendo buenas características fisicoquímicas, sensoriales y alargar la vida útil del queso tipo paria. Las normas NTS 071 – MINSA/DIGESA V. 01, 2008. “Norma sanitaria, que establece los criterios microbiológicos de calidad e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano”. Establecen requerimientos microbiológicos para el queso fresco, donde especifica que hay ausencia de Coliformes. Con base en los requerimientos de la norma los quesos de los tratamientos T3 y el T2 cumplen con las exigencias microbiológicas establecidas, y en el T1 (*Lactococcus lactis*), tenemos un crecimiento en la primera semana y después las bacterias probióticas empiezan a actuar lentamente y van inhibiendo la bacteria patógena, logrando cumplir la norma, por último el T0, tiene un alto crecimiento de Coliformes, por ello está fuera de los límites de la norma. Además se han descrito diversos sistemas de inhibición microbiana desarrollada por bacterias probióticas como producción de compuestos

orgánicos, formación de metabolitos de oxígeno, compuestos orgánicas, antibióticos y bacteriocinas. Estos mecanismos las hacen capaces de inhibir una gran variedad de microorganismos contaminantes y/o patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Listeria* (Zamora-Rodriguez, 2003). Por otro lado (Oria, 1991), señala que es necesario en la industria lechera la destrucción de bacterias para prolongar la conservación de los productos lácteos.

4.2. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS

La Tabla 4.5 presenta las poblaciones de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis* que se lograron determinar en las muestras de queso T1, T2, y T3 los días 0, 7, 14, 21, y 28 en muestras de queso tipo paria almacenadas.

Tabla 4.5: Recuentos promedio de las colonias de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis*.

TRATAMIENTOS		DÍAS				
		0	7	14	21	28
T1 (<i>lactococcus lactis</i>)	UFC/gr	18x10 ⁴	62x10 ⁴	23x10 ⁵	21x10 ⁴	13x10 ⁵
	Log UFC/gr	5.26	5.79	6.36	6.32	6.11
T2 (<i>Lb. acidophilus</i>)	UFC/gr	22x10 ⁴	92x10 ⁴	18x10 ⁴	50x10 ⁵	39x10 ⁵
	Log UFC/gr	5.34	5.96	6.61	6.7	6.59
T3 (<i>lactococcus lactis</i>)	UFC/gr	17x10 ⁵	19x10 ⁵	63x10 ⁵	42x10 ⁶	33x10 ⁶
	Log UFC/gr	6.23	6.28	6.8	7.62	7.52
T3 (<i>Lb. acidophilus</i>)	UFC/gr	57x10 ⁵	78x10 ⁵	39x10 ⁶	72x10 ⁷	54x10 ⁷
	Log UFC/gr	6.76	6.89	7.59	8.86	8.73

Para el recuento de *Lb. acidophilus* se utilizó el método ya descrito con anterioridad, considerando positivas las colonias rugosas de color translúcido y tamaño igual o mayor a 2mm.

En la Figura 4.2 se puede observar placas de MRS agar inoculadas con muestras de queso fresco para el recuento de colonias viables de *Lactobacillus acidophilus*.

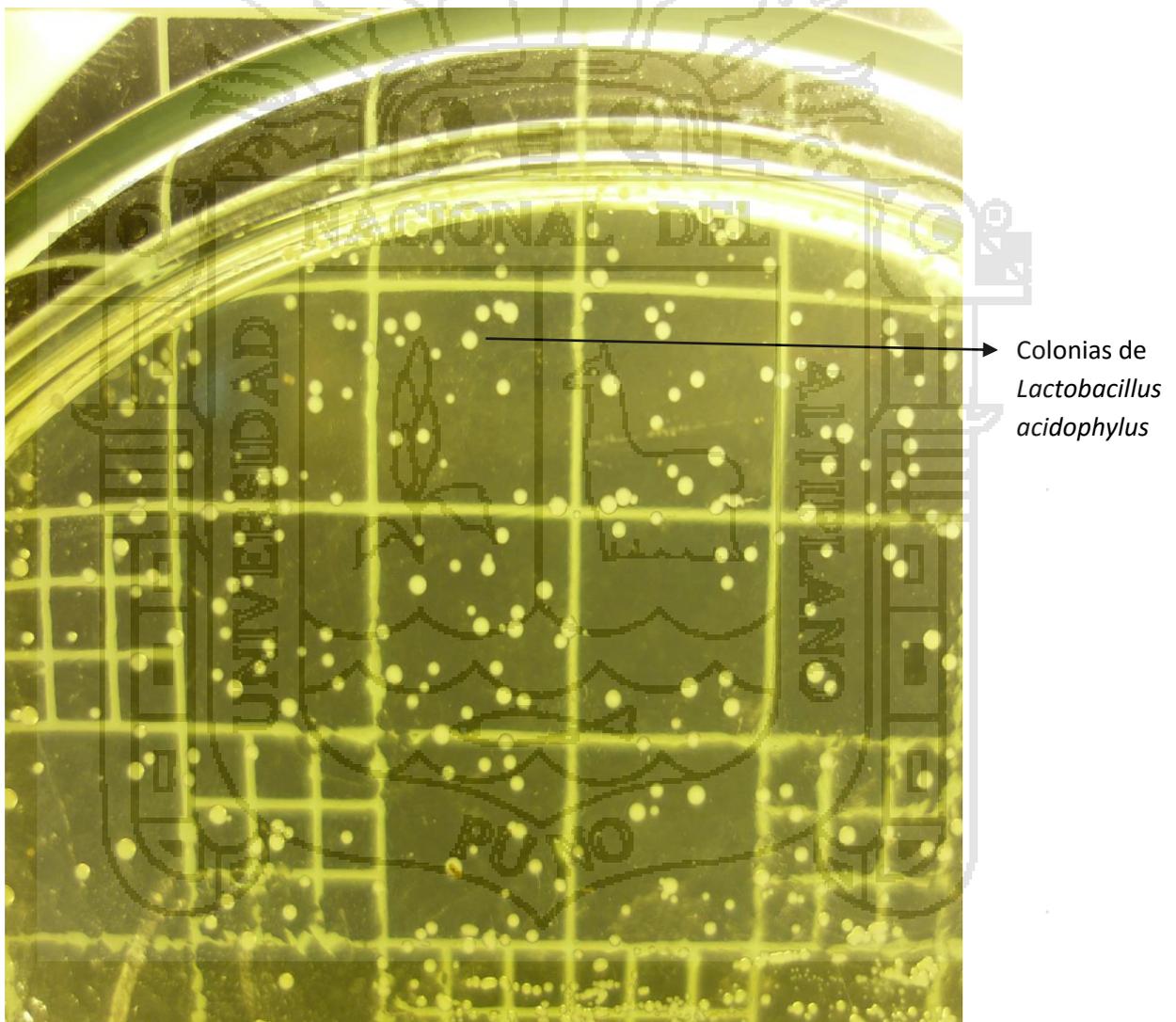
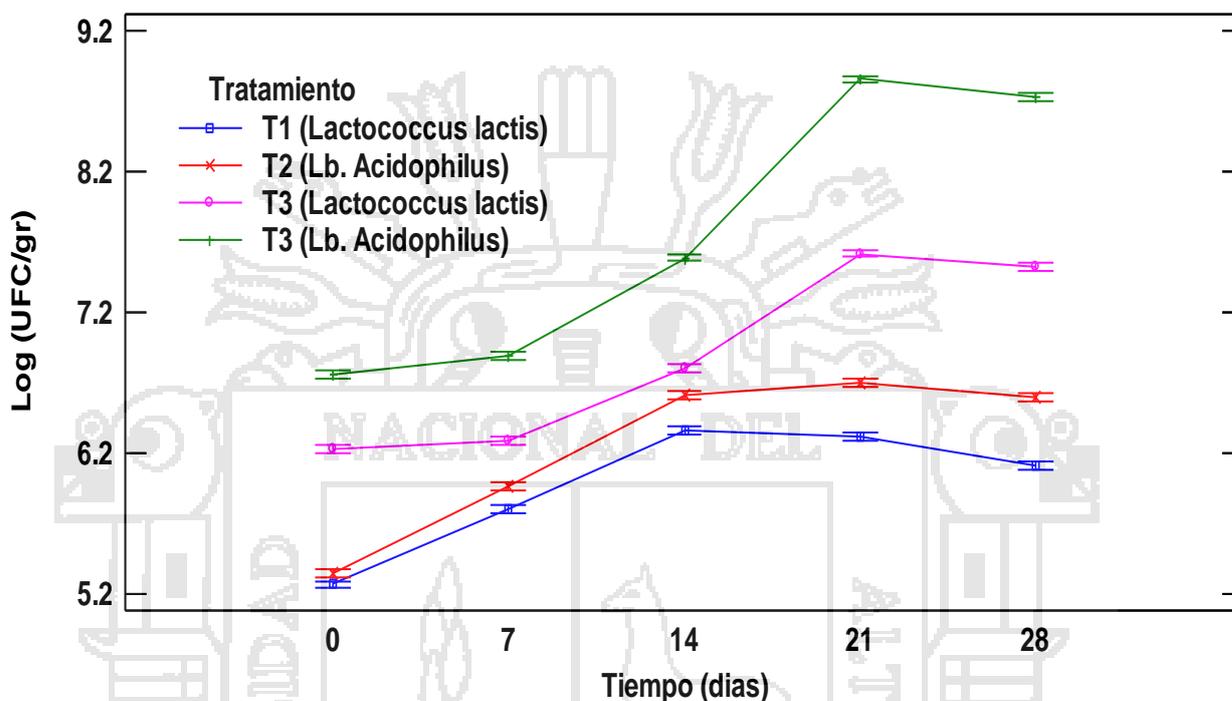


Figura 4.2: Fotografía de una placa de MRS agar inoculada con una muestra de queso del tratamiento T3. En dilución 10^{-4} , después de la incubación por 24 horas a 37°C , conteniendo colonias de *L. acidophilus*

Grafico 4.5 Recuento de T1 (*Lactococcus lactis*), T2 (*Lb. acidophilus*), T3 (*Lactococcus lactis*) y T3 (*Lb. acidophilus*) en log UFC/gr durante el tiempo de almacenamiento.



Durante la vida útil designada al producto en estudio (tratamiento T3), se encontraron en, 57×10^5 UFC/gr colonias viables de *Lactobacillus acidophilus* y 17×10^5 UFC/gr colonias viables *Lactococcus lactis* por gramo de queso un día después de la fabricación. Mientras los T1 y T2 tienen colonias viables de 18×10^4 UFC/gr y 22×10^4 UFC/gr.

En el día siete, los T1 y T2 tienen 62×10^4 UFC/g y 92×10^4 UFC/g. y el T3 contiene 78×10^5 UFC/gr colonias viables de *Lactobacillus acidophilus* y 19×10^5 UFC/gr colonias viables *Lactococcus lactis* por gramo de queso.

El día catorce, el T3 contiene 39×10^6 UFC/gr colonias viables de *Lactobacillus acidophilus* y 63×10^5 UFC/gr colonias viables *Lactococcus lactis* por gramo de queso. Los T1 y T2 tienen 23×10^5 UFC/g y 41×10^5 UFC/g.

En el día veintiuno. Los quesos que fueron adicionados con los dos cultivos probióticos en su fabricación (tratamiento T3), presentaron resultados en cuanto a poblaciones del microorganismo *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis*, en número suficiente para otorgarle al producto la calidad de probiótico. También sucede con los quesos del T1 y T2.

En el ANVA de la Tabla N° 6.12 en el Anexo 3A, la variabilidad de las cepas probióticas (Log UFC/gr) en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Log (UFC/gr) con un 95.0% de nivel de confianza. Mientras que en la prueba de Tukey de la Tabla N° 6.13 en el anexo 3A, indica que no hay una variabilidad en los tratamientos. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Los contenidos del microorganismo en los productos aumentan desde el día 1 hasta el día 21 donde se ha determinado su máximo, y disminuyen hasta el día 28. La disminución en el número de colonias era esperada ya que para los 28 días de almacenamiento, otros microorganismos se desarrollaron en gran medida, significando competencia para los probióticos. Además existe competencia por parte de las bacterias, pues se multiplican más rápido que las bacterias probióticas y también pueden producir sustancias inhibitorias. De todas

maneras la cantidad de microorganismos viables por gramo que se pueden encontrar al final de la vida útil aún son suficientes para obtener los beneficios esperados por su consumo.

En un estudio realizado por Batista (2006) en un queso fresco típico en Brasil, Minas frescal, se observaron poblaciones promedio de *Lactobacillus acidophilus* mayores a 10^6 UFC por gramo, y se observa una tendencia similar de crecimiento hasta el día 14 de 10^7 UFC/g que disminuye a 10^6 UFC/g al final del período de estudio (21 días).

Buritiet *al.* (2007), en la realización de queso Minas frescal probiótico, inoculado con cultivo iniciador mesófilo y cultivo probiótico mixto compuesto por *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis*, encontró que la viabilidad de las bacterias probióticas, en especial *L. acidophilus*, son más estables y se mantienen por niveles sobre 10^8 UFC/g. En el estudio, en lugar de decrecer el contenido de bacterias a los 14 días, aumentan continuamente desde el día 1 hasta el día 21, al final de la vida útil del producto.

En otros tipos de lácteos, Corrales *et al.* (2007) realizó pruebas produciendo helado de vainilla adicionado *L. acidophilus* y *B. lactis*. Para esto, inoculó 10^7 UFC/g de cada uno de los microorganismos durante la fabricación. Fueron realizados recuentos de los microorganismos durante 85 días, y resultó en un descenso de la población viable de ambos microorganismos durante la vida útil, aunque no llegó a ser inferior a 10^6 , condición mínima para considerarlo como buen vehículo para probióticos. En este caso la temperatura de almacenamiento (-18°C) no permite el crecimiento de los microorganismos probióticos pero al inocular una cantidad suficiente de estos, se pueden mantener niveles aceptables para considerar al

producto funcional.

Como ya se ha mencionado, las leches fermentadas como el yogur son medios ampliamente utilizados para la adición de probióticos. *L. acidophilus* ha sido usado de manera común para la producción de leches acidófilas y koumis. García *et al.* (2004) usó *L. acidophilus* y *L. casei* en el desarrollo de una leche fermentada aprovechando sus propiedades acidificantes. El producto tuvo buenas características comparada con yogur, y una viabilidad de las cepas probióticas de 10^8 UFC/ml durante 12 días de almacenamiento en refrigeración. Este período de vida del producto es bastante menor que el del yogurt, de hasta 30 días. En el caso del queso fresco y leche fermentada difiere del helado por la temperatura a la que son almacenados, ya que las poblaciones microbianas a temperatura de refrigeración, aumentan y continúan sus actividades metabólicas de crecimiento, modificando al producto física, química y sensorialmente. Una cantidad superior a 10^7 ufc/g en el producto significa una mayor producción de ácido en los productos, lo que acorta el período de consumo por la alteración sensorial.

Es necesario acotar que difícilmente se encuentra en el mercado quesos frescos mucho tiempo después de su fabricación. Algunos quesos frescos que se expenden tienen periodos de vida útil de 15 días, similar espacio de tiempo en que el queso con probióticos desarrollado en este estudio. También se puede considerar la posibilidad de extender la vida útil del producto al envasar al vacío, pues los microorganismos aerobios no deseados no pueden sobrevivir en el ambiente sin oxígeno, condición que no afectaría a *Lactobacillus acidophilus* por ser un microorganismo anaerobio.

Conforme a lo que ya se había mencionado, el criterio comúnmente utilizado

para el consumo de probióticos de 10^8 - 10^9 UFC por día, puede sugerirse un consumo de 60 a 100 g de queso al día para obtener los beneficios terapéuticos deseados, considerando que un pedazo de queso del tamaño de una caja de fósforos representa aproximadamente 30 gr.

4.3. EFECTO DE LOS MICROORGANISMO PROBIÓTICOS EN LAS CUALIDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL QUESO TIPO PARIÁ

La presencia de los microorganismos probióticos en el producto generó diferencias en los quesos obtenidos en los tratamientos. La actividad metabólica de los microorganismos adicionados (*Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis*) influyeron en las características del producto final y en su desenvolvimiento durante el período de vida útil. La forma en que intervino el cultivo se aprecia notablemente en los resultados explicados a continuación.

4.3.1. DETERMINACIÓN DE pH

Los valores de pH obtenidos en los tratamientos T0, T1, T2, T3, medidos semanalmente en quesos almacenados durante 28 días, se presentan en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6: Los valores de pH de los quesos

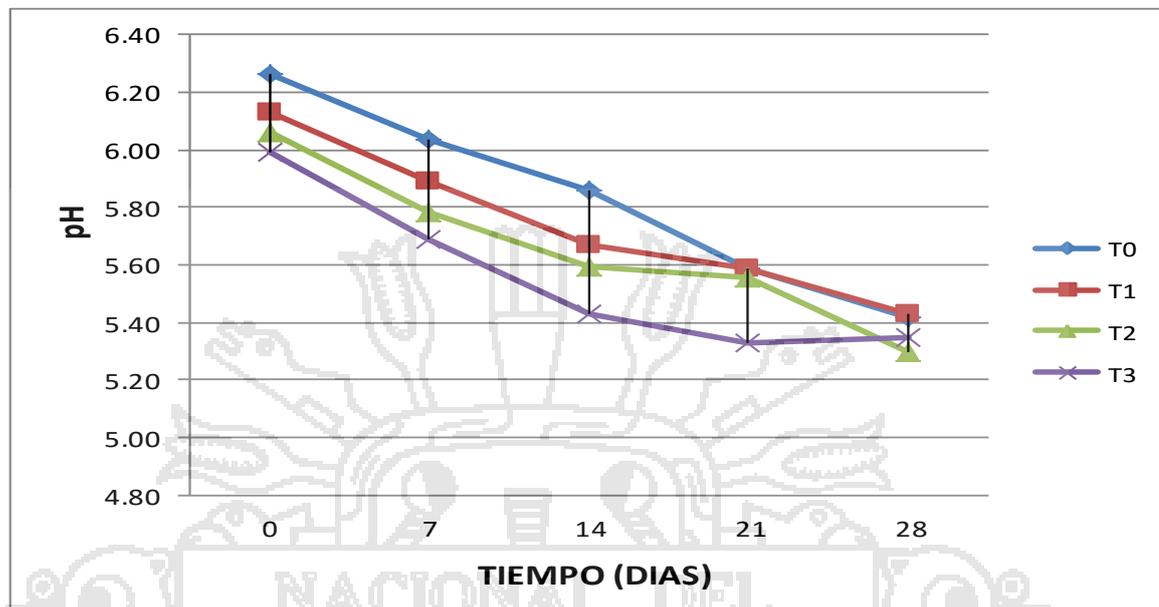
DÍAS	TRATAMIENTOS			
	T0	T1	T2	T3
0	6.26 ± 0.07	6.13 ± 0.01	6.06 ± 0.06	5.99 ± 0.20
7	6.04 ± 0.07	5.89 ± 0.07	5.78 ± 0.02	5.69 ± 0.03
14	5.86 ± 0.05	5.67 ± 0.06	5.59 ± 0.01	5.43 ± 0.01
21	5.59 ± 0.03	5.59 ± 0.01	5.56 ± 0.03	5.33 ± 0.01
28	5.42 ± 0.03	5.43 ± 0.03	5.30 ± 0.17	5.35 ± 0.02

Desde el día de fabricación de los quesos se puede observar una diferencia en los valores de pH entre los tratamientos, siendo el tratamiento T3 el que presenta una descendencia. Esta tendencia persiste durante todo el período de estudio (28 días).

La evolución del pH durante los 28 días de estudio en los quesos de los dos tratamientos se puede apreciar en la figura 3.2. La tendencia que siguen ambos tratamientos es un descenso del pH hasta el día 21. A partir de ese día, el pH se estabiliza, en el caso de los tratamientos T0, T1, T2, T3.

La presencia de cultivos lácteos en el queso y la consecuente producción de ácido láctico por fermentación de la lactosa, provoca el descenso normal del pH del producto durante la fabricación, continua descendiendo durante los primeros días hasta pH 5 o 5.2 y al final de su vida útil estos valores se estabilizan e incluso, vuelven a incrementarse hacia la neutralidad, como en el caso de algunos quesos madurados (Martegani, 2006). Además la reducción de pH y la utilización de los carbohidratos disponibles parecen constituir el principal mecanismo de antagonismo microbiano (Piard y Desmazeud, 1992, Ouwehand, 1998).

Grafico 4.6: Evolución de pH para los quesos, evaluado semanalmente durante 28 días de estudio.



Al tratamiento T3 se le añadió mayor carga bacteriana (mezcla de probióticos) que al tratamiento T0 (control), por lo que podría haber más actividad de los microorganismos, y por tal razón, los valores de pH del tratamiento T3 llegan a ser inferiores a los del tratamiento T0. En las mediciones de pH, la diferencia de valores entre tratamientos fue significativa estadísticamente (>95%).

4.3.2. ANÁLISIS PROXIMAL

Tabla 4.7: Composición química de quesos

Quesos	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Ceniza (%)
T ₀	43.03 ± 0.30	17.28 ± 0.22	19.85 ± 0.50	4.96 ± 0.42
T ₁	48.66 ± 0.52	19.12 ± 0.34	21.86 ± 0.41	4.36 ± 0.33
T ₂	47.00 ± 0.20	18.50 ± 0.15	22.10 ± 0.35	4.54 ± 0.25
T ₃	50.10 ± 0.10	21.40 ± 0.12	23.88 ± 0.22	4.62 ± 0.28

* Promedio de los valores obtenidos de los resultados de tres repeticiones.

De la Tabla 4.7; Los resultados del análisis fue realizado el primer día después de fabricado el queso, y la composición centesimal del queso viene dada por la composición de la leche, y para el caso del presente estudio, se utilizó la misma leche para cada tratamiento, en cada una de las repeticiones. con respecto a la humedad, grasa, proteína y ceniza, los tratamientos muestran ligeras diferencias, que no afectaron a la aceptabilidad del queso por parte de los catadores.

En este caso, el uso de las bacterias probióticas: *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus acidophilus* en la producción de queso tipo paria, afecta la composición del producto final. Según Ouwehand, 1998; Las bacterias probióticas no solo son interesantes en la industria alimentaria por inducir características organolépticas y estructurales deseables, sino también por inhibir el desarrollo de microorganismos no deseados, alterantes y patógenos, lo que sugiere la posibilidad de utilizarlas para extender la vida útil e incrementar la calidad higiénica de los alimentos.

Los tratamientos aplicados en el presente estudio muestran porcentajes similares de humedad, 43.03% y 50.10% para T0 y T3, respectivamente. El queso fresco se caracteriza por presentar humedad alta (entre 50 y 80%), razón por la cual su período de vida útil es corto si se compara con otros tipos de queso. El alto contenido de humedad en el queso significa también una actividad de agua alta (a_w entre 0.97-0.99); estos valores de a_w altos permiten el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras asociados con el deterioro microbiológico del producto. (Inda, 2000)

El contenido de proteína en los quesos T0 y T3 (17.28% y 21.40%, respectivamente) son muy similares entre sí, además concuerdan con los

valores promedios que se han determinado para queso fresco: 17%. El caso del contenido de grasa concuerda también con lo esperado pues los valores de 19.85% y 23.88%, obtenidos en los tratamientos T0 y T3, respectivamente, se asemejan al promedio preestablecido del 22%. (Calle y Solano, 2004)

4.4. ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS QUESOS TIPO PARIÁ

El análisis sensorial se realizó a los cuatro tratamientos: queso control (T0), queso con bacterias probióticas (T1,T2,T3), mediante una tarjeta de evaluación en la que se presentó los códigos, la escala de calificación y atributos sensoriales del queso que fueron: apariencia general, color, sabor, aroma, textura, para lo cual se utilizó el diseño estadístico bloque completamente al azar (DBCA), resultados que se encuentran en el Anexo 3A donde se muestra el ANVA y sus pruebas de comparación para a cada atributo sensorial del queso, para lo cual su interpretación se presenta a continuación:

4.4.1. APARIENCIA GENERAL

Las Tablas, que se encuentran en el Anexo 3A, muestran los ANVAs y la prueba de Tukey de la evaluación sensorial para la apariencia general de los quesos.

Tabla 4.8: Calificaciones promedio obtenidas en el análisis sensorial de apariencia general de los tratamientos T0 (control) , T1, T2, y T3 y valoración asignada según escala hedónica, después de su elaboración hasta 28 días de almacenamiento.

TRAT.		DÍAS				
		0	7	14	21	28
T0	Calificación	4.33	3.73	3.27	3	2.8
	Valoración	Bueno	Regular	Regular	Regular	Regular
T1	Calificación	4.4	4	3.8	3.6	3.4
	Valoración	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Regular
T2	Calificación	4.53	4.2	3.87	3.67	3.4
	Valoración	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Regular
T3	Calificación	4.8	4.6	4.47	4.27	4.13
	Valoración	M. bueno	M. bueno	Bueno	Bueno	Bueno

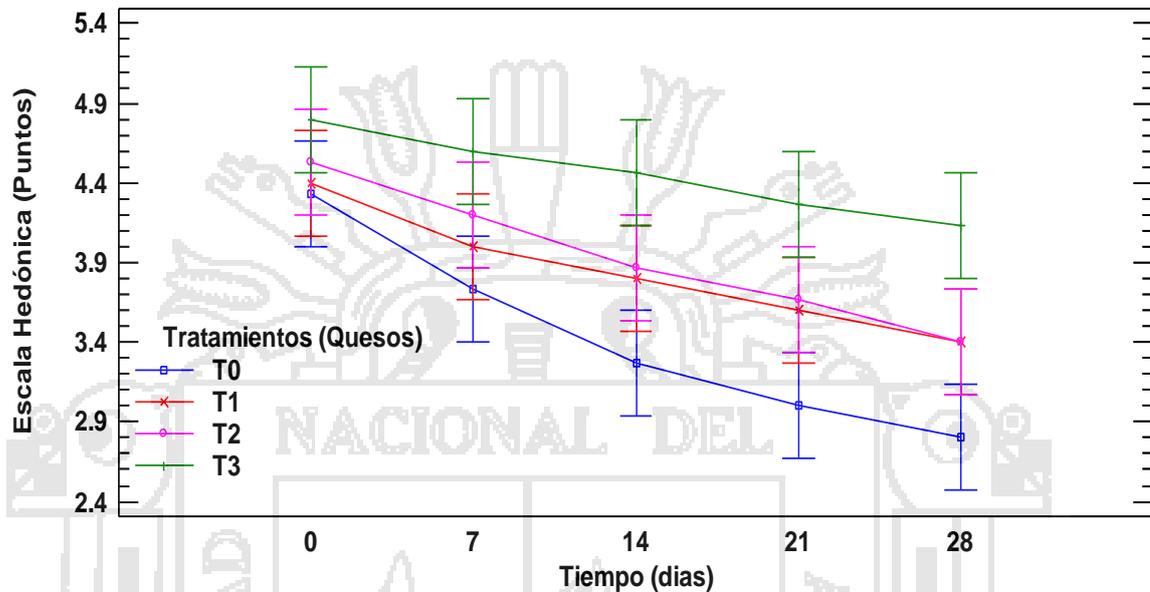
Según las escalas utilizadas, el queso control (T0) presenta buenas características para su consumo después de la elaboración. Después del día 7 hasta 28 días, el puntaje de calificación se fue disminuyendo hasta llegar a 2.80 que significa regular.

Los T1 y T2 presentan buenas características en apariencia general después de la elaboración y se mantienen durante los 28 días en esa escala de calificación de bueno. Y el T3 es el queso que ha resultado mejor, con una calificación de muy buena después de su elaboración y permaneció manteniéndose en una calificación de bueno.

Según el ANVA de la Tabla N° 6.14 en el Anexo 4A muestran que los valores P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre los tratamientos: T0, T1, T2, y T3 con un 95.0% de nivel de confianza. Mientras que en la prueba de Tukey de la Tabla N° 6.15 en el Anexo 4A, indica que el T3 es mejor que los de más tratamientos. El T1 y T2 no existen diferencias en sus resultados, mientras que el T0 es

diferente a los demás y también el tratamiento que presenta menores calificaciones que los demás.

Grafico 4.7: Apariencia general de los tratamientos (quesos)



En el Grafico 4.7 nos muestra el comportamiento de la apariencia general de las muestras del tratamiento T3 para el análisis realizado durante las 28 días se clasificó como muy buena, seguido de los tratamientos T1 y T2 que no son significativos o sea no se diferencian en sus resultados y el T0 es el tratamiento control que más ha disminuido en sus resultados a los 28 días con una calificación 2.80. Es necesario considerar también que la valoración otorgada al parámetro apariencia general en el queso con probióticos es de 4.45, superior a la otorgada al queso control en el análisis del mismo parámetro con 3.42, estos resultados son los promedios de las calificaciones durante el análisis realizado. Para tal efecto (Casp y Abril 1999) señalan que las temperaturas a la que se conservan los alimentos causan alteración de las características sensoriales como consecuencias del

desarrollo microbiano los que dan lugar a una serie de compuestos que modifican las cualidades del producto.

4.4.2 COLOR

Las Tablas que se encuentran en el Anexo 3A, muestran los ANVA y la prueba de Tukey del color de los tratamientos (quesos).

La Tabla 4.9. contiene los promedios de las calificaciones asignadas a los quesos de los tratamientos T0,T1,T2 y T3, resultados del análisis de parámetro sensorial como es el color de las muestras en tiempos de 0, 7,14,21,y 28 días.

Tabla 4.9: Calificaciones promedio obtenidas en el análisis sensorial de color de los tratamientos T0 (control) , T1, T2, y T3 y valoración asignada según escala hedónica, después de su elaboración hasta 28 días de almacenamiento.

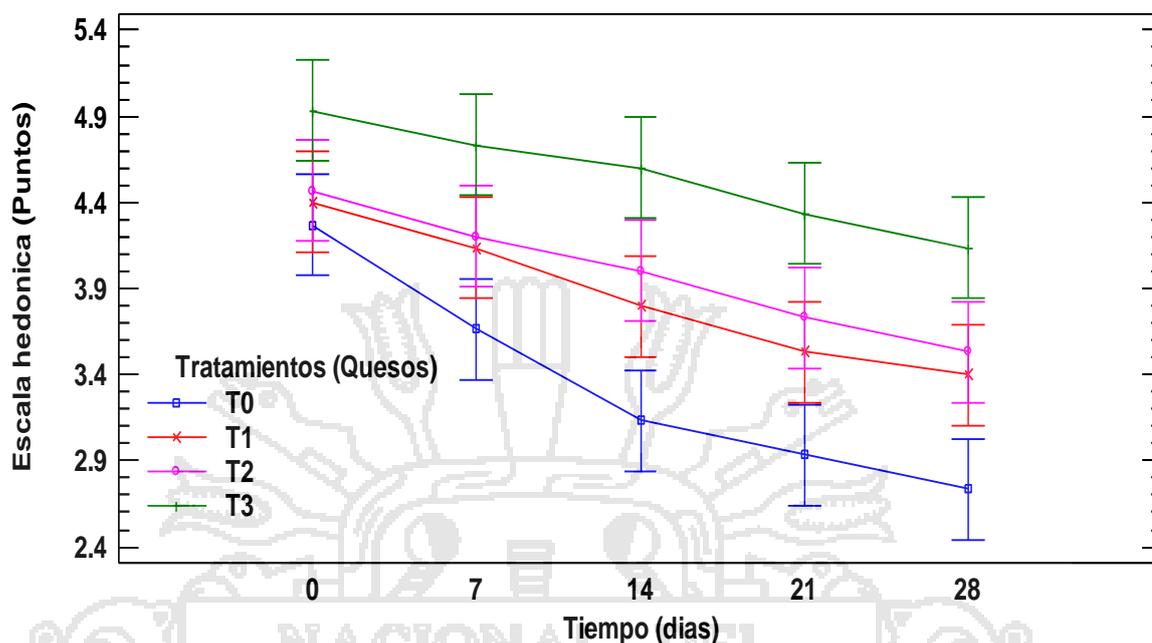
TRAT.		DÍAS				
		0	7	14	21	28
T0	calificación	4.27	3.67	3.13	2.93	2.73
	valoración	Bueno	Bueno	Regular	Regular	Regular
T1	calificación	4.4	4.13	3.8	3.53	3.4
	valoración	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Regular
T2	calificación	4.47	4.2	4	3.73	3.53
	valoración	M. bueno	Bueno	Bueno	Bueno	Bueno
T3	calificación	4.93	4.73	4.6	4.33	4.13
	valoración	M. bueno	M. bueno	M. bueno	Bueno	Bueno

Según la Tabla 4.9, de las escalas utilizadas, el queso T3 con microorganismos probióticos presenta buenas características en cuanto al color para su consumo después de la elaboración y durante los 28 días de evaluación.

El T2 presenta buenas calificaciones en la escala hedónica después de la elaboración con muy bueno, y después se mantienen durante los 28 días en calificación de bueno.

El T1 también empieza con una calificación de bueno después de su elaboración, y su calificación va disminuyendo hasta llegar a una valoración de regular y seguido el T0.

La Tabla ANVA de la Tabla N° 6.16, que se encuentran en el Anexo 4A descompone la variabilidad de Escala hedónica (Puntos) del color en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Escala hedónica (Puntos) del color con un 95.0% de nivel de confianza. Mientras que en la prueba de Tukey de la tabla 6.17 en el anexo 4A, indica que el T3 es mejor que los de más tratamientos. El T1 y T2 no existen diferencias en sus resultados, mientras que el T0 es diferente a los demás y también el tratamiento que presenta menores calificaciones.

Grafico 4.8: Color de los tratamientos (quesos).

En el Grafico 4.8 nos muestra el comportamiento del color de las muestras del tratamiento T3 para el análisis realizado durante las 28 días se clasificó como muy buena, seguido de los tratamientos T1 y T2 que no son significativos o sea no se diferencian en sus resultados y el T0 es el tratamiento control que más ha disminuido en sus resultados a los 28 días. Es necesario considerar también que la valoración promedio otorgada al parámetro color en el queso con probióticos es de 4.55, superior a la otorgada al queso control en el análisis del mismo parámetro con 3.35, estos resultados son las calificaciones durante el análisis realizado. Según (Morales A., 1994) el color puede ser medido instrumental más efectivamente que en forma visual, ya que no se equivoca al evaluar el cambio de color. El color puede ser un indicador de un sabor o una textura desagradable.

4.4.3 SABOR

Las Tablas, que se encuentran en el Anexo 3A, muestran los ANVAs y la prueba de Tukey del sabor de los tratamientos (quesos).

La Tabla 4.10. contiene los promedios de las calificaciones asignadas a los quesos de los tratamientos T0,T1,T2 y T3, resultados del análisis de parámetro sensorial como es el sabor de las muestras en tiempos de 0, 7,14,21 y 28 días.

Tabla 4.10: Calificaciones promedio obtenidas en el análisis sensorial de sabor de los tratamientos T0 (control), T1, T2, y T3 y valoración asignada según escala hedónica (1, 2, 3, 4, y 5), después de su elaboración hasta 28 días de almacenamiento.

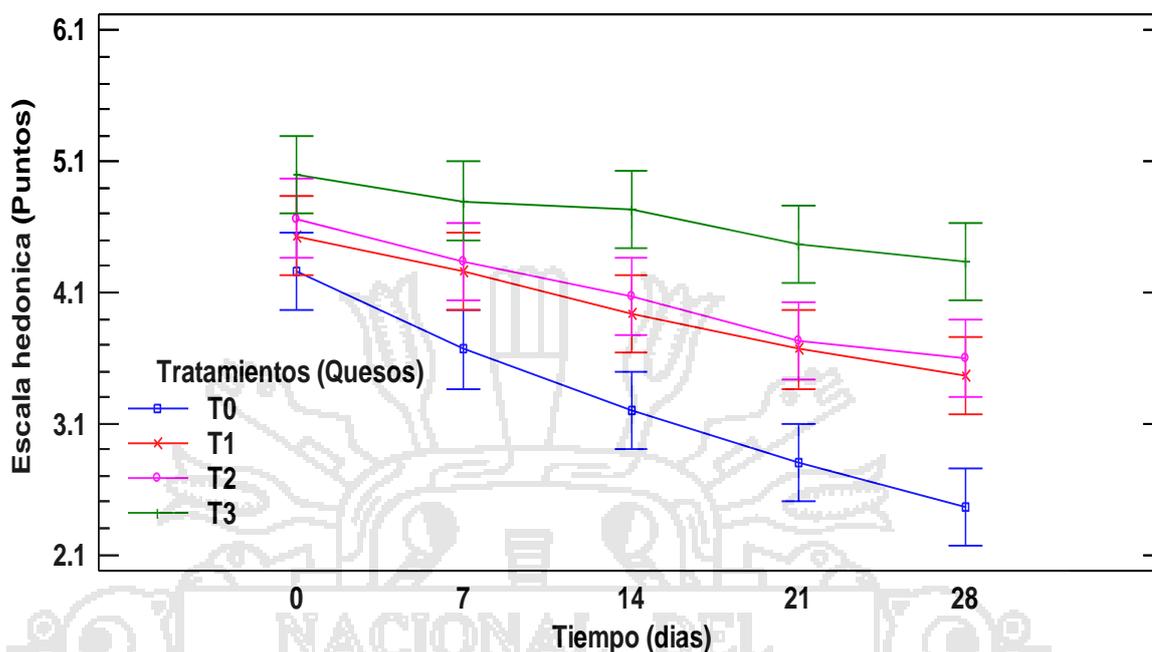
TRAT.		DÍAS				
		0	7	14	21	28
T0	calificación	4.27	3.67	3.2	2.8	2.47
	valoración	Bueno	Bueno	Regular	Regular	Mala
T1	calificación	4.53	4.27	3.93	3.67	3.47
	valoración	Buena	Buena	Buena	Buena	Regular
T2	calificación	4.67	4.33	4.07	3.73	3.6
	valoración	M. buena	Buena	Buena	Buena	Buena
T3	calificación	5	4.8	4.73	4.47	4.33
	valoración	M. buena	M. buena	M. buena	Buena	Buena

Según la Tabla 4.10, de la escala de calificación utilizada, el queso T3 que tiene la combinación de microorganismos probióticos presenta buenas características en cuanto al sabor para el agrado del consumidor después de la elaboración y durante los 28 días de evaluación, manteniéndose con una calificación de muy buena.

El T2 y T1 presentan buenas calificaciones en la escala hedónica después de la elaboración con muy bueno, y se mantienen durante los 28 días en calificación de bueno.

El T0 es el queso control que ha empezado con calificación de bueno después de su elaboración y su calificación a partir del día 14 ha disminuido, llegando a una calificación de mala en el día 28.

En el ANVA de la Tabla 6.18, que se encuentran en el Anexo 4A descompone la variabilidad de Escala hedónica (Puntos) del sabor en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Escala hedónica (Puntos) con un 95.0% de nivel de confianza. Mientras que en la prueba de Tukey de la tabla 6.19 en el anexo 4A, indica que el T3 es mejor que los de más tratamientos. El T1 y T2 no existen diferencias en sus resultados, mientras que el T0 es diferente a los demás y también el tratamiento que presenta menores calificaciones.

Grafico 4.9: Sabor de los tratamientos (quesos).

En el Grafico 4.9 nos muestra el comportamiento del sabor de las muestras del tratamiento T3 para el análisis realizado durante las 28 días se clasificó como muy buena, seguido de los tratamientos T1 y T2 que no son significativos o sea no se diferencian en sus resultados y el T0 es el tratamiento control que más ha disminuido en sus resultados a los 28 días. Es necesario considerar también que la valoración promedio otorgada al parámetro color en el queso con microorganismos probióticos es de 4.67, superior a la otorgada al queso control en el análisis del mismo parámetro con 3.28, estos resultados son las calificaciones durante el análisis realizado. Según (Ureña y Arrigo, 1999) el sabor, es la interpretación psicológica de respuesta fisiológica de la presencia de componentes volátiles en un alimento saboreado en la boca.

4.5.4 AROMA

En la Tablas, que se encuentran en el anexo 3A, muestra el ANVA y la prueba de Tukey de aroma de los tratamientos (quesos) durante su almacenamiento.

La Tabla 4.11 contiene los promedios de las calificaciones asignadas a los quesos de los tratamientos T0,T1,T2 y T3, resultados del análisis de parámetro sensorial como es el aroma de las muestras en tiempos de 0, 7,14,21,y 28 días.

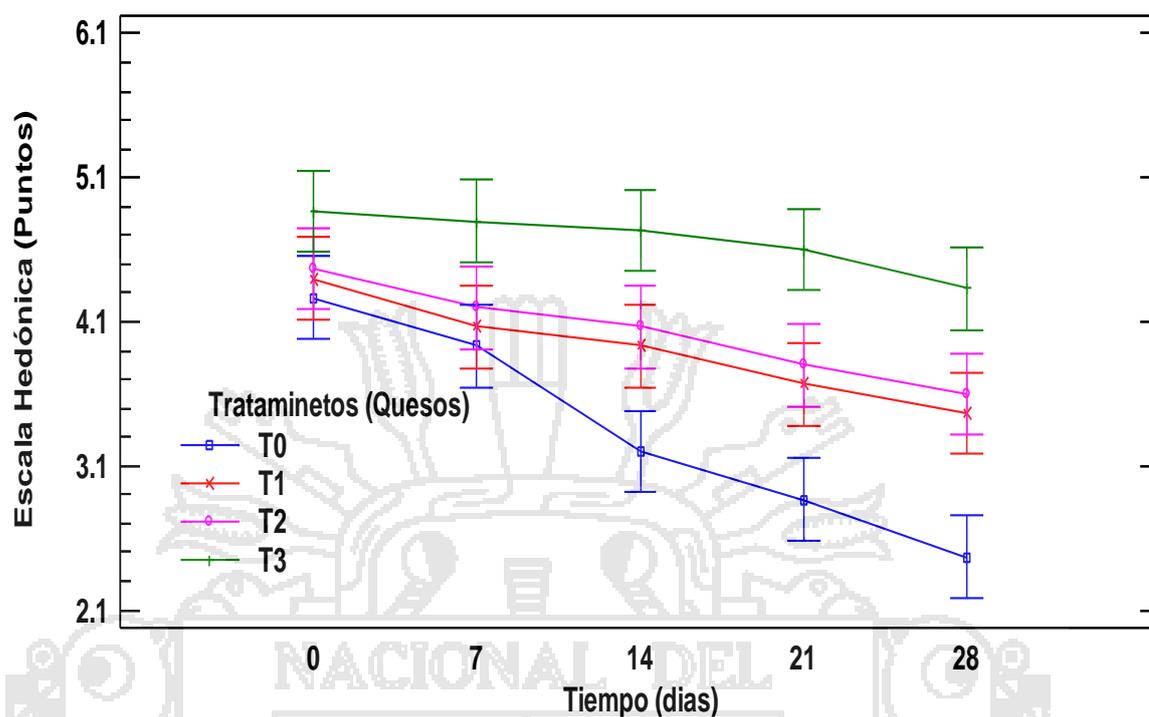
Tabla 4.11: Calificaciones promedio obtenidas en el análisis sensorial de aroma de los tratamientos T0 (control), T1, T2, y T3 y valoración asignada según escala hedónica, después de su elaboración hasta 28 días de almacenamiento.

TRAT.		DÍAS				
		0	7	14	21	28
T0	calificación	4.27	3.93	3.2	2.87	2.47
	valoración	Buena	Buena	Regular	Regular	Mala
T1	calificación	4.4	4.07	3.93	3.67	3.47
	valoración	Buena	Buena	Buena	Buena	Regular
T2	calificación	4.47	4.2	4.07	3.8	3.6
	valoración	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena
T3	calificación	4.87	4.8	4.73	4.6	4.33
	valoración	M. buena	M. buena	M. buena	M. buena	Buena

Según la Tabla 4.11 de la escala de calificación utilizada, el queso T3 que tiene la combinación de microorganismos probióticos presenta buenas características en cuanto al aroma, después de la elaboración y durante los 28 días de evaluación, manteniéndose con una calificación de muy buena.

El T2 y T1 presentan buenas calificaciones en la escala hedónica después de la elaboración con muy bueno. Mientras el T0 es el queso control que ha empezado con calificación de bueno después de su elaboración y su calificación a partir del día 14 ha disminuido, llegando a una calificación de mala en el día 28.

En el ANVA de la Tabla N° 6.20 en el Anexo 4A descompone la variabilidad de Escala Hedónica (Puntos) en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Escala Hedónica (Puntos) con un 95.0% de nivel de confianza. Mientras que en la prueba de Tukey de la tabla N° 6.21 en el anexo 4A, indica que el T3 es mejor que los de más tratamientos. El T1 y T2 no existen diferencias en sus resultados, mientras que el T0 es diferente a los demás y presenta menores valores de calificación.

Grafico 4.10: Aroma de los tratamientos (quesos).

En el Grafico 4.10 nos muestra el comportamiento de el aroma de las muestras del tratamiento T3 para el análisis realizado durante las 28 días se clasificó como muy buena, seguido de los tratamientos T1 y T2 que no son significativos, diferencian en sus resultados como buena y el T0 es el tratamiento control que más ha disminuido en sus resultados a los 28 días como regular. Es necesario considerar también que la valoración promedio otorgada al parámetro de aroma en el queso con microorganismos probióticos es de 4.67, superior a la otorgada al queso control en el análisis del mismo parámetro con 3.35, estos resultados son las calificaciones durante el análisis realizado. Según (Ureña y Arrigo, 1999) el aroma, como principal componente del sabor y a su percepción es por la nariz de sustancias volátiles contenidas en el alimento que son liberadas por ciertos estímulos realizando una presión natural.

4.5.5 TEXTURA

En las Tablas, que se encuentran en el anexo 3A, muestra el ANVA y la prueba de Tukey la textura de los tratamientos (quesos) durante su almacenamiento.

La Tabla 4.12. contiene los promedios de las calificaciones asignadas a los quesos de los tratamientos T0,T1,T2 y T3, resultados del análisis de parámetro sensorial como la textura de las muestras en tiempos de 0, 7,14,21,y 28 días.

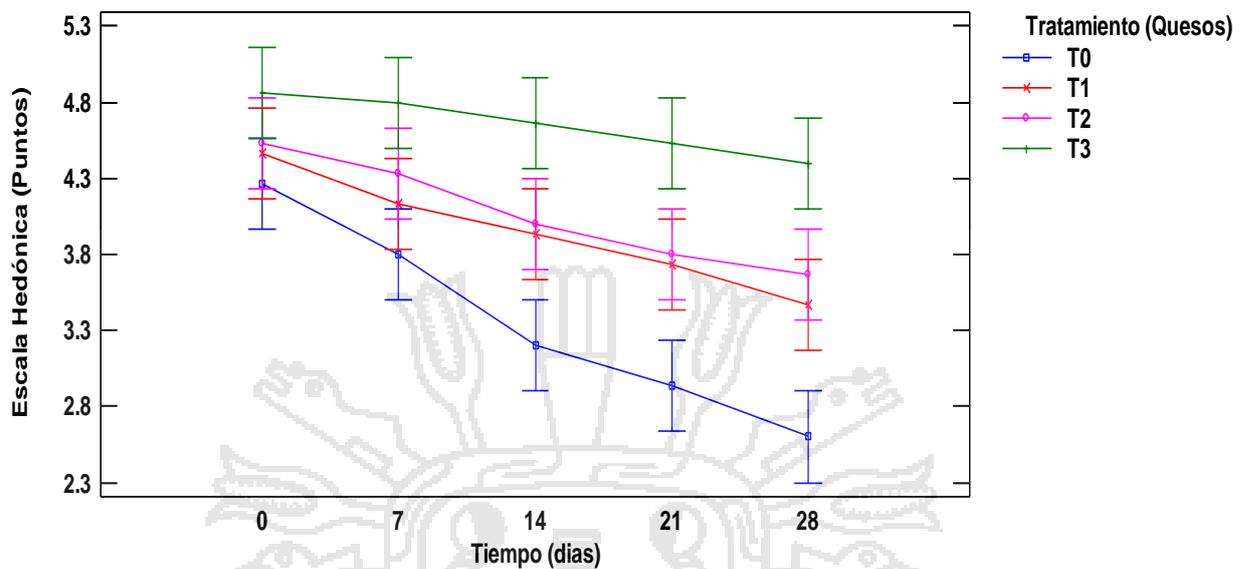
Tabla 4.12: Calificaciones promedio obtenidas en el análisis sensorial de textura de los tratamientos T0 (control), T1, T2, y T3 y valoración asignada según escala hedónica, después de su elaboración hasta 28 días de almacenamiento.

TRAT.	DÍAS					
	0	7	14	21	28	
T0	calificación	4.27	3.8	3.2	2.93	2.6
	valoración	Buena	Buena	Regular	Regular	Regular
T1	calificación	4.47	4.13	3.93	3.73	3.47
	valoración	Buena	Buena	Buena	Buena	Regular
T2	calificación	4.53	4.33	4	3.8	3.67
	valoración	M. buena	Buena	Buena	Buena	Buena
T3	calificación	4.87	4.8	4.67	4.53	4.4
	valoración	M. buena	M. buena	M. buena	Buena	Buena

Según la Tabla 4.12 de la escala de calificación utilizada, el queso T3 que tiene la combinación de microorganismos probióticos presenta en muy buenas características en cuanto a la textura del queso, después de la elaboración y durante los 28 días de evaluación, manteniéndose con una calificación de muy buena.

El T2 y T1 presentan buenas calificaciones en la escala hedónica después de la elaboración con muy bueno. Mientras el T0 es el queso control que ha empezado con calificación de bueno después de su elaboración y su calificación a partir del día 7 ha disminuido, llegando a una calificación de regular en el día 28.

En ANVA de la Tabla 6.22, que se encuentran en el Anexo 4A descompone la variabilidad de Escala Hedónica (Puntos) en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Escala Hedónica (Puntos) con un 95.0% de nivel de confianza. Mientras que en la prueba de Tukey de la tabla N° 6.23 en el anexo 4A, indica que el T3 es mejor que los de más tratamientos. El T1 y T2 no existen diferencias en sus resultados, mientras que el T0 es diferente a los demás y presenta menores valores de calificación.

Grafico 4.11: Textura de los tratamientos (quesos).

En el Grafico 4.11 nos muestra el comportamiento de textura de las muestras del tratamiento T3 clasifico como muy buena para el análisis realizado durante las 28 días, seguido de los tratamientos T1 y T2 que no presentaron diferencias en sus resultados y se aprecia en la escala de calificación como buena y el T0 es el tratamiento control que más ha disminuido en sus resultados a los 28 días de buena a regular.

Es necesario considerar también que la valoración promedio otorgada al parámetro de textura en el queso con microorganismos probióticos es de 4.65, superior a la otorgada al queso control en el análisis del mismo parámetro con 3.36, estos resultados son las calificaciones durante el análisis realizado por los panelistas,. Presentan una disminución en la calificación que varía de 2-5 puntos hasta el final de la prueba de almacenamiento, mostrando su bueno y regular estado de textura. El pH del queso con probióticos presenta mayor acidez, su presencia podría representar una mayor actividad metabólica en el queso. Este comportamiento se refleja en la textura del producto que se presenta blanda.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

1. Se ha logrado inhibir las bacterias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, gracias a la acción de las bacterias probióticas y su capacidad de producir sustancias antibacterianas. En el tratamiento que contiene la combinación de las bacterias probióticas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis* (T3), se obtuvo mejores resultados, ya que se han inhibido ambas bacterias. Y las bacterias probióticas: *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis* se mantienen viables en el queso tipo paria durante los 28 días con niveles promedio de 10^7 UFC/g y 10^6 respectivamente.
2. El uso de las bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* y *Lactococcus lactis* para la producción de queso tipo paria ha logrado mejorar al producto en sus características fisicoquímicas como la proteína en 21.40 % y características sensoriales durante el tiempo de evaluación, especialmente en el sabor en el queso con la combinación de probióticos (T3). Esta particularidad es atribuida a la acción de las bacterias probióticas sobre la proteína de la leche.

5.2. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de la viabilidad del microorganismo *Lactobacillus acidophilus* en quesos frescos modificando condiciones que permita extender el tiempo de vida útil del producto como el envasado al vacío y la producción sin adición de cultivos iniciadores.
- Investigar la capacidad de microorganismos probióticos, tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium lactis*, solos y en cultivos mixtos, para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *Escherichia coli*.
- Estudiar el comportamiento del microorganismo *Lactobacillus acidophilus* en la producción de queso, cuando este sea adicionado como cultivo asociado con otros probióticos.
- Aplicar la tecnología del uso de cultivos probióticos en otros tipos de productos lácteos, como por ejemplo helados de crema, quesos maduros, queso crema, o también embutidos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). 1990. Métodos de Análisis Oficial. Washington D. C.
- ALAIS, CH. 2005. Ciencia de la leche: Principios de la técnica lechera. 2ª Ed. Barcelona, España. Reverté. 873p.
- ALEJO, F. y MORALES, L., 1997. Manual de análisis de alimentos. Universidad Nacional San Agustín. Facultad de Ciencias Naturales y Formales. Arequipa – Perú.
- ANURADHA, S. Y RAJESHWARI, K. 2005. Probiotics in health and disease. Journal, Indian Academy of Clinical Medicine. 6(1): 67-72.
- BARBERÁ J. y MARCOS A., 2008, “Alimentos funcionales. Aproximación a una nueva alimentación”, Dirección General de Salud Pública y Alimentación, Madrid, España, pp. 3, 12, 28, 32-34, 38, 42-44, 49, 78, 79, 90-102, 130-154.
- BASCH E., COSTA D., DIXON R., HOLLENSTEIN J., WILLIAMS C., SOLLARS D., ULBRICHT C., VORA M., WENDT L., WEISSNER W., ZELEDÓN M., 2008, “Lactobacillus acidophilus”, www.nlm.nih.gov. (Mayo, 2009)
- BEDOLLA S., DUEÑAS C., ESQUIVEL I., FAVELA T., GUERRERO R., MENDOZA E., NAVARRETE A., OLGUÍN L., ORTIZ J., PACHECO O., QUIROZ M., RAMÍREZ A., 2004, “Introducción a la tecnología de alimentos”, Segunda edición, Editorial Limusa, México, D.F., México, pp. 34-37.

BRATMAN S., GLICKMAN R., HARKNESS R., KROLL D., 2009, "Acidófilos y otros probióticos", www.swedish.org. (Mayo de 2009)

BYLUND G., 2003, "Manual de industrias lácteas", Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 18, 30, 56

CABEZA E., 2006, "Bacterias ácido lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica", enalcahe.googlepages.com. (Enero de 2009)

CASTILLO R. y MESTRES J., 2004, "Productos lácteos: tecnología", Ediciones UPC, Barcelona, España, pp. 95-96, 98, 101-102, 141-145, 150-151, 158-168.

CHAMORRO C. y LOZADA M., 2002, "El análisis sensorial de los quesos", AMV Ediciones, Madrid, España, pp. 29-32.

CHAMPAGNE, C.Y GARDNER, N. 2005. Challenges in the addition of probiotics cultures to foods. *Critical Reviews in Foods Science and Nutrition*. 45: 61-84.

CHUKEATIROTE, E. 2003. Potential use of probiotics. *Songklanakarin. Journal of Food. Science and Technology*. 25(2): 275-282.

CRITTENDEN, R., 2002. *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* F19: Survival, Ecology and Safety in the Human Intestinal Tract - A Survey of Feeding Studies within the PROBDEMO Project. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 14(1):22-26

DERMICI, Y. Y HEMME, D., 1994. "Growth of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from French raw milk cheeses in a reference milk". *Milchwissenschaft* 49, 483-485.

DINAKAR, P. Y MISTRY, V.V. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*. 77(10):2854-2864.

DOLZ M., 2008, "Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE", *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, 28(3):20.

DUBACH, J. 1998. "El ABC de la quesería rural de los Andes". Proyecto quesería rural del Ecuador. Quito – Ecuador.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE (EBI), 2005, "Bacteria Genomes - *Lactobacillus acidophilus*", www.ebi.ac.uk. (Mayo de 2009)

FERNÁNDEZ, E. E. (2000). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México pp. 105-110.

FRAZIER W., 1976, "Microbiología de los alimentos", segunda edición, Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 57, 58, 60-62.

GARASSINI L., 1964, "Microbiología tecnológica", Imprenta Universitaria, Caracas, Venezuela, pp. 171, 176, 181-189, 230-233, 236, 243.

GARDINER, G., 1998. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(6): 2192-2199.

GOKTEPE I., JUNEJA V., AHMEDNA M., 2005, "Probiotics in food safety and human health", CRC Press, Florida, Estados Unidos, pp. 85, 96, 120.

GONZÁLEZ, GÓMEZ M., JIMÉNEZ Z., 2003, "Bacteriocinas de probióticos", *Revista Salud Pública y Nutrición*, 4 (2), 17.

HERNÁNDEZ H., 2006, "Productos lácteos funcionales", *Carnilac*, 21 (1), 10.

HUI Y., 2007, "Handbook of Food Products Manufacturing", Wiley-Interscience, New Jersey, Estados Unidos, pp. 438, 960-966, 986.

INDA A., 2000, "Optimización de rendimiento y aseguramiento de Inocuidad en la industria de la quesería", biblioteca.mty.itesm.mx. (Septiembre de 2008)

JONES F., 1999, "Lactobacillus Acidophilus", www.bact.wisc.edu. (Mayo de 2009)

LABUZA, T. 1994. "Determinación de la vida en anaquel de alimentos mediante pruebas aceleradas".

LAZO N., MACO M., MATOS Z., MAGUIÑA Y., 2007, "Efecto protector del Lactobacillus acidophilus en gastritis erosiva inducida por indometacina en ratones", CIMEL, 12 (2), 76.

LIONG, M.T. Y SHAH, N.P. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. Journal of Dairy Science. 88(1): 55-66.

LOCASCIO M., ALESSO R., MORATA V., GONZÁLEZ S., 2002, "Recuento diferencial de microorganismos Lactobacillus casei y lactobacillus acidophilus a partir de productos lácteos secos" Información Tecnológica, 13 (1), 97.

LÓPEZ A., GARCÍA M., QUINTERO R., 2002, "Biotecnología Alimentaria", Editorial Limusa, México, México, pp. 165, 176.

LUQUET F., 1993, "Leche y productos lácteos vaca-oveja-cabra 2. Los productos lácteos Transformación y tecnologías", Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, pp. 65-87, 89-100, 473-482, 497-507.

MARTEGANI H., 2006, “Elaboración general de quesos”, www.portalechero.com, (Marzo de 2009).

MAYO, B. Y BELÉN, A., 2004. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (CSIC). “Técnicas microbiológicas novedosas para caracterizar productos fermentados tradicionales”. Villaviciosa. Asturias – España.

MEJÍA L., 2001, “Obtención de cepas de Lactobacilos. Su caracterización (invitro) como potenciales prebióticas”, Tesis Previa a la Obtención del título de Magister Scientiae en Biotecnología de Microorganismos, Universidad de los Andes, Mérida-Venezuela.

MENDOZA L, 2007, “Proceso de elaboración de yogur batido”, www.textoscientificos.com/alimentos/yogur. (Enero de 2009)

MIERAU, I., LEIJ, P., VAN SWAM, I., BLOMMESTEIN, B., F ORIS, E., MOND, J., SMID, E.J. 2005. Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin- controlled gene expression system NICE: The case of lysostaphin. *Microb. Cell Fact.* 4: 15

NORMA TÉCNICA PERUANA, 2004. Leche, Productos Lácteos y sus Características NTP 202.195. Perú.

NUÑEZ, C., 1996. “Determinación de vida en anaquel de productos alimenticios mediante pruebas aceleradas”. Lima - Perú.

ORDÓÑEZ J., 1998, “Tecnología de los alimentos Volumen II Alimentos de origen animal”, Editorial Síntesis, Madrid, España, pp. 16-61, 114-120.

ORIA, R. 1991. "Ciencia y Tecnología de la Leche". Editorial Acribia S.A. Zaragoza – España.

OUWEHAND, A. 1998. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. In: S Salminen and S. Von Wright. Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. Segunda edición. Marcel Dekke Inc. 617 pp.

OUWEHAND, A. C. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: Lactic Acid Bacteria, Salminen, S. y Von Wrigt A. (Eds). Marcel Dekker, Nueva York pp. 139-154.

PARDO E. Y ALMANZA F., 2003, "Guía de procesos para la elaboración de productos lácteos", Siglo del Hombre Editores S.A., Bogotá, Colombia, pp.14-17

PARENTE E. HILL C. 1992. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. Journal of Applied Bacteriology. 73: 290-298

PIARD, J. C. Y DESMAZEUD, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. Lait 72:113-142.

PRATER M., 2009, "Lactobacillus Acidophilus. A Probiotic for Lactose Digestión", nutrition.suite101.com. (Mayo 2009)

PRESCOTT S. y DUNA C., 1959, "Microbiología industrial", tercera edición, McGraw Hill, Madrid, España, pp. 319-321, 324, 325, 416-421.

RODRÍGUEZ I., SALDAÑA E., GARCÍA B., REGALADO C, 1994, “Sobrevivencia de dos bacterias probióticas en dos quesos frescos mexicanos deslactosados: panela y Oaxaca”, www.uaq.mx. (Mayo de 2009)

ROSS, R.P., 2002. Cheese delivering biocultures probiotic cheese. *Aust. J. Dairy Technology*, 57: 71-78.

ROY, D. 2005. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Lait* .85: 39–56.

SALMINEN, S Y OUWEHAND, A. 2002. Probiotics, applications in dairy products. In: Roginski, H., Fuquay, J and Fox, P. *Encyclopedia of dairy Science*. Elsevier. Londres. pp 2315-2322.

SANZ, Y., COLLADO, M.C., DALMAU, J.2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta pediátrica Española*. 61(9):476-482.

SHAH, N.P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 83(4):894-907.

STANTON, C., 1998. Probiotic cheese. *International Dairy J.*, 8: 491-496.

THATCHER, F. y CLARK, G., 1998. *Microbiología de los Alimentos*. 2da Edición Editorial Acribia, Zaragoza España.

UREÑA y ARRIGO, 1999. *Evaluación sensorial de los alimentos*. UNALM. Lima-Perú.

- URTEAGA, C. 2003. Guías alimentarias para la población chilena. In: Manual de Alimentación y Nutrición Humana. Departamento de nutrición. Facultad de medicina. Universidad de Chile. pp 26-27.
- VALBUENA, E.; BARREIRO, J.; SÁNCHEZ, E.; CASTRO, G.; BRIÑEZ, W.; TOVAR, A.; 2005. Modelos cinéticos aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis subsp. lactis* en leche, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
- VEISSEYRE, R. 1980. "Lactología técnica" 2ª edición. Editorial Acribia S.A. España.
- VERDU, E., 2004. *Lactobacillus paracasei* normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology*. (3):826-837.
- VUYST, L. 2000. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*. 38(2):105-112.
- WILDMAN R., 2006, "Handbook of nutraceuticals and functional foods", segunda edición, CRC Press, Florida, Estados Unidos, pp. 335-337.
- YANG, Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties University of Helsinki. Department of Food Technology pp. 9-13.
- ZAMORRA-RODRIGUEZ, L.M. 2003. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagónicas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Tesis doctoral. Universidad de Girona, España. 259 pp.

ZAMUDIO K. y ZAVALETA A., 2003, "Estudio del potencial probiótico de Lactobacilos aislados de fuentes naturales", Ciencia e Investigación, Barcelona, España.





VII. ANEXOS

ANEXO 1. CALIDAD DE LA LECHE**ANEXO 1A: CONTROL DE CALIDAD Y MICROBIOLÓGICO DE LECHE ENTERA****TABLA 6.1: CONTROL DE CALIDAD INICIAL DE LA LECHE ENTERA CON**

Muestra	Acidez (% ac. lactico)	pH	Densidad	Grasa
1	0.17	6.67	1.03	3.40
2	0.17	6.66	1.03	3.60
3	0.17	6.65	1.03	3.60
4	0.16	6.63	1.03	3.40
5	0.17	6.75	1.03	3.50
6	0.18	6.64	1.03	3.50
7	0.16	6.65	1.03	3.50
8	0.17	6.65	1.03	3.60
9	0.16	6.65	1.03	3.40
PROMEDIO	0.17	6.66	1.03	3.50

QUE SE PROCESÓ EL QUESO TIPO PARIA**Tabla 6.2: PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS DE LA LECHE**

PARÁMETRO	VALORES*	REQUISITO**
Densidad A 20°C (g/ml)	1.0322	1.0296 - 1.0340
pH	6.67	6.40 - 6.80
Acidez titulable (°D)	16.7	0.14 – 0.18
Grasa	3.5	Min 3.00

* Promedio en tres repeticiones que se muestran en el Anexo 1A de la tabla N° 6.1

** Referencia tomada de la norma NTP 202.195 (2004). de requisitos para la leche cruda.

Tabla 6.3: RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE REDUCCIÓN DEL AZUL DE METILENO (TRAM) EN LOS ENSAYOS

Ensayo	TRAM* (horas)	calificación	Contenido aproximado de aerobios mesófilos (UFC/ml)++
1	3.5	Bueno	$2 \times 10^5 - 7 \times 10^6$
2	4.5	Bueno	$2 \times 10^5 - 7 \times 10^6$
3	4.5	Bueno	$2 \times 10^5 - 7 \times 10^5$
Mínimo requisito**	>2	Bueno	$< 5 \times 10^5$

* Promedio de los resultados de las pruebas

** Referencia tomada de la norma NTP 202.195 (2004). de requisitos para la leche cruda.

ANEXO 2: EFECTO DE LOS MICROORGANISMOS PROBIOTICOS EN LOS PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

ANEXO 2A: ANVAs PARA MICROORGANISMOS EN EL QUESO

TABLA 6.4: ANVA PARA *LISTERIA MONOCYTOGENES* (LOG UFC/GR)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Signif.
EFFECTOS PRINCIPALES						
A:Tratamientos(Quesos)	148.089	3	49.3631	79832.48	0.0000	*
B:Tiempo (días)	106.89	4	26.7226	43217.09	0.0000	*
INTERACCIONES						
AB	42.2606	12	3.52172	5695.50	0.0000	*
RESIDUOS	0.0247333	40	0.000618333			
TOTAL (CORREGIDO)	297.265	59				

TABLA 6.5: PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS DE TUKEY PARA *LISTERIA MONOCYTOGENES* (UFC/GR) POR TRATAMIENTOS

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamientos (Quesos)	Casos	PUNTAJE PROMEDIO	ALS(T)	Tukey (P≤0.05)
T0	15	4.09533	0.00642045	a
T1	15	3.30067	0.00642045	b
T2	15	3.23133	0.00642045	c
T3	15	0	0.00642045	d

TABLA 6.6: ANVA PARA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* LOG (UFC/GR)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Signif.
EFFECTOS PRINCIPALES						
A:Tratamiento (Quesos)	135.663	3	45.2209	15913.50	0.0000	*
B:Tiempo (días)	6.96462	4	1.74116	612.72	0.0000	*
INTERACCIONES						
AB	35.5211	12	2.96009	1041.67	0.0000	*
RESIDUOS	0.113667	40	0.00284167			
TOTAL (CORREGIDO)	178.262	59				

TABLA 6.7: PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS DE TUKEY PARA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (UFC/GR) POR TRATAMIENTOS

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamientos (Quesos)	Casos	PUNTAJE PROMEDIO	ALS(T)	Tukey (P≤0.05)
T0	15	5.318	0.0137639	a
T1	15	4.30333	0.0137639	b
T2	15	4.03467	0.0137639	c
T3	15	1.26	0.0137639	d

TABLA 6.8: ANVA PARA SALMONELLA SP. LOG (UFC/GR)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>Signif.</i>
EFFECTOS PRINCIPALES						
A:Tratamiento (Quesos)	78.4191	3	26.1397	13590.83	0.0000	*
B:Tiempo (días)	132.315	4	33.0788	17198.69	0.0000	*
INTERACCIONES						
AB	38.3804	12	3.19836	1662.93	0.0000	*
RESIDUOS	0.0769333	40	0.00192333			
TOTAL (CORREGIDO)	249.192	59				

TABLA 6.9: PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS DE TUKEY PARA SALMONELLA SP. (UFC/GR) POR TRATAMIENTOS

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamientos (Quesos)	Casos	PUNTAJE PROMEDIO	ALS(T)	Tukey (P≤0.05)
T0	15	4.35733	0.0113235	a
T1	15	3.02733	0.0113235	b
T2	15	2.86867	0.0113235	c
T3	15	1.14	0.0113235	d

TABLA 6.10: ANVA para Coliformes (NMP)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>Signif.</i>
EFFECTOS PRINCIPALES						
A:Tratamiento (Quesos)	5167.65	3	1722.55	140.62	0.0000	*
B:Tiempo (días)	331.733	4	82.9333	6.77	0.0003	*
INTERACCIONES						
AB	2631.6	12	219.3	17.90	0.0000	*
RESIDUOS	490.0	40	12.25			
TOTAL (CORREGIDO)	8620.98	59				

TABLA 6.11: PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS DE TUKEY PARA COLIFORMES (UFC/GR) POR TRATAMIENTOS

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamientos (Quesos)	Casos	PUNTAJE PROMEDIO	ALS(T)	Tukey ($P \leq 0.05$)
T0	15	24.8667	0.903696	a
T1	15	7.66667	0.903696	b
T2	15	3.66667	0.903696	c
T3	15	1.06667	0.903696	d

ANEXO 3: ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS PROBIOTICOS

ANEXO 3A: VIABILIDAD DE LAS BACTERIAS PROBIOTICAS

TABLA 6.12: ANVA PARA LAS CEPAS PROBIOTICAS (Log UFC/gr)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Signif.
EFFECTOS PRINCIPALES						
A: Tratamiento (Quesos)	28.7224	3	9.57414	28866.77	0.0000	*
B: Tiempo (días)	19.5634	4	4.89084	14746.26	0.0000	*
INTERACCIONES						
AB	4.08192	12	0.34016	1025.61	0.0000	*
RESIDUOS	0.0132667	40	0.00033167			
TOTAL (CORREGIDO)	52.381	59				

TABLA 6.13: PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS DE TUKEY PARA LAS BACTERIAS PROBIOTICAS (UFC/GR) POR TRATAMIENTOS

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamientos (Quesos)	Casos	PUNTAJE PROMEDIO	ALS(T)	Tukey (P≤0.05)
T3 (<i>Lb. Acidophilus</i>)	15	7.76533	0.00470225	a
T3 (<i>Lactococcus lactis</i>)	15	6.89	0.00470225	b
T2 (<i>Lb. Acidophilus</i>)	15	6.24067	0.00470225	c
T1 (<i>Lactococcus lactis</i>)	15	5.96933	0.00470225	d

ANEXO 4: ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS QUESOS TIPO PARIÁ

ANEXO 4A: ANÁLISIS SENSORIAL EN CADA ATRIBUTO

TABLA 6.14: ANVA PARA LA APARIENCIA GENERAL

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Signif.
EFFECTOS PRINCIPALES						
A:Tratamientos (Quesos)	40.0667	3	13.3556	51.94	0.0000	*
B:Tiempo (días)	43.5133	4	10.8783	42.30	0.0000	*
INTERACCIONES						
AB	4.16667	12	0.347222	1.35	0.1898	n.s.
RESIDUOS	72.0	280	0.257143			
TOTAL (CORREGIDO)	159.747	299				

TABLA 6.15: PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS DE TUKEY PARA APARIENCIA GENERAL

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamientos (Quesos)	Casos	PUNTAJE PROMEDIO	ALS(T)	Tukey ($P \leq 0.05$)
T3	75	4.45333	0.058554	a
T2	75	3.93333	0.058554	b
T1	75	3.84	0.058554	b
T0	75	3.42667	0.058554	c

TABLA 6.16: ANVA DE EVALUACIÓN SENSORIAL DEL COLOR

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Signif.
EFFECTOS PRINCIPALES						
A:Tratamientos (Quesos)	54.72	3	18.24	90.77	0.0000	*
B:Tiempo (días)	43.7333	4	10.9333	54.41	0.0000	*
INTERACCIONES						
AB	3.94667	12	0.328889	1.64	0.0812	n.s.
RESIDUOS	56.2667	280	0.200952			
TOTAL (CORREGIDO)	158.667	299				

TABLA 6.17: PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS DE TUKEY PARA EL COLOR

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamientos (Quesos)	Casos	PUNTAJE PROMEDIO	ALS(T)	Tukey ($P \leq 0.05$)
T3	75	4.54667	0.0517626	a
T2	75	3.98667	0.0517626	b
T1	75	3.85333	0.0517626	b
T0	75	3.34667	0.0517626	c

TABLA 6.18: ANVA DE EVALUACIÓN SENSORIAL DEL SABOR

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>Signif.</i>
EFFECTOS PRINCIPALES						
A:Tratamientos (Quesos)	72.7467	3	24.2489	117.06	0.0000	*
B:Tiempo (días)	50.8333	4	12.7083	61.35	0.0000	*
INTERACCIONES						
AB	6.42	12	0.535	2.58	0.0029	*
RESIDUOS	58.0	280	0.207143			
TOTAL (CORREGIDO)	188.0	299				

TABLA 6.19: PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS DE TUKEY PARA EL SABOR

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamientos (Quesos)	Casos	PUNTAJE PROMEDIO	ALS(T)	Tukey (P≤0.05)
T3	75	4.66667	0.0525538	a
T2	75	4.08	0.0525538	b
T1	75	3.97333	0.0525538	b
T0	75	3.28	0.0525538	c

TABLA 6.20: ANVA DE EVALUACIÓN SENSORIAL DEL AROMA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>Signif.</i>
EFFECTOS PRINCIPALES						
A:Trataminetos (Quesos)	66.0	3	22.0	115.50	0.0000	*
B:Tiempo (días)	40.0467	4	10.0117	52.56	0.0000	*
INTERACCIONES						
AB	10.5667	12	0.880556	4.62	0.0000	*
RESIDUOS	53.3333	280	0.190476			
TOTAL (CORREGIDO)	169.947	299				

TABLA 6.21: PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS DE TUKEY PARA EL AROMA

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamientos (Quesos)	Casos	PUNTAJE PROMEDIO	ALS(T)	Tukey (P≤0.05)
T3	75	4.66667	0.0503953	a
T2	75	4.02667	0.0503953	b
T1	75	3.90667	0.0503953	b
T0	75	3.34667	0.0503953	c

TABLA 6.22: ANVA DE EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA TEXTURA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>Signif.</i>
EFFECTOS PRINCIPALES						
A:Tratamiento (Quesos)	63.2667	3	21.0889	100.20	0.0000	*
B:Tiempo (días)	38.2867	4	9.57167	45.48	0.0000	*
INTERACCIONES						
AB	7.5	12	0.625	2.97	0.0006	*
RESIDUOS	58.9333	280	0.210476			
TOTAL (CORREGIDO)	167.987	299				

TABLA 6.23: PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS DE TUKEY PARA LA TEXTURA

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamientos (Quesos)	Casos	PUNTAJE PROMEDIO	ALS(T)	Tukey (P≤0.05)
T3	75	4.65333	0.052975	a
T2	75	4.06667	0.052975	b
T1	75	3.94667	0.052975	b
T0	75	3.36	0.052975	c



TARJETA DE EVALUACIÓN SENSORIAL

Nombre: _____

Fecha: _____ **Edad:** _____

Observe y deguste las muestras de queso tipo paria probiótico marcadas con claves en los mismos, siga la secuencia de cada atributo a calificar en el orden establecido. Los atributos serán calificados de acuerdo a su opinión basándose en la escala de calificación:

- ☒ Muy bueno (5ptos),
- ☒ Bueno (4ptos),
- ☒ Regular (3ptos),
- ☒ Malo (2ptos),
- ☒ Muy malo (1pto)

ATRIBUTOS/ CÓDIGO	T0	T1	T3	T2
1. APARIENCIA GENERAL (buena presentación)				
2. COLOR (amarrillo marfil)				
3. SABOR (agradable)				
4. AROMA (sui géneris)				
5. TEXTURA (pasta firme, sin ojos y/o ojos)				

Comentario:.....

Muchas gracias

FICHAS TECNICAS DE LAS BACTERIAS PROBIOTICAS

CHH HANSEN

F-DVS ABY-3 - Probio-Tec™

Información de Producto

Descripción	<p>Cultivo Lacteo Termófilo</p> <p>El cultivo contiene las cepas <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5™. Las cepas probióticas en este cultivo tienen una larga historia de uso seguro. ABY-3 está envasado en forma de gránulos congelados.</p>				
Aplicación	<p>El cultivo producirá una leche fermentada con una alta viscosidad y un sabor medio-trazo y bajo post-acidificación. ABY-3 es muy adecuada para la elaboración de los siguientes tipos de leches fermentadas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fina • Batido • Líquido 				
Envasado	<table border="0"> <tr> <td>Tamaño de envase</td> <td>Número de productos</td> </tr> <tr> <td>500 g cartón</td> <td>666090</td> </tr> </table>	Tamaño de envase	Número de productos	500 g cartón	666090
Tamaño de envase	Número de productos				
500 g cartón	666090				
Disponibilidad:	<p>Los siguientes cultivos probióticos ABY están disponibles:</p> <p>ABY-1: Liofilizados DVS</p> <p>ABY-2 y ABY-3: Congelados y liofilizados DVS</p>				
Almacenamiento y caducidad	<p>Los cultivos congelados deben ser almacenados a -45°C (-49°F) o temperatura inferior. Si los cultivos son almacenados a -45°C (-49°F) o menor, la caducidad será de 12 meses como mínimo.</p>				
Modo de empleo	<p>Retire los cultivos del congelador justo antes de su utilización. NO DESCONGELAR. Limpie la parte superior del cartón con cloro. Abra el cartón y añada los gránulos congelados directamente al producto pasteurizado mientras se agita lentamente. Agitar la mezcla durante 10-15 minutos hasta distribuir totalmente.</p>				
Dosis	<p>Dosis recomendada de cultivos congelados DVS en gramos:</p>				

No. de cartones de 500 g	Cantidad de leche a inocular	Tasa de inoculación
2	5.000 litros	0.02%
1	5.000 litros	0.01%

El beneficio completo de la inoculación con 0.02%, sobre la velocidad de acidificación es obtenida a la temperatura de fermentación de 43°C. Para obtener el recuento de células BB-12 y LA-5 como se indican en el catálogo técnico Nutrilab, la dosis mínima necesaria debe ser de 0.02%.

2216207-3-Cong-FDagado-2003 (1) 2

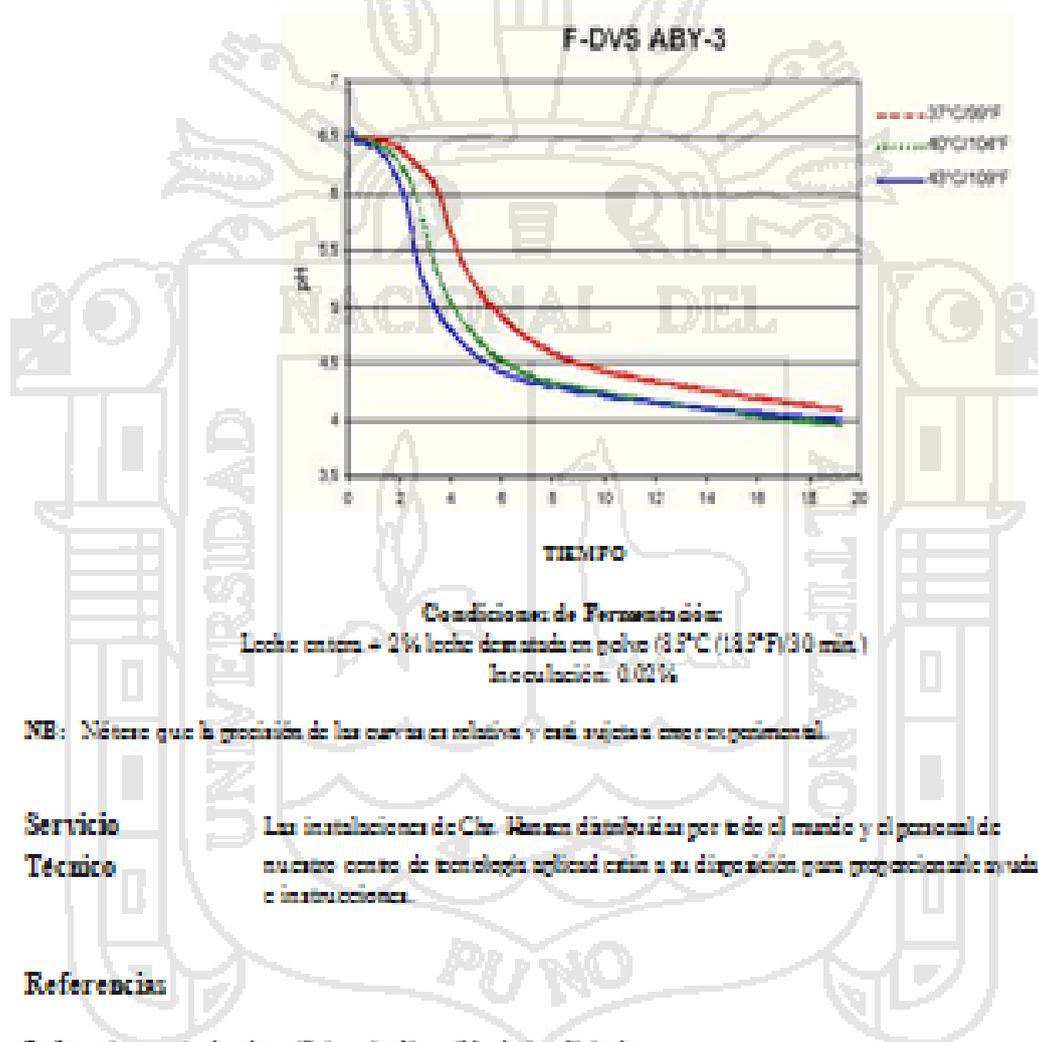
Chr. Hansen, S.A. - Piquiza, 10 - 22100 Trujillo - Perú. Tel: +51 01 226 00 20 Fax: +51 01 226 00 21 - Web: chrhansen.com

CHR. HANSEN

Certificado Kosher: ABY-3 es un cultivo con aprobación Kosher (Círculo K. D) para ser utilizado durante todo el año, excepto en Pascua Judía.

Información Técnica

Figura 1. El efecto de la temperatura sobre la acidificación



NE: Nótese que la precisión de las curvas es relativa y está sujeta a error experimental.

Servicio Técnico Las instalaciones de Chr. Hansen distribuidas por todo el mundo y el personal de nuestro centro de tecnología aplican su experiencia para proporcionar ayuda e instrucciones.

Referencias Referencias y métodos de análisis están disponibles bajo solicitud.

La información anteriormente mencionada se ofrece exclusivamente a título informativo. Chr. Hansen declina toda responsabilidad por las pérdidas o daños que pudieran derivarse de la aplicación en la práctica de la información facilitada.

EN-ABY-3 - Certificado-PI-0303

2017-DVS ABY-31 Agente-0001-02

CHR. HANSEN

FD-DVS pHageControl™ R-700

Serie de Cultivos

Información de Producto

Descripción

Cultivos homofermentativos mesófilos, tipo O.

El sistema de cultivos pHage control de Chr. Hansen proporciona cepas definidas resistentes a fagos para su uso directo DVS (directos a cuba).

Estos cultivos contienen cepas especiales de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* seleccionados por su resistencia a fagos y su capacidad para producir ácido láctico rápidamente y no producir CO₂. Los cultivos pHage control son envasados en forma de producto en polvo liofilizado.

Aplicación

El cultivo es utilizado principalmente en la producción de quesos con una textura cerrada p.e. queso Cheddar, Feta y Cottage. El cultivo puede ser aplicado en otros productos lácteos, combinados o no con otros cultivos lácteos.

Disponibilidad

La serie pHage Control incluye los siguientes cultivos: R-703, R-704, R-707 y R-708

Envases

	N° de producto 10 x 50U	N° de producto 25 x 200U	N° de producto 30 x 500U	N° de producto 10 x 1000U
R-703	100093	100121	100136	
R-704	100096	100123	100137	100200
R-707	100097	100124	100138	100201
R-708	100098	100125	100139	

Almacenamiento y caducidad:

Los cultivos liofilizados deben ser almacenados a -18°C (0°F) o menos. Si los cultivos se almacenan a esta temperatura o inferior, la caducidad es de como mínimo 24 meses. Si los cultivos se almacenan a +5°C (41°F) la caducidad es de como mínimo 6 semanas.

Modo de empleo

Sacar los cultivos del congelador justo antes de su utilización. **NO DESCONGELAR.**

Limpia la parte superior del sobre con cloro. Abre el sobre y añada los gránulos liofilizados directamente al producto pasteurizado mientras se agita lentamente.

Agitar la mezcla durante 10-15 minutos hasta distribuir totalmente.

CHR. HANSEN
Dosis

La dosis recomendada de utilización de los cultivos DVS hofilizado en unidades para litros.

Porcentaje DVS de inoculación	Cantidad de leche a inocular			
	1,000 l	5,000 l	10,000 l	15,000 l
1000U/5000 l	200U	1000U	2000U	3000U
500U/5000 l	100U	500U	1000U	1500U
250U/5000 l	50U	250U	500U	

Como regla principal 1000U de cultivo hofilizado DVS corresponde a 100 l de cultivo activo de lactofermentador. Sin embargo, la dosis de utilización específicas deben ser determinadas experimentalmente antes de cada nueva aplicación.

Temperatura de incubación

La dosis de este sistema de cultivos está adaptada a la producción individual de cada. Por favor, contacte con su oficina local de Chr. Hansen para más información.

Certificado Kosher

Los cultivos pHageControl son cultivos con aprobación Kosher (Circulo K.D) para ser utilizados durante todo el año, excepto en Pascua Judía.

Información Técnica

- Producción de aroma y gas

	K-703	K-704	K-707	K-708
Aroma	-	-	-	-
Gas				

- Sensibilidad a la sal

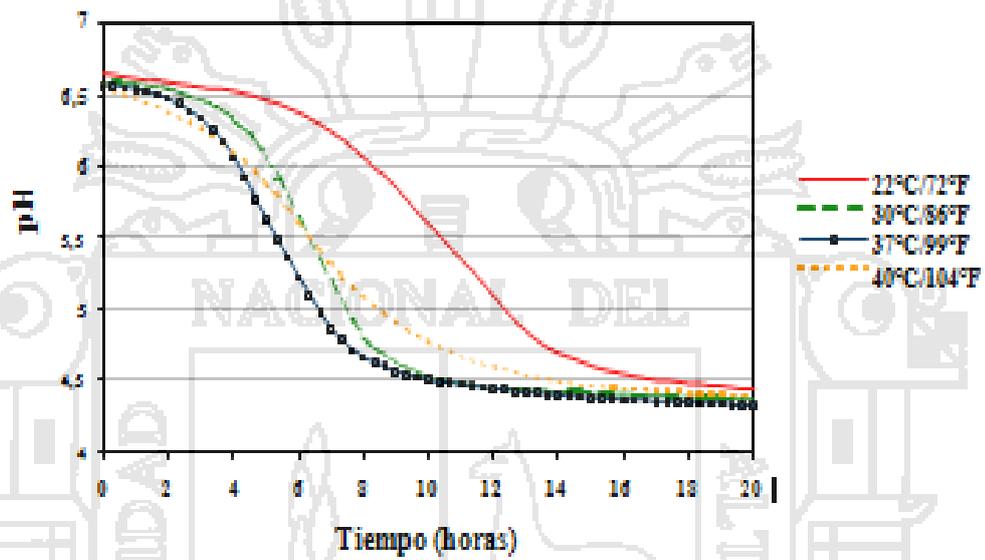
	K-703	K-704	K-707	K-708
	5.0% NaCl	5.5% NaCl	5.5% NaCl	5.7% NaCl
Inhibición	>=6.0% NaCl	>=6.0% NaCl	>=5.5% NaCl	>=6.0% NaCl



Figuras 1-4. El efecto de la temperatura sobre la acidificación.

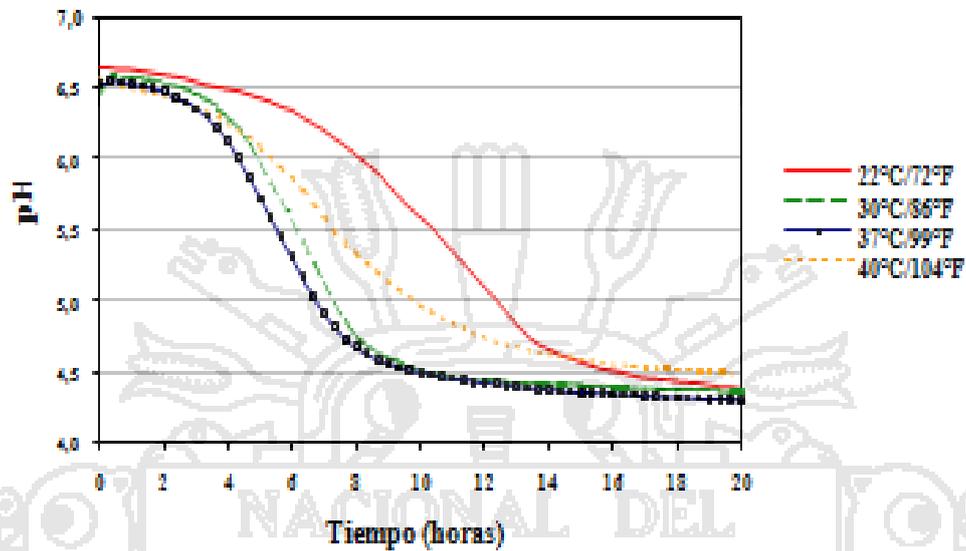
Condiciones de Fermentación:
 Leche de lab 9.5% M.S.: 140°C/8 seg. - 100°C/30 min
 500U/5000 l inoculación

FD-DVS R-703

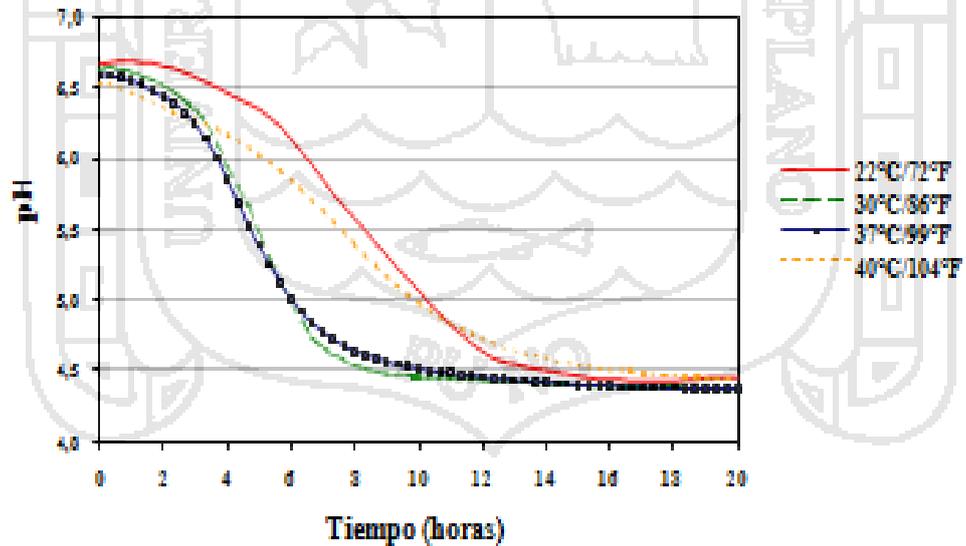


CHR. HANSEN

FD-DVSR-704

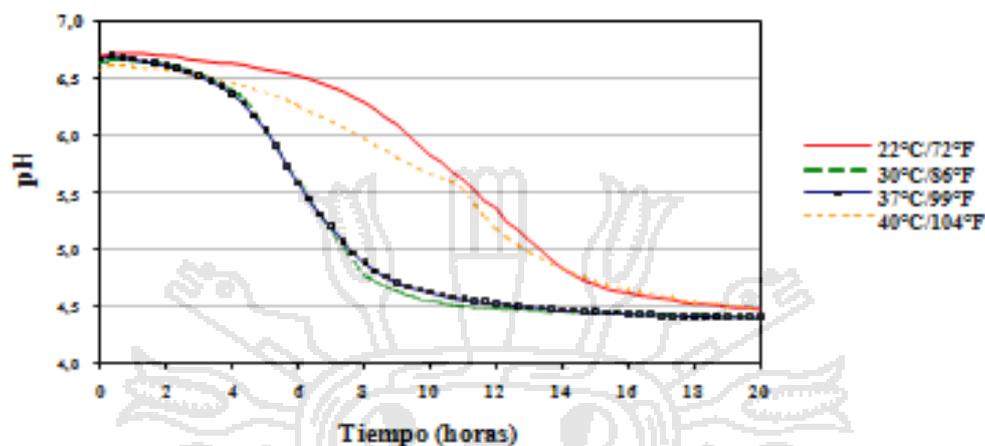


FD-DVSR-707



CHR HANSEN

FD-DVS R-708



NB: Nótese que la precisión de las curvas es relativa y está sujeta a error experimental

Servicio Técnico

Las instalaciones de Chr. Hansen distribuidas por todo el mundo y el personal de nuestro centro de tecnología aplicada están a su disposición para proporcionarle ayuda e instrucciones.

Referencias

Referencias y métodos de análisis están disponibles bajo solicitud.

La información anteriormente mencionada se ofrece exclusivamente a título informativo. Chr. Hansen declina toda responsabilidad por las pérdidas o daños que pudieran derivarse de la aplicación en la práctica de la información facilitada.

ES-pHazeControl-R-700-PI-1001