

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL
CRECIMIENTO DE CULTIVOS INICIADORES DURANTE LA
MADURACIÓN DEL QUESO TIPO EDAM**

TESIS

PRESENTADA POR:

EDHY TEODORO LEON HANCCO

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

PUNO – PERÚ

2014

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

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO DE
CULTIVOS INICIADORES DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO TIPO EDAM**

TESIS

PRESENTADA POR:

EDHY TEODORO LEON HANCCO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE :

Ing. M.Sc. Luis Alberto JIMENEZ MONROY

PRIMER MIEMBRO :

Ing. M.Sc. Genny Isabel LUNA MERCADO

SEGUNDO MIEMBRO :

Ing. M.Sc. Florentino V. CHOQUEHUANCA CÁCERES

DIRECTOR DE TESIS :

Ph.D. Juan Marcos ARO ARO

ASESOR DE TESIS :

Ing. M.Sc. Thomas ANCCO VIZCARRA

ASESOR DE TESIS :

Ing. Marienela CALSIN CUTIMBO

PUNO – PERÚ
2014

Área: Ingeniería y tecnología

Tema: Desarrollo de procesos y productos agroindustriales sostenibles y eficientes

DEDICATORIA



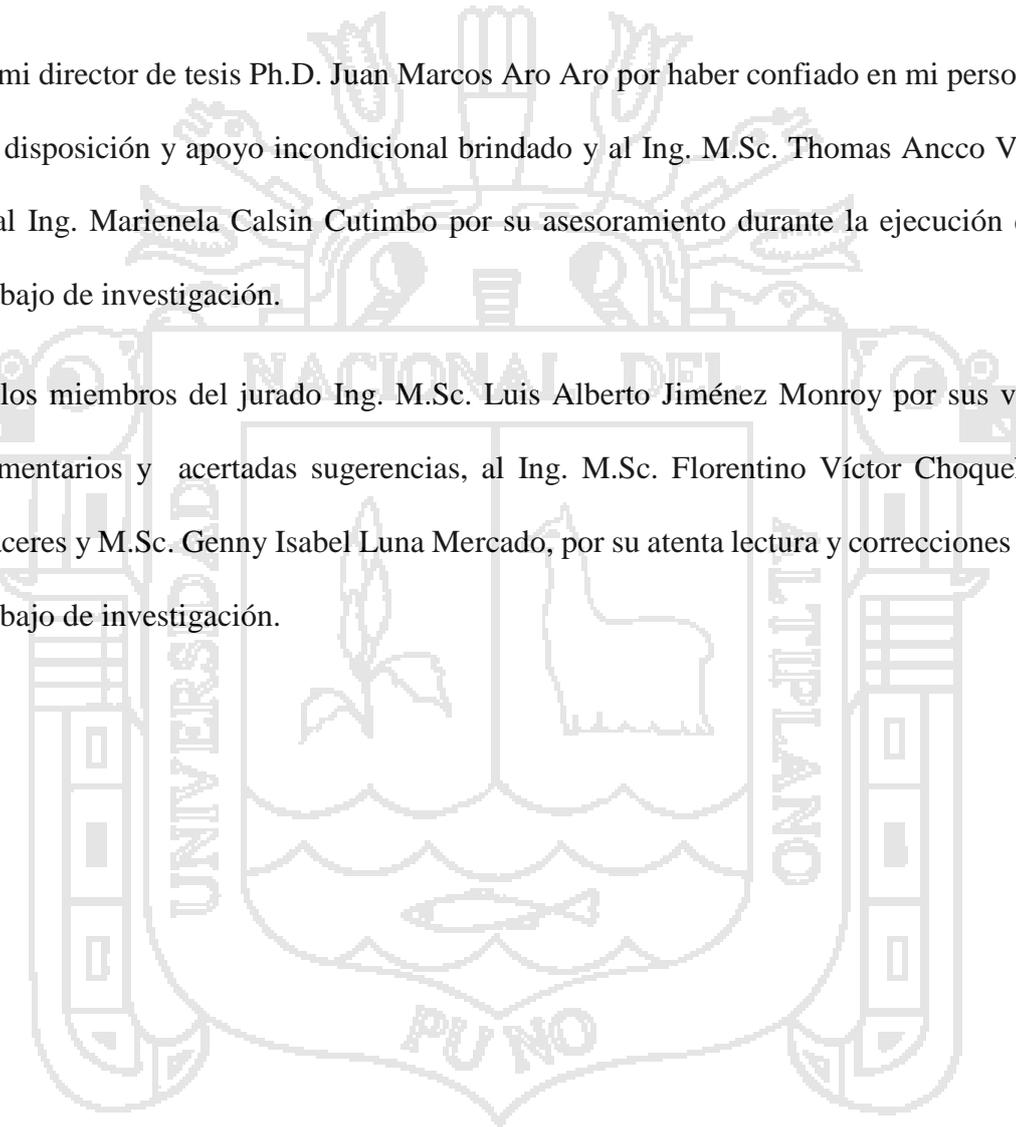
A mi querido padre Nicolás y hermano José con cariño, quienes me brindaron todo su apoyo y confianza. A ellos mi eterna gratitud.

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater la Universidad Nacional del Altiplano, a la Facultad de Ciencias Agrarias y la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial por haberme brindado mi formación profesional.

A mi director de tesis Ph.D. Juan Marcos Aro Aro por haber confiado en mi persona, por su disposición y apoyo incondicional brindado y al Ing. M.Sc. Thomas Ancco Vizcarra y al Ing. Marienela Calsin Cutimbo por su asesoramiento durante la ejecución de este trabajo de investigación.

A los miembros del jurado Ing. M.Sc. Luis Alberto Jiménez Monroy por sus valiosos comentarios y acertadas sugerencias, al Ing. M.Sc. Florentino Víctor Choquehuanca Cáceres y M.Sc. Genny Isabel Luna Mercado, por su atenta lectura y correcciones de este trabajo de investigación.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

ÍNDICE DE SIGLAS

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. LECHE.....	4
2.1.1. Composición química de la leche	4
2.2. QUESO TIPO EDAM.....	4
2.2.1. Maduración de queso Edam.....	5
2.2.2. Factores que influyen en la maduración	5
2.3. CULTIVOS INICIADORES	8
2.3.1. Caracterización de géneros de bacterias acidolácticas (BAL).....	11
2.3.2. Fermentos lácticos para queso tipo Edam.....	11
2.3.2.1. <i>Lactococcus</i>	11
2.3.2.2. <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	13
2.3.2.3. <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	13

2.3.2.4. <i>Streptococcus thermophilus</i>	14
2.4. METABOLISMO DE LAS BACTERIAS	14
2.4.1. Metabolismo de la lactosa y del citrato.....	15
2.4.2. Fermentación láctica	16
2.5. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	17
2.5.1. Parámetros de crecimiento microbiano.....	17
2.5.2. Modelo matemático	19
2.5.3. Clasificación de los modelos microbiológicos	19
2.5.3.1. Modelos primarios.....	19
2.5.3.2. Modelos secundarios	22
2.5.3.3. Validación de los modelos matemáticos	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	29
3.1.1. Materia prima.....	29
3.1.2. Insumos	29
3.1.3. Reactivos.....	29
3.1.4. Medios de cultivo.....	29
3.1.5. Materiales e instrumentos	30
3.1.6. Equipos	31
3.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	31
3.2.1. Preparación de los cultivos iniciadores (RSF-742).....	31

3.2.1.1. Método para análisis microbiológico	32
3.2.2. Determinación de análisis fisicoquímico queso Edam	33
3.2.3. Validación de modelos matemáticos de crecimiento de cultivos iniciadores	35
3.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	37
3.3.1. Descripción del proceso de queso tipo Edam	38
3.3.2. Determinación de parámetros y fisicoquímicos de crecimiento microbiano en queso tipo Edam.....	41
3.4. UNIDADES DE ANÁLISIS Y OBSERVACIONES.....	42
3.4.1. Variables de estudio	42
3.4.2. Variables de respuesta.....	43
3.5. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	43
3.5.1. Análisis de crecimiento de cultivos iniciadores con modelos matemáticos	43
3.5.2. Determinación de Acidez y pH, en la maduración del queso tipo Edam...	45
3.5.3. Validación de los modelos matemáticos Baranyi & Roberts, Gompertz y Logístico	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DEL CRECIMIENTO DE CULTIVOS INICIADORES DURANTE LA MADURACIÓN EN QUESO EDAM CON MODELOS MATEMÁTICOS (Baranyi & Roberts, Gompertz y Logístico)	48
4.1.1. Ajuste de curva con modelo matemático Baranyi & Roberts	54
4.1.2. Ajuste de curva con modelo matemático Gompertz	55

4.1.3. Ajuste de curva con modelo matemático Logístico.....	56
4.2. EVALUACIÓN DE pH y ACIDEZ DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO EDAM.....	57
4.2.1. Evaluación de pH en la maduración del queso Edam.....	57
4.2.2. Evaluación de % ácido láctico del queso Edam.....	61
4.3. VALIDACIÓN DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS (Baranyi & Roberts, Gompertz y Logístico)	65
4.3.1. Modelamiento primario	65
4.3.2. Modelamiento secundario.....	66
4.3.3. Validación de los modelos	66
V. CONCLUSIONES	70
VI. RECOMEDACIONES.....	71
VII. BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXOS.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de la leche de vaca.....	4
Tabla 2: Composición fisicoquímica de queso Edam	5
Tabla 3: Análisis fisicoquímico de queso pasteurizado.....	7
Tabla 4: Microorganismos empleados en fermentaciones lácticas	9
Tabla 5: Caracterización de género de BAL para aspectos tecnológicos de proceso...	12
Tabla 6: Parámetros obtenidos durante la maduración del queso Edam	50
Tabla 7: Parámetros cinéticos de crecimiento de cultivos iniciadores derivados de los modelos predictivos.....	52
Tabla 8: Análisis de varianza (ANOVA) de Tukey para evolución de pH en maduración de queso Edam	59
Tabla 9: Pruebas de comparación múltiple de Tukey para pH por temperatura	60
Tabla 10: Pruebas de comparación múltiple Tukey para pH por tiempo	60
Tabla 11: Análisis de varianza Tukey (ANOVA) para evolución de Acidez en maduración de queso Edam.....	63
Tabla 12: pruebas de comparación múltiple Tukey para acidez por temperatura	64
Tabla 13: Pruebas de comparación múltiple Tukey HSD para acidez por tiempo.....	64
Tabla 14: Velocidad máxima observada y error estándar del ajuste de los datos obtenidos para el crecimiento de cultivos iniciadores en función de la temperatura.....	65
Tabla 15: Valores generados con programa Curve Expert mediante el ajuste de regresión cuadrática.....	66
Tabla 16: Tabla de frecuencias para la validación del modelo generado	67
Tabla 17: Índice matemáticos y estadísticos obtenidos para los modelos de crecimiento de cultivos iniciadores.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Relación de ácido pirúvico o ácido láctico	16
Figura 2: Representación gráfica de la ecuación de Gompertz y sus parámetros cinéticos	21
Figura 3: Diagrama de flujo de elaboración de queso Edam.....	37
Figura 4: Diagrama de flujo para el estudio de UFC/g y fisicoquímico.....	42
Figura 5: Curvas de crecimiento cinético del <i>Lactococcus lactis subs lactis</i> , <i>Lactococcus lactis subs cremoris</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> a 30, 38 y 45 °C, con modelo Baranyi & Roberts.....	54
Figura 6: Curvas de crecimiento cinético del <i>Lactococcus lactis subs lactis</i> , <i>Lactococcus lactis subs cremoris</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> a 30, 38 y 45 °C, con modelo Gompertz.....	55
Figura 7: Curvas de crecimiento cinético del <i>Lactococcus lactis subs lactis</i> , <i>Lactococcus lactis subs cremoris</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> a 30, 38 y 45 °C, con modelo Logístico.....	56
Figura 8: Evolución de pH durante la maduración en queso Edam	58
Figura 9: Evolución de Acidez durante la maduración en queso Eda.....	62

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Predicción de cultivos iniciadores	81
Anexo 2	Valores obtenidos mediante el análisis microbiológico de cultivos iniciadores en leche pasteurizada.....	83
Anexo 3	Valores obtenidos mediante el análisis microbiológico de cultivos iniciadores durante la maduración del queso Edam.....	83
Anexo 4	Cuadro de valores obtenidos mediante el análisis de fisicoquímico en la activación de cultivos iniciadores en leche pasteurizada	84
Anexo 5	Cuadro de valores obtenidos mediante el análisis fisicoquímico de cultivos iniciadores en queso Edam.....	85
Anexo 6	Grafica de la velocidad de crecimiento respecto a temperatura para ajuste de los modelos de cultivos iniciadores para obtener ecuaciones matemáticas generadas	86
Anexo 7	Representación de los valores de velocidad de crecimiento estimados respecto a observados para cultivos iniciadores	87
Anexo 8	Panel fotográfico en el proceso de elaboración de queso Edam.....	88
Anexo 9	Panel fotográfico de análisis microbiológico UFC/ml en leche pasteurizada.....	89
Anexo 10	Panel fotográfico de crecimiento de cultivos iniciadores tiempo 24 horas	90
Anexo 11	Panel fotográfico de crecimiento máximo de la población microbiana	91
Anexo 12	Panel fotográfico de formación de ojos del queso Edam.....	92
Anexo 13	Ficha técnica de cultivo	93

ÍNDICE DE SIGLAS

A	: Logaritmo común de la población inicial en UFC/lm o UFC/gr
ACR	: Sistema de maduración acelerada
ANOVA	: Analysis Of Variance; Análisis de Varianza
A_f	: Factor de exactitud
BAL	: Bacterias ácido lácticas
b	: Pendiente de la curva y la tasa de crecimiento
B_f	: Factor de sesgo
C	: Logaritmo común de la población final en la fase estacionaria
D	: Tiempo en el cual la tasa de crecimiento es de mayor magnitud
CIP	: Centro Internacional de la Papa
CM	: Cuadrados Medios
LS	: Limite de Significancia
MPA	: Microbiología predictiva de alimentos
NTP	: Norma técnica peruana
$RMSE$: Root Mean Square Error; Error cuadrático medio
UFC/ml	: Unidades formadoras de colonia por mililitro
T_g	: Tiempo de generación
	: Fase de adaptación
μ_{max}	: Tasa máxima de crecimiento exponencial

RESUMEN

En este estudio se han evaluado los parámetros de la curva de crecimiento sigmoideal, pH, Acidez y validación de los modelos matemáticos del género *Lactococcus* RSF-742 (CHR HANSEN) a partir de los tratamientos en activación en leche pasteurizada a temperaturas 30, 38 y 45 °C en función de tiempo de la maduración del queso Edam. Los datos de crecimiento de *Lactococcus* fueron ajustados mediante los modelos: Baranyi & Roberts, Gompertz y Logístico lo cual, proporcionó los principales parámetros (A , b , C y D) y parámetros cinéticos (μ , T_g y μ_{max}). La temperatura 30 °C fue el factor que ejerció con los siguientes valores: $A = 5.95$, $b = 0.22$, $C = 8.48$ y $D = 52.82$ y los parámetros cinéticos: $\mu = 48.35$, $T_g = 0.63$ y $\mu_{max} = 0.69$ UFC/g/h. La evolución de pH y acidez fueron evaluadas obteniendo los resultados a temperatura 30 y 38 °C con valores óptimos de pH: 5.92 y 6.05 y Acidez: 0.091 y 0.054. De los tres modelos aplicados a los datos, según la validación matemática, determinados con velocidad máxima de crecimiento exponencial (μ_{max}). Se observó que el modelo Gompertz, fue el que realizó predicciones perfectas con índices de sesgo y exactitud iguales a la unidad ($B_f = A_f = 1.00$) con modelo Baranyi & Roberts fue ($B_f = A_f = 1.01$) y Modelo Logístico ($B_f = 0.99$ y $A_f = 1.00$), considerando como regulares para describir el crecimiento microbiano. Por lo tanto los modelos validados corresponden a Baranyi & Roberts y Gompertz.

I. INTRODUCCIÓN

El departamento de Puno es uno de las regiones con mayor producción ganadera bovina por poseer condiciones favorables para la producción lechera y debido a que en estos últimos años se ha incrementado el uso de cultivos iniciadores en productos lácteos.

En la actualidad las plantas procesadoras lácteos utilizan generalmente bacteria ácido lácticas (BAL) se emplean principalmente como los cultivos iniciadores para la elaboración de productos fermentados como yogur, mantequillas y quesos madurados. Sin embargo es un alimento perecible que se ve afectado por el mal manejo de cultivo iniciadores, dado que no se identifica la activación de estos cultivos en condiciones adecuadas.

Uno de los grupos microbianos más importantes son los responsables de los cambios fisicoquímicos, son las bacterias ácido lácticas, como (*Lactococcus lactis subs lactis*, *Lactococcus lactis subs cremoris* y *Streptococcus thermophilus*). Así pues, es importante conocer el comportamiento de estos microorganismos en función de factores ambientales, intrínsecos (pH, acidez y a_w) y extrínsecos (temperatura), así mismo determinar la capacidad de crecimiento de estos cultivos para multiplicarse en el alimento bajo condiciones asociados a su procesado, conservación, maduración, almacenamiento y distribución.

El continuo progreso de la ciencia y la tecnología implica también el avance en el ámbito de la microbiología de los alimentos. Generalmente los métodos microbiológicos tradicionales sólo son representativos en las condiciones concretas bajo las que la matriz alimentaria es analizada y por tanto tienen un valor limitado para predecir el comportamiento de los microorganismos en condiciones variables. La microbiología predictiva, supera estas limitaciones, surge entonces como una importante herramienta en la industria alimentaria

para determinar el crecimiento de microorganismos patógenos y benéficos y prevenir la alteración de alimentos. Igualmente podría ser de gran ayuda a la hora de controlar el deterioro de los alimentos y estimar el periodo de vida comercial de estos productos. La microbiología predictiva tiene como principal objetivo describir matemáticamente la evolución de microorganismos y permite cuantificar los efectos de las interacciones entre dos o más factores y determinar la interpolación de combinaciones de factores de control que no han sido estudiadas explícitamente. Los modelos matemáticos son la mejor manera de realizar predicciones del crecimiento microbiano bajo estas circunstancias. Una vez utilizado un modelo predictivo es indispensable validar la capacidad de ese modelo para describir con precisión la evolución microbiana en los alimentos frente a condiciones de tratamiento.

Para tal fin se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de cultivos iniciadores (*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* y *Streptococcus thermophilus*) código (RSF-742) y los parámetros cinéticos mediante los modelos matemáticos Baranyi & Robertz, Gompertz y Logístico en queso tipo Edam.
- Evaluar el pH y acidez, durante el crecimiento microbiano en la maduración del queso tipo Edam.
- Validar los modelos matemáticos para el crecimiento microbiano de los cultivos iniciadores (*Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* y *Streptococcus thermophilus*) código (RSF-742) evaluados durante la maduración del queso tipo Edam.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. LECHE

La leche es la secreción de pH (6.5 ~ 6.7) de la glándula mamaria de los mamíferos. Es una emulsión de grasas en agua, estabilizada por una dispersión coloidal de proteínas en una solución de sales, vitaminas, péptidos, lactosa, oligosacáridos, caseína y otras proteínas. Asimismo, contiene enzimas, anticuerpos, hormonas, pigmentos, células, CO₂, O₂ y nitrógeno (Pope, 2005).

2.1.1. Composición química de la leche

La leche está constituida por una mezcla compleja de lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales (Fennema, 2000).

Tabla 1. Composición química de la leche de vaca

Composición	Ramírez, 2005	Veisseyre,1980
Grasa (%)	4.44	3.2 ~3.8
Proteína (%)	3.5	2.9 ~3.6
Lactosa (%)	4.8	4.3 ~4.5
Minerales (%)	0.7	0.7 ~0.8
Extracto seco (%)	13	11.1 ~12.7
Agua (%)	87	89 ~73

2.2. QUESO TIPO EDAM

El Queso Edam, se trata de un Queso de pasta lavada, con alto grado de Mineralización, que presenta una buena flexibilidad cuando es tajado, de gusto suave, que puede presentar pocos ojos ovalados, lisos regularmente distribuidos. Su sabor es más suave que el Gouda (Ramirez, 2005).

Tabla 2. Composición fisicoquímica de queso Edam

Composición	Mucio, 2008	NTP, 2010
Grasa (%)	42~48	40 (min)
Humedad (%)	38 ~ 43	46 (max).
Na Cl (%)	1.3 ~1.7	
Materia seca (%)	58 ~ 62	54 (min)

2.2.1. Maduración de queso Edam

Su maduración requiere un tiempo de 3 a 4 semanas a 12~14 °C, el periodo de maduración de estos quesos depende del contenido de humedad al que se deseen ajustar y oscila entre las dos semanas y los dos meses (Scott, *et al.*, 2002).

En los quesos de mediano a largo periodo de maduración en este caso ocurre:

- Desarrollo de aromas y sabores definidos, típicos de cada variedad de queso.
- Tratamientos especiales de la corteza del queso, en algunos casos mohos, recubrimiento especiales autorizados, etc.
- Formación de ojos, agujeros irregulares, etc.

Los parámetros conviene indicar cuales son las condiciones ideales que deben mantener cámara de maduración: Parámetro; Humedad Relativa, 80~85 %, temperatura; 8~12°C y ventilación media (Ramirez, 2005).

2.2.2. Factores que influyen en la maduración

a) La temperatura.- Factor incidente en la velocidad de maduración, pues afecta la actividad microbiana y enzimático su manejo es tecnológico y según de su valor, le dará preferencia ala determinada actividad bacteriana y enzimática (Ramirez, 2005).

b) Influencia de pH.- El valor de pH alcanzado en un queso durante el proceso de elaboración y de maduración es característico, con valores de pH 5.8~6.5; Las primeras fases de fabricación del queso son las que determinan la velocidad de producción de la acidez, alcanzándose el pH propio de cada variedad de queso. Posteriormente, durante la maduración se elevan los niveles de pH, registrándose los valores máximos cuando la actividad proteolítica de las BAL es elevada (Hill, 2007).

Factor determinante que regula la actividad bacteriana y enzimática, reduciendo a pH 5 ~ 5.2, en la cuajada fresca, rápidamente en las primeras horas, se mantiene estable por un tiempo y luego comienza a ascender paulatinamente en ciertos quesos donde puede llegar a valores de 5.4 ~ 5.6 o fuertemente en otros (madurados por mohos y levaduras) y que llega a neutralidad (Condori, 2010)

Durante la maduración deben cuidarse las condiciones de aireación, humedad y temperatura de las cámaras o cavas donde se realiza aquella. Cada queso tiene sus condiciones de humedad y temperatura para una óptima maduración. Durante este periodo los quesos pierden peso por evaporación y desarrollan aromas y sabores característicos de cada tipo. Es necesario procurar que la pérdida de humedad sea uniforme en todos los quesos almacenado (Madrid, 1994).

Los componentes del queso que se modifican durante el curado son: La grasa, la proteína y la lactosa. La mayoría de la grasas se elimina con la fracción del suero y la cantidad que se retiene en la cuajada se fermenta formando ácido láctico durante la fabricación de la cuajada y durante las primeras etapas de la maduración. Durante la maduración la fracción de proteínas se sujeta a la acción de microorganismos y enzimas y se hidroliza parcialmente (Norman, 1994).

Tabla 3. Análisis fisicoquímico de queso pasteurizado

Día	pH			Ácido Láctico (%)		
	20 °C	30 °C	40 °C	20 °C	30 °C	40 °C
0	6.310	6.313	6.317	0.030	0.032	0.035
3	6.253	6.150	6.150	0.042	0.045	0.053
6	6.260	5.957	5.807	0.048	0.078	0.106
9	6.213	5.870	5.687	0.050	0.119	0.153
14	6.023	5.813	5.620	0.062	0.141	0.170

Fuente: (Ccopa, 2008)

2.3. CULTIVOS INICIADORES

En la actualidad, los cultivos iniciadores constituyen una parte importante de una industria plenamente desarrollada y son en muchas ocasiones, condición indispensable para la fabricación de gran variedad de productos lácteos fermentados. En la industria láctea, los cultivos iniciadores se definen como cultivos de una o varias cepas, pertenecientes a una o varias especies de bacterias deseables, que se utilizan para inocular leche pasteurizada o cruda, fundamentalmente con el objeto de iniciar la fermentación (Sandine, 1979).

Aunque los cultivos iniciadores pueden estar constituidos por diferentes tipos de microorganismos ver Tabla 4, el grupo más importante está integrado casi exclusivamente por bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Además de BAL, en algunas ocasiones se añaden a los fermentos para la fabricación de queso, los llamados cultivos secundarios o adjuntos, constituidos también por bacterias o por mohos y levaduras, los cuales actúan durante la maduración de los quesos produciendo compuestos que intervienen en el aspecto, textura, sabor y aroma de los mismos. La principal función de los cultivos iniciadores es la producción de ácido láctico por fermentación de la lactosa presente en la leche, creando unas condiciones favorables para (Mucio, 2008).

- i) Favorecer la formación de la cuajada por enzimas coagulantes.
- ii) Prevenir o inhibir el crecimiento de la flora patógena y alterante mediante la reducción del pH.
- iii) Contribuir a la formación de la textura y compuestos del sabor y aroma característicos (Ayad, 2000).

Tabla 4. Microorganismos empleados en fermentaciones lácticas

Organismo	Tipo de producto	Beneficio
Bacterias		
<i>Lactococcus lactis</i>	<p><i>subsp. lactis</i> Mayor parte de quesos, cremas <i>subsp. cremoris</i> agrias y suero de mantequillas <i>subsp. lactis biovar. diacetylactis</i></p>	<p>Acidez, aroma Acidez, aroma Acidez, aroma, ojos</p>
<i>Streptococcus</i>	Yogur, queso <i>thermophilus</i>	Acidez
Hongos y Levaduras		
<i>Penicillium</i>	<p><i>Roqueforti</i> Quesos blandos (vena azul) <i>camemberti</i> Quesos blandos (superficie)</p>	<p>Aroma, color Aroma, textura, color</p>
<i>Geotrichum</i>	Quesos de pasta blanda-corteza lavada, Camembert <i>Candidum</i>	Aroma
<i>Kluyveromyces</i>	Quesos de pasta blanda-corteza lavada <i>Lactis spp.</i>	Favorecer el crecimiento de otros microorganismos
<i>Sacharomyces</i>		

Fuente: (Smit, 2004)

Además, los cultivos iniciadores desempeñan un papel fundamental en la maduración del queso. La contribución al sabor y aroma durante la maduración del queso por los cultivos puede ser de dos formas según (Nuñez, *et al.*, 1979) son:

- i) Mediante la formación de diferentes compuestos como consecuencia del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos de la leche.
- ii) Indirectamente, regulando la presencia de otros microorganismos.

La clasificación más habitual de los cultivos iniciadores se basa fundamentalmente en dos aspectos: Atendiendo a su composición, se clasifican en cultivos de una única cepa, también conocidos como cultivos simples, cultivos de múltiples cepas de una especie, En función de la temperatura óptima de crecimiento, los cultivos iniciadores se componen de bacterias lácticas mesófilas o termófilas. Las bacterias lácticas mesófilas pueden crecer a temperaturas entre 18 °C y 37 °C y las termófilas entre 30 °C y 45 °C (Randazo, *et al.*, 2008).

Los cultivos iniciadores mesófilos son los más utilizados en la industria quesera, así como en la fabricación de nata ácida, mantequilla, etc. Estos cultivos pueden contener cepas de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *L. lactis subsp. cremoris*, *L. lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* y *Leuconostoc*. Las especies que pueden componer los cultivos termófilos son *Streptococcus thermophilus* y diferentes especies de lactobacilos como *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lb. helveticus* y *Lb. fermentum*, (Pavlidou, *et al.*, 2011).

De ahí que se esté haciendo un esfuerzo importante en la caracterización bioquímica, genética y tecnológica de cepas silvestres aisladas de quesos elaborados artesanalmente, con el fin de potenciar caracteres directamente asociados a la microbiota del queso como son el aroma o el sabor del mismo (Rehn, *et al.*, 2011).

2.3.1. Caracterización de géneros de bacterias acidolácticas (BAL)

Los fermentos lácticos actúan en el queso desde que comienza la fabricación hasta el final de la maduración. La primera acción es la acidificación rápida del medio que permite controlar y frenar el desarrollo de La flora heterogénea natural de la leche y desciende el pH favorecido la actividad coagulante del cuajo (Oria, 1991).

La función primaria de los cultivos iniciadores lácticos es la producción de ácido láctico a partir de la lactosa, que consecuentemente produce un cambio en el estado de la leche, líquido a gel, debido a que la caseína alcanza un pH de 4.4~4.6, llamado punto isoeléctrico (carga neta cero). Este cambio en la acidez produce inhibición de microorganismos indeseables (Holzapfel, 2002).

Este grupo se compone de 13 géneros de bacterias Gran Positivas: Homofermentativas y Heterofermentativas, de las cuales los más importantes para industria láctea al menos son 10 géneros: *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* (Janes & Martin, 2009).

2.3.2. Fermentos lácticos para queso tipo Edam

2.3.2.1. *Lactococcus*

Son células esféricas que se pueden presentar individualmente, en parejas o en cadenas. Son homolácticas, crecen a 10 °C y reaccionan con el antisuero N (grupo N de Lancefield). Los miembros de este género se utilizan frecuentemente como cultivo iniciadores en diversos alimentos. Los fabricantes de productos lácteos utilizan a menudo *Lc. Lactis subsp.lactis* y *Lc. lactis subsp. cremoris* en la elaboración de queso (Yousef & Carlstrom, 2006).

Tabla 5. Caracterización de género de BAL para aspectos tecnológicos de proceso

Temperaturas		Homolácticas		Heteroláctica
Mesófilos	Termófilos	Formas	Uso	Producción
10 °C	45 °C	Cocos y bacilos	Glucosa	Ácido Láctico
12 ~ 30 °C	25 ~ 45 °C	Cocos y bacilos	Lactosa	Acidificación.
25 ~ 35 °C	35 ~ 50 °C	Grupo de cepas		Elasticidad
20 ~ 25 °C	40 ~ 45 °C	Cocos y bacilos		Texturizantes
14 ~ 45 °C	30 ~ 52 °C	Cocos y bacilos	lactosa	50 % L. 50% CO ₂ y etanol

Fuente: (Ahmed & Carolyn, 2006)

2.3.2.2. *Lactococcus lactis subsp. lactis*

El *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, es una bacteria acidoláctica utilizada como cultivo iniciador en productos fermentados, por su capacidad de fermentar la lactosa produciendo ácido láctico en gran cantidad, de la misma forma es capaz de producir algunas sustancias antibacterianas conocidas en forma genéricas como bacteriocinas, entre las cuales destacan la nisina y la diplococcina (Sarapura, 2009).

La mayoría de fermentaciones de alimentos dan lugar, además aun tiempo de conservación más largo. Por ejemplo conlleva a la producción de ácido láctico que baja el pH del producto creado un medio inadecuado para el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes. Algunas LAB producen péptidos antimicrobianos, conocido como bacteriocinas, las cuales pueden controlar el crecimiento de ciertos patógenas. La nisina es un bacteriocina producida, esta se activa frente a diversos microorganismos alterantes y patógenos, (antibiótico termoestable), termo resistente. Desarrollan en temperaturas optimas 27 ~ 32 °C y temperaturas extremas 10 ~ 40 °C (Ramirez, 2005).

2.3.2.3. *Lactococcus lactis subsp. cremoris*

El cual ha sido ampliamente utilizado en diversos productos como queso madurado. Puede ser utilizada tecnológicamente como un biopreservador, controlando el crecimiento de bacterias patógenas como el *Stapyulococcus aureus*, *Listeria monocitogenes*, *Escherichia coli* e incluso algunos especies de genero *Clostridium*, los cuales son responsables de serios problemas de conservación en diversos productos lácteos (Larpent, 1995).

De los especies utilizadas *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris* (LC +LI) el *cremoris* presenta una mejor velocidad de acidificación que el *lactis*. De las cepas *cremoris*

existen lentas y rápidas y a ella su velocidad le altera al igual que la tasa de producción los agentes contaminantes externos o intrínsecos a la propia leche (Ramirez, 2005).

2.3.2.4. *Streptococcus thermophilus*

Las células son similares a las de género *Lactococcus* y también son homolácticas. La mayoría de las especies a 45 °C. *Streptococcus thermophilus* se utiliza como cultivo iniciador en la elaboración de yogur y quesos, particularmente en variedades italianas (Yousef & Carlstrom, 2006).

Streptococcus thermophilus su temperatura óptima es 42~45 °C y temperatura extremas 20~50 °C, Tolera el ácido láctico y pH más bajos 4.1 el cultivo es usado para buena textura pero son muy recomendables en un Programa ACR (sistema de maduración Acelerada) para obtener una textura acelerada a su corta edad no la tenga se suelen utilizar cultivos *thermophilus* con alto poder texturizante y sobre todo, con bajo poder acidificante a temperaturas medias y nula postacidificación (Ramirez, 2005).

2.4. METABOLISMO DE LAS BACTERIAS

Existen dos vías básicas de fermentación de hexosas que son usados para la clasificación de los géneros de BAL. En condiciones de exceso de glucosa y un limitado uso de oxígeno, las BAL homolácticas transforman un mol de glucosa a través de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas para formar dos moles de piruvato. El balance redox intracelular se mantiene por la oxidación de NADH con la concomitante reducción del piruvato en ácido láctico. Este proceso genera dos moles de ATP por cada mol de glucosa consumida. Los representantes de las BAL homolácticas incluyen *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y el grupo I *Lactobacilli* (Madigan, et al., 2004).

2.4.1. Metabolismo de la lactosa y del citrato

La hidrólisis de la lactosa comienza en la cuba de fermentación y continúa durante la maduración con una intensidad variable dependiendo del tipo de queso. Aunque la mayor parte de la lactosa se pierde en el desuerado, la cuajada fresca aún presenta un pequeño porcentaje de lactosa residual. Durante las primeras etapas de la maduración, esta lactosa residual es rápidamente metabolizada hasta ácido láctico por la acción de las BAL, provocando la acidificación de la leche y de la cuajada (McSweeney & Sousa, 2000).

Esta acidificación va a acelerar la coagulación de las caseínas durante el proceso de elaboración y va a favorecer la sinéresis (expulsión del suero de la cuajada). Como producto intermediario se genera piruvato, que puede ser alternativamente convertido en ácido láctico generando varios componentes aromáticos de cadena corta como diacetilo, acetoína y acetaldehído (Smit & Engels, 2005).

Por otra parte, la mayoría se pierde con el suero, el citrato puede ser metabolizado hasta compuestos aromáticos importantes en algunas variedades de queso elaboradas con cultivos iniciadores mesófilos (Cogan & Hill, 1993).

Sólo BAL como *L. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* y algunas especies de *Leuconostoc*, que son capaces de transportar citrato al interior celular, metabolizan el citrato generando CO₂ y compuestos aromáticos como diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol (Marilley & Casey, 2004).

Debido a la producción de CO₂, el metabolismo del citrato es el responsable de la formación de los ojos característicos en los quesos tipo holandeses y de la textura abierta indeseable y los defectos de flotación de la cuajada en queso Cheddar y Cottage, respectivamente (Fox & Lucey, 1990).

Fermentación homoláctica (ruta de Embden- Meyerhof –Parnas), cambio materia y energía el organismo vivo el medio exterior en virtud de proceso de asimilación y desintegración según las fases de vida, La glucosa se convierte en ácido láctico casi cuantitativamente (Ahmed & Carolyn, 2006).



2.4.2. Fermentación láctica

En esta fermentación se obtiene ácido láctico, a partir del ácido pirúvico procedente de la glucólisis. De esta manera regenera el NAD^+ , necesario para continuar la ruta de la glucólisis. Los *lactococcus* son bacterias G^+ y anaerobias que necesitan moléculas orgánicas para ceder H^+ . Existen dos grandes grupos de bacterias que realizan fermentación láctica: las homofermentativas (solo producen ácido láctico) y de las que se obtienen leche fermentada, yogur y queso; Las “agujetas” son el resultado de la fermentación de la glucosa en ácido pirúvico y éste en ácido láctico debido a la falta de O_2 en el sobre esfuerzo físico.

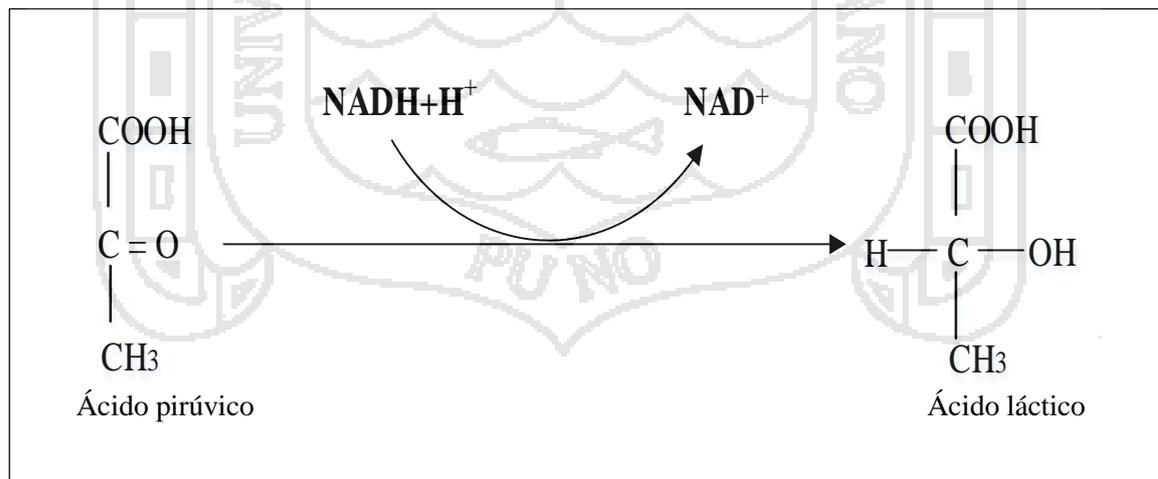


Figura 1. Relación de ácido pirúvico o ácido láctico

Fuente: (Garcia, *et al.*, 2010)

2.5. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

La microbiología predictiva de alimentos (MPA) es un área multidisciplinaria emergente de la microbiología de alimentos, que surge como alternativa a la necesidad de acortar tiempos de respuestas, reducir costos económicos, reemplazar metodologías valiosas y disminuir la laboriosidad en los análisis de la microbiología clásica de alimentos. Es un área multidisciplinaria ya que abarca distintas disciplinas como la microbiología, matemática, estadística, informática, bioquímica, etc., con el fin de desarrollar y aplicar modelos de simulación que permitan predecir las respuestas de los microorganismos ante diversos factores medioambientales (Ross & McMeekin, 2003).

La microbiología predictiva se basa en la siguiente premisa: las respuestas de los microorganismos ante los cambios en los factores ambientales pueden ser reproducidas de forma controlada en laboratorio, de esta forma, a través de diversos modelos matemáticos es posible predecir cuál será el comportamiento de los microorganismos cuando cambian las condiciones ambientales que les rodea (Cabeza, 2011).

La microbiología predictiva se basa en la premisa de que las respuestas de las poblaciones de microorganismos a los factores ambientales son reproducibles y de este modo es posible, desde observaciones realizadas, predecir las respuestas de esos microorganismos en otras condiciones similares (Ross & McMeekin, 2003).

2.5.1. Parámetros de crecimiento microbiano

a) Tiempo de latencia ()

La fase de latencia del crecimiento microbiano es el intervalo entre la inoculación del cultivo bacteriano y el tiempo del comienzo de su velocidad máxima de crecimiento. Y suele ser convencionalmente medido como el punto en el cuál la pendiente de la fase exponencial

de crecimiento (en una gráfica semi-logarítmica) intercepta la línea horizontal trazada desde la concentración celular inicial, como refiere (Robinson, *et al.*, 1998).

En el caso de las condiciones de crecimiento, la fase de latencia es el período de ajuste durante el cual las células bacterianas se modifican por si mismas con el objetivo de sacar ventaja del nuevo ambiente e iniciar el crecimiento exponencial (Buchanan & Klawitter, 1991). Por tanto, durante la fase de latencia las células se adaptan a su nuevo entorno induciendo o reprimiendo la síntesis y actividad de determinadas enzimas, iniciando la replicación de su material genético, y en el caso de las esporas, diferenciándose en células vegetativas (Montville, 2000).

b) Tiempo de generación (T_g)

El tiempo de generación es el tiempo necesario para duplicar la población bacteriana. Define como el tiempo requerido para que todos los componentes del cultivo aumenten en un factor de 2. Durante este período de generación el número de células y la masa celular se duplica (Stanier, *et al.*, 1989).

El tiempo de generación varía entre los distintos microorganismos. Muchas bacterias tienen tiempos de generación de 1~3 horas, conociéndose pocos microorganismos que crezcan muy rápidamente dividiéndose en menos de 10 minutos. Otras tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días. El tiempo de generación es útil como indicador del estado fisiológico de una población celular, y es usado con frecuencia para comprobar el efecto negativo o positivo de un determinado tratamiento sobre un cultivo bacteriano (Madigan, *et al.*, 1997).

El tiempo de generación está directamente relacionado con la velocidad de crecimiento exponencial, que se define como la pendiente de la curva de crecimiento

logarítmico en la fase de crecimiento exponencial. Generalmente, estos dos parámetros son estimados por el ajuste de los modelos primarios (Barany & Roberts, 1994).

c) Velocidad de crecimiento (μ)

Como ya se ha indicado anteriormente, el crecimiento se define como un incremento en el número de células microbianas en una población, lo cual también puede ser medido como un incremento en masa microbiana. En este contexto, la velocidad de crecimiento se define como el cambio en número de células o masa celular por unidad de tiempo (Madigan, *et al.*, 1997).

2.5.2. Modelo matemático

Es un análogo de una realidad física, por lo general más simple e idealizada, es decir, es una abstracción de la realidad. Esto es, que a través de una serie de ecuaciones o modelos matemáticos se puede representar el entorno real, y predecir cómo se comportarán cada uno de los agentes que interactúan en ese entorno cuando cambia uno o varios factores que ejercen influencia sobre el objeto (Cabeza, 2011).

2.5.3. Clasificación de los modelos microbiológicos

2.5.3.1. Modelos primarios

Los modelos primarios describen cambios en la respuesta microbiana con el tiempo en un ambiente específico. El modelo puede cuantificar unidades formadoras de colonia por mililitro o por gramo (ufc/ml), formación de toxinas, niveles de sustrato o productos metabólicos (que son medidas directas del crecimiento); absorbancia e impedancia (medidas indirectas de la respuesta). Una vez generada la curva de crecimiento o muerte microbiana, se utiliza una función o ecuación matemática para describir el cambio de la respuesta en

función del tiempo. Ejemplos de modelos primarios son: la función de Gompertz para crecimiento exponencial; modelos para describir la declinación no lineal de esporas sobrevivientes con el tiempo; modelo logístico aplicado a destrucción térmica; el modelo de Stannard; el modelo de Schnute; la ecuación de Fermi; etc (McMeekin & Ratkowsky, 1993).

El valor D (tiempo necesario a una determinada temperatura para reducir en un 90% la población microbiana) es también ejemplo de un modelo primario (Whiting & Buchanan, 1994).

a) Ecuación de Gompertz

El de Gompertz es uno de los modelos más utilizados para describir el desarrollo microbiano determinado la respuesta de los microorganismos bajo diversas combinaciones de factores (Buchanan y Klawitter, 1992) Una de las ecuaciones más ampliamente utilizadas es la ecuación de Gompertz (GMP, ec. 1) introducida por (Gibson, *et al.*, 1987).

La ecuación de Gompertz fue modificada, con el fin de incluir directamente en ella tres parámetros cinéticos de interés biológico: la velocidad de crecimiento (μ_{max}), fase de adaptación () y máxima densidad de población (A) (Zwietering & Hasenack, 1991).

$$Y(t) = Y_0 + C \{-e^{-[-B(t-M)]}\} \dots\dots\dots(01)$$

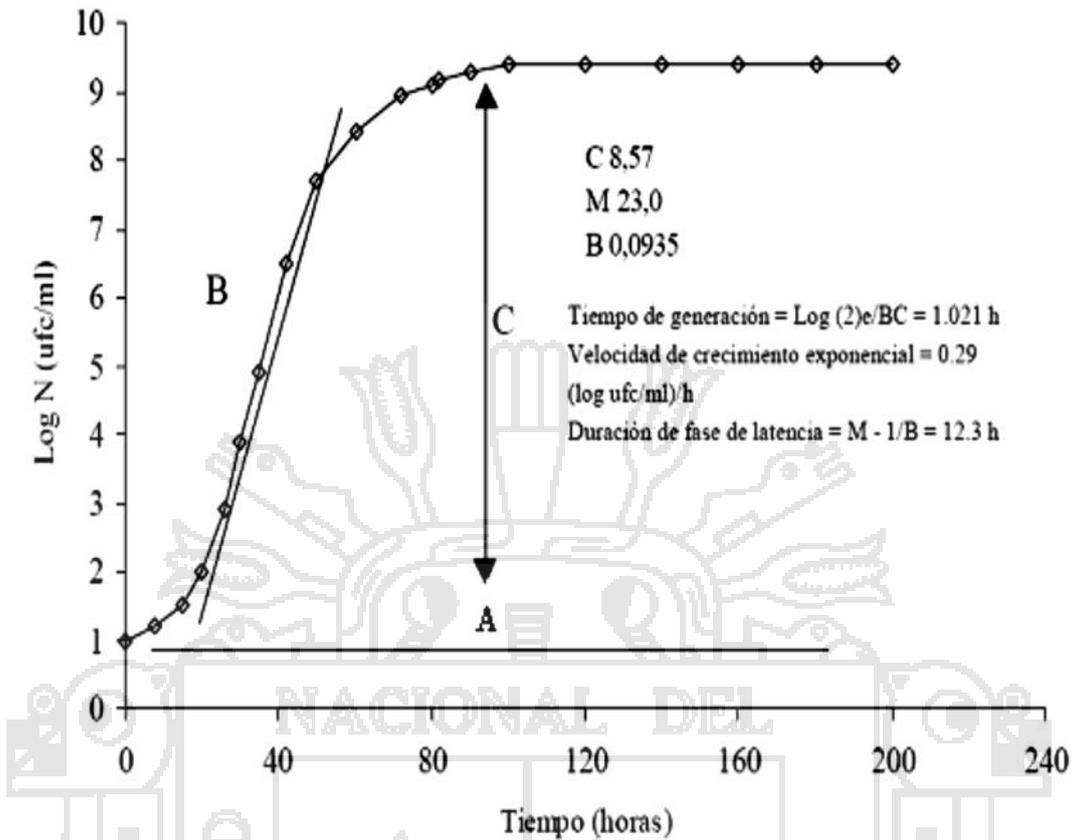


Figura 2. Representación gráfica de la ecuación de Gompertz y sus parámetros cinéticos
 Fuente: (Zwietering, *et al.*, 1994).

b) Ecuación de Baranyi y Roberts

Baranyi & Roberts, describen el crecimiento bacteriano mediante un par de ecuaciones diferenciales, las cuales pueden ser usadas en casos en los cuales se den ensayos de crecimiento con variación simultánea de temperatura y tiempo, Para condiciones isotermas, sin embargo, la ecuación que describe el crecimiento se presenta a continuación (Barany & Roberts, 1994).

$$Y(t) = C + L \left[\frac{-1 + e^{-B(t-C)}}{-1 + e^{-B(t-C)} + e^{-B(M+C-Y_0)}} \right] \dots\dots\dots(02)$$

c) Modelo Log-logístico

El modelo Log-logístico fue propuesto inicialmente por Cole *et al.* (1993) para describir la inactivación no térmica y crecimiento de microorganismos y posteriormente fue modificada por Chen y Hoover para evitar el uso directo de números iniciales y describir el número de parámetros de la ecuación (Chen & Hoover, 2004).

$$Y(t) = Y_0 + \frac{C - Y_0}{\left\{1 + e^{\left[\frac{4B}{C - Y_0}(M - t) + Z\right]}\right\}} \dots\dots\dots(03)$$

Donde:

$Y(t)$: Ln N(t), siendo la densidad bacteriana (UFC/g) al tiempo t .

Y_0 : Ln el valor asintótico inferior y aproximadamente igual a la densidad bacteriana inicial (UFC/g).

C : Ln el valor asintótico superior y aproximadamente igual a la máxima densidad bacteriana (UFC/g).

B : máxima velocidad específica de crecimiento o pendiente de la curva (t).

M : tiempo en el cual la tasa de crecimiento es de mayor magnitud.

2.5.3.2. Modelos secundarios

Los modelos secundarios están compuestos por ecuaciones que describen cómo varían los parámetros de crecimiento de los modelos primarios (tasa de crecimiento, duración fase de adaptación, etc.) con cambios en uno o más factores ambientales temperatura, pH, a_w , atmósfera gaseosa, etc (McMeekin & Ratkowsky, 1993).

2.5.3.3. Validación de los modelos matemáticos

La validación de un modelo matemático es una de las etapas más cruciales y al mismo tiempo más difícil dentro del ciclo completo de la modelización predictiva (Van Boekel,

1996). La validación debe realizarse en medios de laboratorio pero especialmente en productos alimenticios. Cuando el sistema, al que se aplica un modelo predictivo, se hace más complejo, aumentando el error de las predicciones (Pin, *et al.*, 1999). La validación de modelos predictivos se puede llevar a cabo con datos obtenidos en las mismas condiciones que los utilizados para elaborar el modelo, denominada validación interna, con el fin de determinar si el modelo puede describir suficientemente los datos experimentales (Castillejo, 2002).

La validación matemática cuantifica la seguridad matemática de un modelo testado con datos experimentales nuevos. Estos datos nuevos, que no se han usado para la elaboración del modelo, se han obtenido bajo condiciones de experimentación similares, con diferente tamaño de inóculo, diferente temperatura, etc. Únicamente cuando la etapa previa de validación matemática es pasada exitosamente, es posible establecer la validación de producto (Van Boekel, 1996).

Witzjes y Col., (1993) representaron gráficamente valores de tiempo de generación para *L. monocytogenes*, encontrados en la literatura, frente a las correspondientes predicciones de un modelo predictivo elaborado en medio de cultivo (Rodríguez, 2003).

En esta representación se podían observar fácilmente aquellas predicciones que podrían ser inseguras en la práctica y la bondad de ajuste del modelo desarrollaron ecuaciones predictivas para la tasa de crecimiento de *Listeria sp.* basadas en mediciones realizadas en caldo infusión cerebro corazón. Paralelamente se añadieron datos hallados en la literatura, del crecimiento de este microorganismo en alimentos a la serie de datos y con los datos adicionales se efectuó un análisis de regresión (Duh & Schaffner, 1993).

La proximidad en el valor del error cuadrático medio (MSE, Mean Square Error) y los valores de R^2 , de las ecuaciones ajustadas a la serie de datos, se han tomado como indicadores de la fiabilidad de los modelos cuando se aplicaban a alimentos. Otra medida de la exactitud de las ecuaciones predictivas fue introducida por (McClure, *et al.*, 1993) quienes compararon sus modelos basándose en el sumatorio de los cuadrados de las diferencias del logaritmo natural de los valores observados y predictivos para el tiempo de generación (Lima, 2010).

$$\sum (L(G_o) - L(G_p))^2 \dots \dots \dots (04)$$

El valor más pequeño indica el modelo que mejor predice la respuesta observada. Ross (1996) ha desarrollado dos índices para evaluar la bondad de ajuste de los modelos predictivos. Estos índices, denominados factor sesgo (B_f) y exactitud (A_f), proporcionan un fácil resumen de la fiabilidad de los modelos y además sirven como primer paso en el avance del proceso de validación de modelos predictivos. El objetivo planteado para estos índices fue permitir la estimación de la bondad de ajuste de modelos predictivos, cuando se comparan con observaciones que no se han utilizado para generar el modelo, particularmente llevadas a cabo en alimentos, y de esta forma evaluar su utilidad para ayudar en la toma de decisiones en seguridad y calidad alimentaria. Un objetivo adicional propuesto fue el de proporcionar una medida simple y cuantitativa de la fiabilidad de los modelos. Desde que Ross (1996) estableciera los índices, para evaluar la bondad de ajuste de los modelos predictivos, han sido ampliamente utilizados en estudios de validación (Castillejo, 2002).

a) Comparación gráfica

Los valores de los parámetros cinéticos observados en los alimentos pueden ser representados gráficamente frente a las correspondientes predicciones del modelo predictivo evaluado. A partir de esta representación se pueden visualizar rápidamente aquellas predicciones que podrían resultar inseguras en la práctica, y además se puede estimar la fiabilidad del modelo. También para este fin, el examen y análisis de la presentación de los errores residuales puede ser muy útil. (Giffel & Zwietering, 1999). La ventaja de expresar la tasa de crecimiento en escala logarítmica es que los puntos están más equitativamente dispersos sobre un rango más grande. Un inconveniente es que las desviaciones estructurales y tendencias de los datos pueden pasar desapercibidas en una representación logarítmica. En conclusión, es aconsejable y útil examinar la representación de los datos sin transformar como también de las transformaciones logarítmicas y de raíz cuadrada (Chen & Hoover, 2004).

b) Raíz del error cuadrático medio (*RMSE*)

El estadístico Raíz del error cuadrático medio (*RMSE*, Root Mean Square Error), raíz del sumatorio de los residuos al cuadrado dividido por el número de grados de libertad (*n*), es una medida de variabilidad residual, la cual no es explicada por los cambios deliberados en factores como la temperatura, pH y *a_w*. El número de grados de libertad es igual al número de datos o valores. Esta variabilidad residual puede venir causada por varios motivos incluyendo la variabilidad natural y errores sistemáticos. El valor más bajo de *RMSE* significa la mejor idoneidad del modelo predictivo para describir los datos (Sutherland, *et al.*, 1994).

$$R = \sqrt{\frac{\sum(\mu_E - \mu_o)^2}{n-p}} \dots\dots\dots(05)$$

c) Coeficiente de regresión múltiple (R^2)

El coeficiente de regresión múltiple es utilizado con frecuencia como una medida de la del ajuste total conseguido. Este coeficiente mide la fracción de la variación, alrededor de la media, que es explicada por el modelo. El valor más cercano a 1 significa una mejor predicción obtenida por ese modelo (Sutherland, *et al.*, 1994).

d) Índices sesgo y exactitud

Proporcionan una indicación objetiva de la idoneidad o buen funcionamiento de un modelo (Ross, 1996). En contraposición a los métodos estadísticos tradicionales, estos índices no están basados en la desviación existente entre la respuesta observada y la media. Este hecho causa un problema a la hora de evaluar la fiabilidad de los modelos con nuevos datos, puesto que la principal respuesta es desconocida. Está bien documentado que estos factores son herramientas útiles para medir la fiabilidad de los modelos predictivos (Neumeyer, *et al.*, 1997).

Bias o factor sesgo (B_f): este factor responde a la cuestión: ¿dónde se colocan los valores observados: por encima o por debajo de la línea de equivalencia, y también en qué medida se acerca a la concordancia perfecta?. Además proporciona una medida de la desviación estructural de un modelo. Está descrito en la ecuación siguiente:

$$B_f = 10 \left[\frac{\sum l_i \left(\frac{\mu_E}{\mu_O} \right)}{n} \right] \dots\dots\dots(06)$$

Donde:

n : número de observaciones usadas en el calculo

μ_{Est} : Velocidad de crecimiento estimado/horas

μ_{Obs} : velocidad de crecimiento observado/ horas

Un factor sesgo > 1 indica un modelo seguro para el caso de la tasa específica de crecimiento cuyo valor observado es inferior al estimado por el modelo predictivo, en este sentido el modelo proporciona un margen de seguridad (Ross, 1996). En cambio un valor sesgo < 1 para la fase de adaptación proporcionado por un modelo significa que la predicción estimada es segura, puesto que la fase de adaptación observada es mayor que la predictiva. El factor sesgo no proporciona información del promedio de la exactitud de las estimaciones, puesto que la sobre o subestimación tiende a cancelarla. Por lo tanto se debe calcular el factor de exactitud (Cabeza, 2013).

Accuracy o factor de exactitud (A_f): este factor es un promedio de la distancia entre cada punto y la línea de equivalencia, como una medida de la proximidad del promedio entre las predicciones y las observaciones. Toma la siguiente forma en valor absoluto (Cabeza, 2013):

$$A_f = 10 \left[\frac{\sum \left| \mu \left(\frac{\mu_E}{\mu_O} \right) \right|}{n} \right] \dots \dots \dots (07)$$

Donde:

- n : Número de observaciones
- p : Número de parámetros a ser estimados
- μ_{Est} : Velocidad de crecimiento estimada/hora
- μ_{Obs} : Velocidad de crecimiento observado/hora.

El valor mayor alcanzado por el A_f significa menos exactitud en la estimación. Un valor de A_f de 1,7 indica que las predicciones, en promedio, difieren un 70% de las observaciones. Si no hay desviación estructural (sesgo = 1, ambas desviaciones positiva y negativa en promedio, el modelo es exacto), la falta de exactitud pueden ser mostrada por el A_f (Ross, 1996).

Cuando ambos índices toman el valor de la unidad significa que existe concordancia perfecta entre los valores de los parámetros de crecimiento predictivos y los observados. Una buena concordancia entre los valores predictivos de tasa de crecimiento de un microorganismo y los observados en un alimento indica que el alimento por sí mismo juega un mínimo papel en la determinación de la respuesta microbiana, Si en cambio la respuesta observada difiere sustancialmente de la predicción es importante determinar la razón de esta diferencia. Algunos alimentos contienen sustancias naturales antimicrobianas, como sucede en los huevos. En otros casos la estructura del alimento juega un papel determinante, quizás porque limite la difusión de substratos u oxígeno al microorganismo, o por producción de compuestos ácidos (Robins, *et al.*, 1994).

En la literatura se han encontrado numerosos estudios científicos que hacen referencia a los índices de validación matemática, B_f y A_f , para la fase de adaptación de diversos microorganismos. Castillejo (2002) observó valores para los índices de validación de $B_f = 1.13$ y $A_f = 1.71$ mediante el modelo de Respuesta en Superficie en aerobiosis. Como se puede observar, los índices obtenidos en nuestro estudio se sitúan dentro del rango descrito por estos autores, e incluso son mejores, ya que se aproximan más a la unidad. Los resultados obtenidos para el estadístico *RMSE* mostraron desviaciones reducidas para los tres modelos, con valores entre 0.322 y 0.403. Con relación a los valores del B_f , se observa que el modelo de RN asociado o conjunto fue el que mejor estimó la fase de adaptación, ya que presenta un valor de 1.02, y para el resto de modelos, RS y RN individual, también fueron próximos a 1 ($B_f = 1.10$ y 1.12 respectivamente). Estos índices, superiores a la unidad, nos indican que las predicciones obtenidas con estos modelos sobrestiman la fase de adaptación, ya que los valores estimados son más elevados que los observados (Rodríguez, 2003).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo de investigación se ejecutó en la planta piloto de procesamiento de productos lácteos y en laboratorio de microbiología de alimentos de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, ubicado a una altitud de 3824 m.s.n.m.

3.1.1. Materia prima

La Leche que se utilizó, es obtenida de vacas de raza Brown Swiss, y cruce de ambas razas provenientes del establo de la estación experimental INIA-ILLPA, leches de buena calidad.

3.1.2. Insumos

Cultivo RSF-742 (CHR- HANSEN)

Quimosina en polvo CHI-MAX (CHR HANSEN)

Cloruro de sodio (NaCl)

Cloruro de calcio (CaCl)

Nitrato de sodio (NaNO₃)

3.1.3. Reactivos

Fenolftaleína (C₂₀H₁₄O₄ 0.1N)

Hidróxido de sodio (NaOH 0.1N)

3.1.4. Medios de cultivo

Cultivo (*Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) RSF-742 (CHR- HANSEN)

Agar-M17 CM0785 (OXOID)

Agar Man Rogosa Sharpe MRS (MERC)

Lactosa Monohidratada AR $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ (TST)

Agua de Peptona (MERC)

3.1.5. Materiales e instrumentos

Utensilios de elaboración de Queso

Recipientes de plástico

Lactodensímetro

Termómetro -5~120 °C (PIRIX)

Acidómetro

Coladores y mallas de filtración

Probetas de 100 y 220 ml

Pipetas de 0.5, 1, 5 y 10 ml

Buretas de 5 ml

Vasos precipitados de 10-5000 ml

Tubos de ensayo 15 ml

Placas Petri de 15 ml.

Tuberculinas de 1 ml

Lunas de reloj 10 g

Bombilla de succión

Mechero de Busen

Cronómetro

Olla de 40 L

3.1.6. Equipos

Baño maría marca (MEMMERT)

Autoclave LS-BSOL-II, volumen 50 L

Estufa Labor Muszeripari Muvek

Contador de colonias (BIO-TECHNOLOGIES)

Cocina eléctrica marca (BRUDER)

Refrigeradora marca (COLDEX)

Balanza analítica Precision AND FR-300 Japan Cap. De 0.0001~300 g

Licuada marca (OSTER) Cap. 1 L

pH-metro digital marca (SEBENGO)

3.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.2.1. Preparación de los cultivos iniciadores (RSF-742)

Los cultivos iniciadores empleadas fueron del código RSF-742, mezcla de cepas *Lactococcus lactis subs lactis*, *Lactococcus lactis subs cremoris* y *Streptococcus Thermophilus* CHR- HANSEN (Dinamarca). Estas cepas fueron seleccionadas en base a su capacidad de crecer y disminuir el pH rápidamente inoculadas en leche pasteurizada y en queso. El cultivo iniciador se agregó de manera directa a una dosis recomendada por la fábrica siguiendo las instrucciones de las fichas técnicas, para el producto a elaborar, e inoculadas en leche pasteurizada a temperaturas de 30, 38 y 45 ° C durante 40 minutos previa al proceso.

a) Queso

La unidad experimental constó de 60 L de materia prima de leche el cual se dividió en 3 tratamientos de 20 L de leche por tratamiento. Se utilizó un total de 3 quesos que se

evaluaron: los parámetros de crecimiento de UFC/g, pH, % acidez y ajuste de modelos matemáticos durante la maduración del queso Edam.

3.2.1.1. Método para análisis microbiológico

a) Preparación de muestra

En la toma de muestra para los análisis microbiológicos se ha seguido el método descrito por Siciliano (2010) y norma técnica de Dehydrated Culture Media AGAR M17 suplementado con 10% de lactosa para quesos madurados. La preparación de las diluciones decimales se realizó tomando 10 g de queso y 40 ml de agua de peptona al 0.1% estéril, posteriormente se realizó homogenizado en una licuadora domestica a máxima velocidad aproximadamente 5 minutos. A partir de ella se prepararon las sucesivas diluciones decimales seriadas en agua de peptona estéril al 0.1%.

b) Preparación de diluciones

Las diluciones se prepararon a partir de la muestra homogenizada, tomando de ella 1ml que se depositó en un tubo que contenía 9 ml de agua de peptona estéril al 0.1%. Después de agitado el tubo, se tomó 1 ml que se añadió a un nuevo tubo con 9 ml de agua peptona estéril y así sucesivamente, hasta conseguir la dilución deseada.

c) Preparación de los medios de cultivo

Se efectuó de acuerdo con las instrucciones de la casa suministradora del agar. Los medios de cultivo empleados en los recuentos fueron:

- Agar para recuento en placa (PCA). Se empelo como medio para recuento de microorganismos viables totales.
- Agar M17 acc. To TERZAGHI (OXOID), agregado con 10% de lactosa monohidratado. Se utilizó para el recuento de bacterias acido lácticas del género (*lactococcus*).

d) Siembra en placas

Se tomó 15 ml de Agar autoclavado a 112 °C por 15 minutos en placas Petri. Seguidamente se tomó 1 ml de las diluciones deseadas en placas Petri sembrado, en seguida estas se deslizaron suavemente para esparcir dentro de la placa Petri. La incubación en placas fueron invertidas, seguidamente se efectuó en una estufa calibrada a temperatura 35 ° C por un tiempo de 24 horas.

e) Enumeración de las bacterias lácticas

El crecimiento de las bacterias lácticas se evaluó en tiempos 24, 48, 72, 168, 240, 336, 408 y 576 horas, durante el periodo de maduración en agar M 17. Tras el periodo de incubación se efectuó el recuento de colonias viables expresando el resultado como (log 10 UFC/g) de muestra. Cada medición se realizó por triplicado.

3.2.2. Determinación de análisis fisicoquímico queso Edam

a) Determinación de pH

Se utilizó pH- metro SebenGO™ SG2 con límite de error ± 0.01 pH, ± 1 mV y ± 0.5 °C calibrado con la solución Buffer de pH 7.00.

Se realizó de acuerdo A.O.A.C. (1990), indica para determinar pH añadir agua a 10 g de muestra hasta tener un volumen total de 100 ml agitar la mezcla. Para determinar pH se toma una muestra de 20 ml en un vaso precipitado y sumergir el electrodo de vidrio entonces en la pantalla indica el pH del queso.

b) Determinación de acidez

La medición de % de acidez se toma de acuerdo a Meyer *et al.* 1982: se toma 10 gramos de queso finamente molidos. Se coloca en un frasco volumétrico de 100 ml. Se añade

agua destilada a 40° C hasta alcanzar 100 ml. La mezcla se agita vigorosamente. Se filtra la solución, con una pipeta se toma 50 ml del filtrado. Esta cantidad corresponde a 5 g de la muestra. Se procede la titulación con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N adicionaran 5 gotas de fenolftaleina al 1 % como indicador. Cuando aparece el color rosa, se agita el frasco durante 15 segundos para ver si el color permanece, se toma la lectura en la bureta y se calcula la cantidad de hidróxido de sodio usada para neutralizar la acidez de la muestra de acuerdo con el método Villegas y Santos (2009).

Cálculo de la acidez titulable: La acidez del producto se expresa como el porcentaje de peso del ácido que se encuentra en la muestra. El cálculo de la acidez titulable se efectúa mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de acidez} = \frac{A \cdot B \cdot C}{D} \cdot 100 \dots\dots\dots(08)$$

En donde:

A = cantidad en mililitros del álcali o solución usada.

B = normalidad de la solución usada.

C = peso equivalente expresado en gramos del ácido predominante en el producto.

D = peso de la muestra en miligramos

c) **Determinación de densidad**

Se realiza de acuerdo de Villegas y Santos (2009) describen la siguiente metodología para el cálculo de la densidad. En una probeta de 250 ml. de capacidad, se coloca el lactodensímetro lentamente y se deja flotar por un tiempo, en cuanto el lactodensímetro se detuvo se procede a la lectura y posteriormente al cálculo de la densidad corregida con la siguiente ecuación:

$$\rho_{15^{\circ}C} = \rho_T + 0.0002(T - 15) \dots\dots\dots(09)$$

Donde:

- $\rho_{15^{\circ}C}$: densidad corregida
- ρ_1 : densidad leída
- T : temperatura de la muestra

3.2.3. Validación de modelos matemáticos de crecimiento de cultivos iniciadores

a) Modelamiento primario

En esta etapa se usó los modelos primarios de Baranyi & Roberts, Gompertz y Logístico para determinar la velocidad de crecimiento de cultivos iniciadores en cada temperatura evaluada. Para tal fin nos apoyamos en el software STATGRAPHICS® Centurion XVI para obtener los datos mediante el Algoritmo de Marquardt y la ecuación de μ_{max} .

b) Modelamiento secundario

Una vez obtenidas las máximas velocidades de crecimiento para cada temperatura, se construyó un modelo secundario ajustando los datos de velocidad vs temperatura a una función matemática conocida mediante regresión lineal. Posteriormente se obtuvo la ecuación matemática que representa esa relación. Esta expresión matemática se convirtió en el modelo que se usó para generar los datos de velocidad de crecimiento de cultivos iniciadores. Para esta etapa se usó el software Microsoft Excel 2010 y el software STATGRAPHICS® Centurion XVI utilizando la metodología de (Cabeza, 2013).

c) Ajuste y validación del modelo

La tercera etapa consiste en la validación estadística del modelo matemático empleando para ello los datos obtenidos en el laboratorio (Observados) y los datos generados por el modelo en la segunda etapa (Estimados). La validación se hizo comparando estadísticamente el factor de sesgo (B_f), factor de exactitud (A_f) y el Error cuadrado medio ($RMSE$) tal como ha sido descrito por varios autores (García, *et al.*, 2011) y (Judet-Correia, *et al.*, 2010).

B_f : el factor sesgo responde a la pregunta de si, en promedio los valores observados se encuentran por encima o por debajo de la línea de equivalencia y, en caso afirmativo, en qué medida.

A_f : el factor exactitud mide la distancia mínima entre cada punto promedio y la línea de equivalencia como una medida de que tan cerca, en promedio se encuentran los valores predichos y los observados, por lo tanto, el (A_f) es una medida de la desviación media y puede ser utilizado como una simple medida del nivel de confianza que se puede tener con el modelo de predicción.

$RMSE$: mide la desviación media entre los valores observados (Obs) y los valores estimados (Est) cuando menor sea el valor de este índice, mejor es el ajuste del modelo frente a los datos experimentales.

3.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

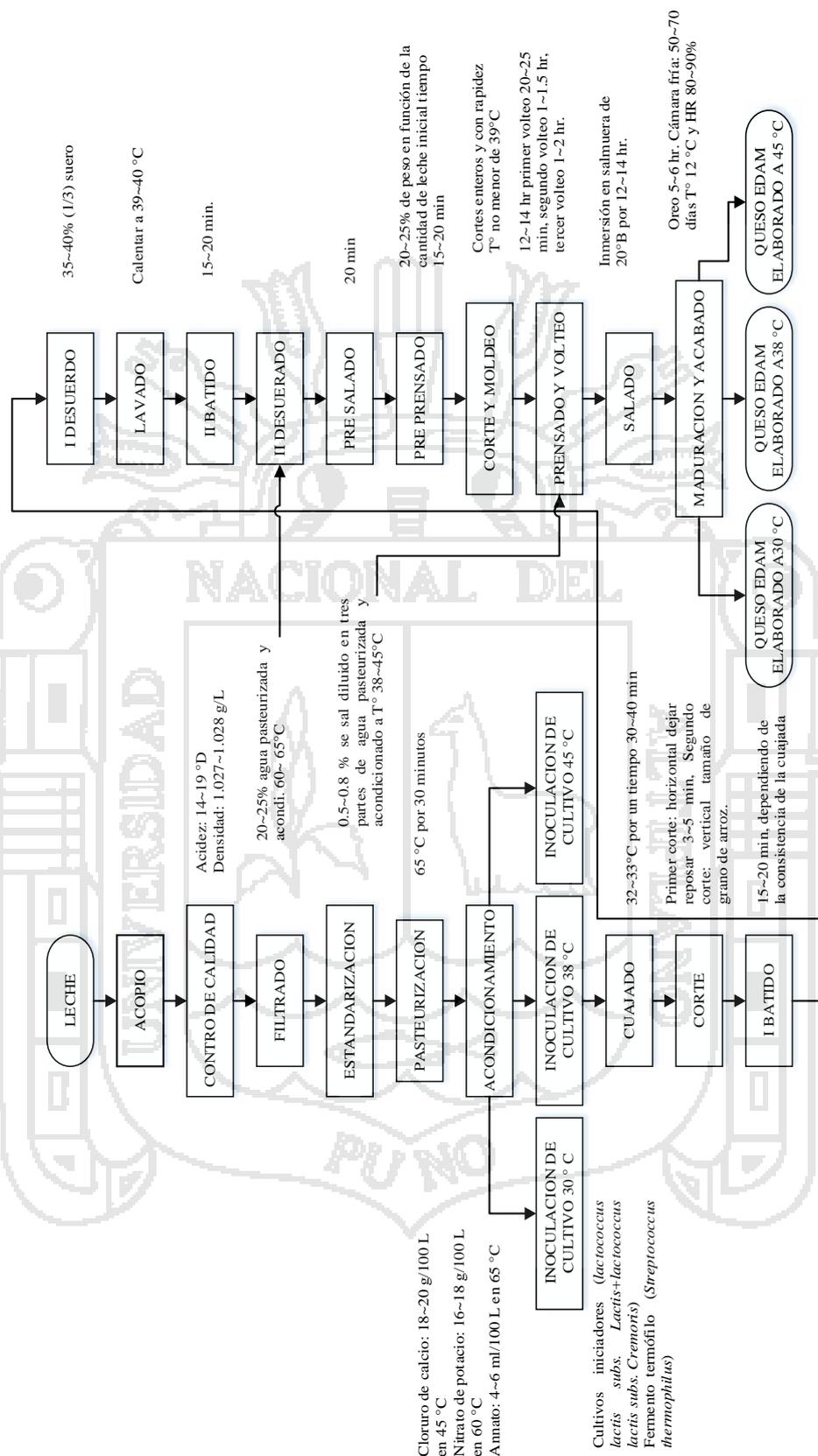


Figura 3. Diagrama de flujo de elaboración de queso Edam

3.3.1. Descripción del proceso de queso tipo Edam

a) **Recepción.**- A partir de las 7:30 am la leche es transportada desde el Establo hacia la planta para sus respectivos controles organolépticos y fisicoquímicos luego es transportada a la planta piloto de procesamiento de lácteos de la escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial UNA-PUNO.

b) **Filtrado.**- El filtrado se hace con la finalidad de eliminar todas las impurezas físicas y visibles, en la leche para ello se utilizó filtros de tela.

c) **Pasteurización.**- La leche se sometió a tratamiento térmico para la destrucción de los microorganismos patógenos a temperatura 65°C manteniendo durante 30 minutos.

d) **Acondicionamiento.**- Se realizó el enfriado a temperaturas 30 °C, 38 °C y 45 °C de manera que en este proceso se va adicionar los cultivos iniciadores, adición de nitrato de potasio (KNO₃). Esta sustancia conservadora apta para quesos madurados, Inhibe el crecimiento de bacterias patógenas que producen gases perjudiciales y evita la contaminación posterior del futuro queso, se adiciona a una dosis 1.7 g/kg. Cloruro de calcio (CaCl₂) Mineral fortificante a una dosis 1.9 g/kg.

e) **Adición de cultivos iniciadores.**- (*Lactococcus lactis subsp. lactis*, y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* y *Streptococcus thermophilus*) RSF-742 CHR HANSEN. Se procedió la inoculación directa que las bacterias lácticas están en sobre liofilizado que se adiciona directamente a la leche, se activó a temperaturas de 30°C, 38°C y 45°C, durante 60 minutos.

f) **Cuajado.**- La temperatura para la cuajada se acondicionó a 35°C el cuajo preparado en agua fría hervida bien disuelto el cuajo quimosina a una dosis 2g/20 L. Según su norma del cuajo de (CHY-MAX® M) CHR HANSEN durante el tiempo de cuajado 30 minutos desde luego ver con el cuchillo la cuajada.

g) **Primer corte.**- El corte se realizó por medio de liras; la lira horizontal pegada a la pared de la paila se procede a cortar en una misma dirección dando un giro al 180° regresando por la paralela al otro extremo, dejando reposar 2 minutos, de la misma manera con la lira vertical se cortó, dando reposo 3 minutos, tamaño uniforme de medio a un centímetro cubico, grano que se debe lograr grano de arroz o guisantes, el corte se hace en forma de suave constante pero firme a fin de no mover o dispersar la cuajada y producir pérdidas.

h) **Primer batido.**- se realizó un batido lento para no romper los granos, pero a su vez, se evita que se aglomeren y se observa como esta cuajada. A medida que los granos van aumentando su consistencia, el batido va en aumento. Este primer batido demora 15 minutos.

i) **Primer desuerado.**- El desuerado se efectuó de manera más rápida para evitar que se adhieran mesiado los granos entre sí, hasta que aflore la cuajada para que la actividad del fermento se detenga la acidificación, el volumen del suero se extrae a 35% de total del volumen inicial de la leche, la acidez del suero muestra 12 °D, de manera que estamos en los rangos indicados de acuerdo a la literatura.

j) **Lavado y cocción.**- El agua tiene el objeto contraer de la cuajada lo que incrementa la expulsión del suero del grano, cargado de lactosa y ácido láctico al diluir la lactosa para bajar la acidez, manteniendo a temperatura de 39 ~ 40 °C para mejorar la textura de la cuajada. El agua hervida enfriada a temperatura de 65 ~ 70°C se agrega 20% del volumen inicial de la leche, para que intensifique el desuerado, la acidez del suero debe bajar a 10 °D.

k) **Segundo batido.**- Este batido se realizó más rápido de 20 ~ 30 min, donde el grano endurece y se forma el punto maíz o arroz uniformemente. La masa debe de madurar obteniendo una textura semidura al momento de apuñarla con la mano no debe pegarse o deformarse.

l) **Segundo desuerado.**- En esta operación se retiró el suero con agua en un 4~5% con el fin de facilitar el pre prensado se retira el suero en una mínima proporción con fin de mantener la temperatura de 37 ~ 45 °C

m) **Pre salado.**- Se realizó con la finalidad de poder detener el desarrollo de algunos microorganismos patógenas, u otros bacterias para no obstaculizar la maduración del queso, la leche que se procesó con acidez de 18.5 °D, la sal se adiciono a la cuajada 0.2% disuelto 2 L. de agua hervida fría, desde luego homogenizando la cuajada.

n) **Pre prensado.**- Se realizó con la finalidad de lograr un buen desuerado y evitar el enfriamiento de la cuajada, para lo cual el peso se utilizó 20% de volumen inicial de leche bajo suero, el tiempo prensado 20 minutos, la ventaja es de no obtener los ojos mecánicos y nos facilita el moldeo.

o) **Moldeado.**- Se colocaron los granos cortados con cuchillo en cubo debidamente pesadas 1.8 kg a 1.3 kg. Presionando con la mano a los moldes rectangulares de inox, para dar forma al queso a temperatura 37 °C lo más rápido posible debe ser llenado al molde el cuajado caliente de modo que se logra buen compactado a buena textura.

p) **Prensado.**- Este proceso consistió en aplicar presión a las molderas para su mejor salida del suero ácido, proporcionando la forma del queso incrementando gradualmente la presión durante el tiempo de dos horas de la siguiente manera:

q) **Oreado.**- Este proceso se hizo con la finalidad de secado de la humedad superficial durante 10 horas, en el mismo ambiente de proceso a temperaturas ambientales.

r) **Salmuerado.**- Este proceso se hizo con la finalidad de salar al queso, bien por inmersión directa a baños de salmuera, debidamente controlada para 1kg.de queso:

- Tiempo de salado durante 12~13 horas.
- Concentración de sal en salmuera a 19~20 °Beaumé la densidad lectorado con salinómetro de calibración.15°C. NaCl 19%.
- Temperatura de salmuera 12°C.

La sal que se utilizó a 100% yodada marca VIVA (confianza y calidad) garantizado por laboratorios ELIRCH peruano.

s) **Maduración.**- los quesos antes de entrar a la cámara de maduración se realizó el oreo 5 horas, luego se introdujo a la cámara de maduración con temperaturas de 10 °C y con humedades relativas de 60 ~ 90%. El tiempo de maduración para este tipo de quesos fue 24 días, con el fin determinar el crecimiento máximo de los cultivos iniciadores, donde se controlaron y determinaron UFC/g, pH y %Acidez durante la maduración del queso Edam.

3.3.2. Determinación de parámetros y fisicoquímicos de crecimiento microbiano en queso tipo Edam

Se determinó los parámetros utilizando los modelos matemáticos Baranyi & Roberts, Gompertz y Logístico. Durante el periodo de 24 días, se evaluaron en 8 partes de cada tratamiento (queso Edam elaborado en activación de cultivos iniciadores a temperaturas 30, 38 y 45 °C).

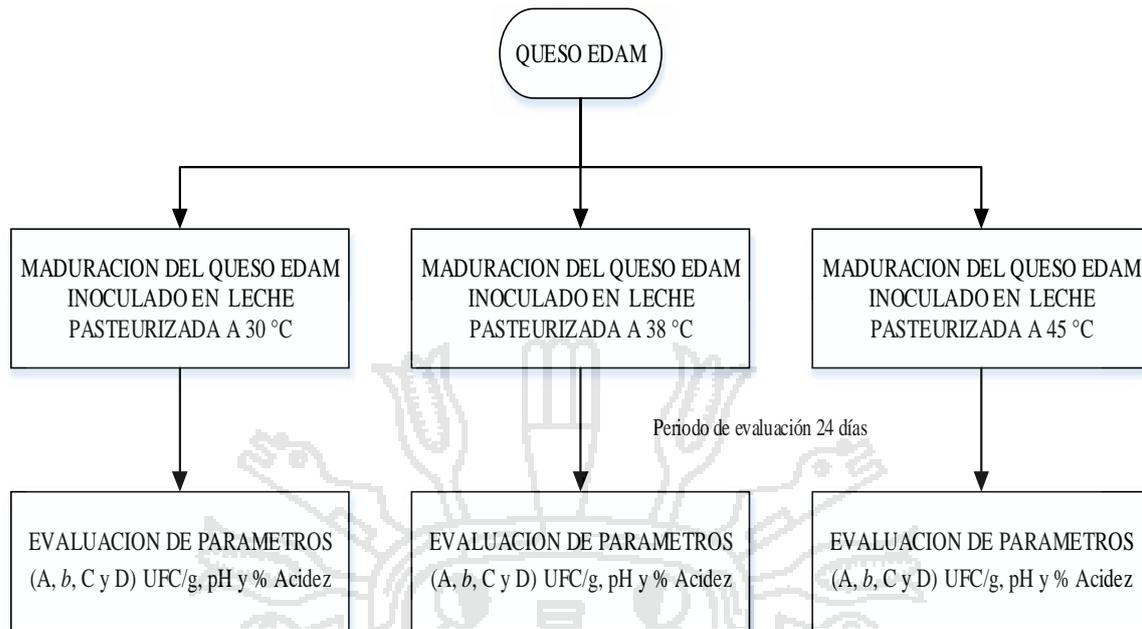


Figura 4. Diagrama de flujo para el estudio de UFC/g y fisicoquímico

3.4. UNIDADES DE ANÁLISIS Y OBSERVACIONES

3.4.1. Variables de estudio

a) Temperatura

- 30 °C
- 38 °C
- 45 °C

b) Tiempos de control (horas)

- | | |
|-------------|-------------|
| • 24 horas | • 336 horas |
| • 48 horas | • 240 horas |
| • 72 horas | • 408 horas |
| • 168 horas | • 576 horas |

3.4.2. Variables de respuesta

a) Características microbiológicas

- UFC/g
- Parámetros:

A =Logaritmo común de la población inicial en UFC/g

b =Pendiente de la curva

C = Logaritmo común de la población final en la fase estacionaria

D = Tiempo en el cual la tasa de crecimiento es de mayor magnitud
= Fase de latencia

T_g = Tiempo de generación

b) Propiedades físicas

- pH
- % Acidez

c) Validación de los modelos

- Modelos: Baranyi & Roberts
Gompertz
Logístico

3.5. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

3.5.1. Análisis de crecimiento de cultivos iniciadores con modelos matemáticos

Los datos en crecimiento de (UFC/g) para cada temperatura fueron incorporados como variable dependiente en los modelos de crecimiento, mientras que el tiempo de crecimiento (t) se incorporó como variable independiente. Se realizó un análisis de regresión con los modelos de Baranyi & Robertz, Gompertz y Logístico por medio de algoritmo de Marquardt para encontrar en el ajuste los parámetros de regresión (A , b , C y D).

$$\text{Log } N = C + \ln\left(\frac{-1 + \exp(b^*D) + \exp(b^*t)}{-1 + \exp(b^*t) + \exp((b^*D) + C - A)}\right) \dots\dots\dots(10)$$

$$\text{Log } N = A + (C - A) * \exp(-\exp(-b^*(t - D))) \dots\dots\dots(11)$$

$$\text{Log } N = A + \left(\frac{C - A}{1 + \exp\left(\frac{4 * b^*(D - t)}{C - A} + 2\right)}\right) \dots\dots\dots(12)$$

Donde:

- LogN* : Logaritmo común de la poblaciones bacterianas (UFC/ml)
- t* : Periodo de incubación, es la variable independiente (horas)
- A* : Logaritmo común de la población inicial en UFC/ml (inóculo)
- C* : Logaritmo común de la población final en la fase estacionaria
- b* : Representa la pendiente de la curva y describe la tasa de crecimiento
- D* : Tiempo en el cual la tasa de crecimiento es de mayor magnitud.

Utilizando los parámetros de ajuste de los modelos de Baranyi & Robertz , Gompertz y Logístico, se calcularon la fase de adaptación (λ), la tasa máxima de crecimiento exponencial (μ_{max}) y el tiempo de generación (Tg), como descriptores microbiológicos a ser utilizados para efectos de predicción de la población en un tiempo dado y en cada temperatura incluida en el estudio (30, 38 y 45 °C), a tal efecto, se utilizaron las siguientes expresiones matemáticas:

$$\text{Fase de latencia o adaptación } (\lambda) : \lambda = D - \frac{1}{b} \dots\dots\dots(13)$$

$$\text{Tiempo de generación } (Tg) : T = \ln 2 \frac{e}{b} \dots\dots\dots(14)$$

$$\text{Tasa específica de crecimiento } (\mu_{max}) : \mu_m = \frac{b}{e} \dots\dots\dots(15)$$

$$\text{Para modelo matemático logístico} : \lambda = D - \frac{2}{b} \dots\dots\dots(16)$$

$$T = \ln 2 \frac{4}{b} \dots\dots\dots(17)$$

3.5.2. Determinación de Acidez y pH, en la maduración del queso tipo Edam

Para procesar los datos obtenidos durante la investigación se aplicó el análisis de varianza (ANOVA), con un 95.0% de significancia y el test de Tukey ($P = 0.05$) para determinar las posibles diferencias entre las muestras de las tres temperaturas diferentes. Se trabajó con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI (Statistical Graphics Corp.).

Las variables de estudio fueron las temperaturas y tiempo de maduración del queso Edam. Se utilizó un experimento factorial bajo el diseño completo al azar (DCA) con 3 repeticiones, ajustado al siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \dots\dots\dots(18)$$

$i = 1, 2, 3, \dots, 12$ (tiempos de crecimiento de cultivos iniciadores)

$j = 1, 2, 3$ (temperatura)

$k = 1, 2, 3$ (determinación)

Donde:

Y_{ijk} = Es la variable de respuesta del k -ésimo determinación bajo el j -ésimo temperatura sujeto al i -ésimo tiempo de crecimiento.

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

α_i = Efecto del i – ésimo nivel de tiempos de crecimiento.

β_j = Efecto del j – ésimo temperaturas

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción del i – ésimo nivel de tiempo, en el j – ésimo nivel de temperatura.

ε_{ijk} = efecto del error experimental.

Para la recolección de datos se utilizó el formato mostrado en la Tabla 4, donde se registraron todos los datos experimentales para cada variable de respuesta.

3.5.3. Validación de los modelos matemáticos Baranyi & Roberts, Gompertz y Logístico

De acuerdo con Baranyi *et al.* (1999). “Presentado con los modelos predictivos” y Cabeza, (2013) “metodología para la validación de los modelos”, procedemos la validación con los siguientes ecuaciones mostrados a continuación.

$$\mu_m = C_0 - C_1T + C_2T^2 \dots\dots\dots(19)$$

Donde:

- μ_{max} : Máxima velocidad de crecimiento
- C_0, C_1 y C_2 : Coeficientes de la ecuación cuadrática
- T : Temperatura

a) Factor de sesgo (B_f)

$$B_f = 10 \left| \frac{\sum (\frac{\mu_{Est}}{\mu_{Obs}})}{n} \right| \dots\dots\dots(20)$$

Donde:

- N : Número de observaciones usadas en el calculo
- μ_{Est} : Velocidad de crecimiento estimado
- μ_{Obs} : Velocidad de crecimiento observado

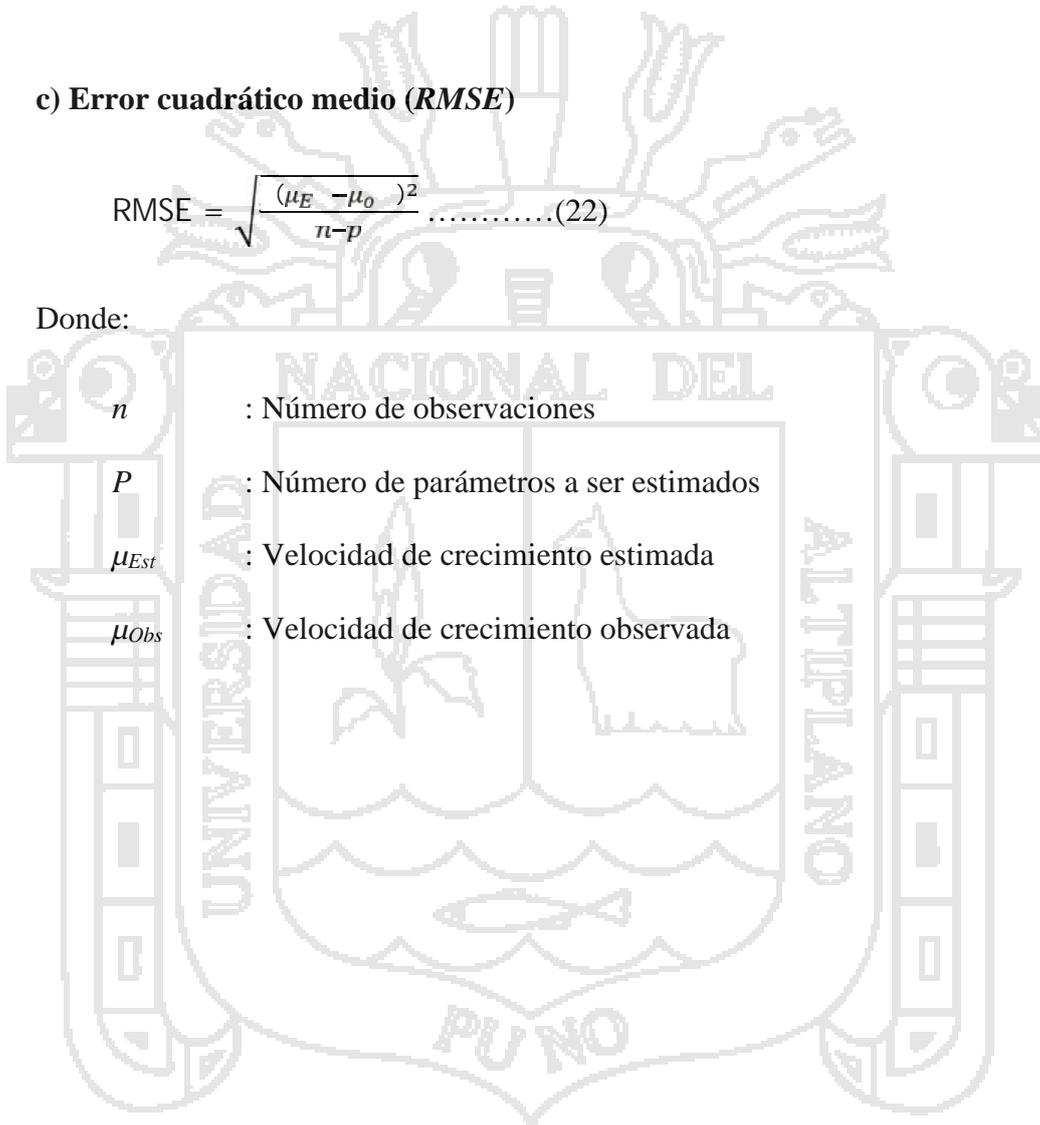
b) Factor de exactitud (A_f)

$$A_f = 10^{\left| \frac{|\mu (\frac{\mu_E}{\mu_O})|}{n} \right|} \dots\dots\dots(21)$$

c) Error cuadrático medio ($RMSE$)

$$RMSE = \sqrt{\frac{(\mu_E - \mu_o)^2}{n-p}} \dots\dots\dots(22)$$

Donde:



- n : Número de observaciones
- P : Número de parámetros a ser estimados
- μ_{Est} : Velocidad de crecimiento estimada
- μ_{Obs} : Velocidad de crecimiento observada

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DEL CRECIMIENTO DE CULTIVOS INICIADORES DURANTE LA MADURACIÓN EN QUESO EDAM CON MODELOS MATEMÁTICOS (Baranyi & Roberts, Gompertz y Logístico)

El presente estudio se evaluó mediante tres modelos matemáticos (Baranyi & Roberts, Gompertz y Logístico) los parámetros cinéticos de cultivos iniciadores (*Lactococcus lactis subs lactis*, *Lactococcus lactis subs cremoris* y *Streptococcus thermophilus*) en función del tiempo de maduración del queso Edam, tal como se detalla en materiales y métodos, con el fin de describir cuál, es la temperatura óptima en activación de cultivos iniciadores en leche pasteurizada inoculadas a 30, 38 y 45 °C, una vez realizada el proceso de elaboración de queso Edam se procedió a la cámara de maduración a un periodo de 576 horas para evaluar el crecimiento microbiano.

En la Tabla 6, se muestran los valores ajustados en los 24 a 576 horas de adaptación y crecimiento, debido a los tres tratamientos y tres modelos matemáticos. Los parámetros a 45 y 38 °C son menores con $A = 5.655$ y 5.756 , $b = 0.114$ y 0.147 . En la temperatura de activación muchas células bacterianas contenidas en el inóculo mueren y solo las que sobrevivieron establecieron la curva de crecimiento cuya población final en la fase estacionaria fue $C=8.010$ y 8.238 ; mientras que la temperaturas de 30 °C fueron mayores tasas de crecimiento con $A=5.952$, $b=0.224$, $C=8$. Cabe mencionar que en las temperaturas mayores a 38 °C se produce una disminución de la tasa de crecimiento en relación a 30 °C, debido a que muchas actividades metabólicas de la bacteria no se ejecutan eficientemente. Existe una elevada diferencia significativa de las temperaturas sobre los parámetros de

crecimiento y modelos matemáticos empleadas, y una elevada correlación $R^2 = 96.955$ indicando la bondad de los modelos matemáticos que ajustan los datos experimentales para describir el comportamiento del crecimiento de cultivos iniciadores y que la desviación estándar indica con una tendencia bastante aceptable.

Es importante resaltar que los parámetros ajustados al emplear las ecuaciones matemáticas para cada una de las temperaturas en estudio, se destaca que la mejor expresión del crecimiento es a los 30 °C, los cuales, reportan los siguientes autores: Zarate (2009) determinó los parámetros del estudio del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis subs lactis*, con parámetros $b = 0.51$ y $C = 5.82$ a temperatura 30 °C, Castro, *et al.* (2008), encontró resultados similares estableciendo que los mejores predicciones del crecimiento de *Lactococcus lactis subs lactis*, en leche descremada en función de temperatura a 33 y 30 °C, la tasa de crecimiento general con 0.512 y 0.559 respectivamente, Chacón (1992), reportó resultados parecidos, que los mejores aislamientos del género *Lactococcus* se efectúa a los 30 °C y la tasa de crecimiento general de 0.24 Log UFC/ml/h y Valbuena (2005) para el parámetro $b = 0.32$ y $D = 4.21$. El estudio reporta que la temperatura óptima es de 30 °C, donde el crecimiento logarítmico de la población final en la fase estacionaria es de 8.482 Log UFC/g/h y el tiempo para alcanzar el máximo crecimiento fue de 336 horas.

Tabla 6. Parámetros obtenidos durante la maduración del queso Edam

MODELOS PREDICTIVOS	TEMPERATURAS	A	b	C	D	R ²
BARANYI Y ROBERTZ	30 °C	5.952 ± 0.261	0.224 ± 0.108	8.482 ± 0.116	52.823 ± 6.329	96.955 ± 0.258
	38 °C	5.756 ± 0.345	0.147 ± 0.068	8.238 ± 0.141	49.728 ± 8.255	94.777 ± 0.315
	45 °C	5.655 ± 0.551	0.114 ± 0.083	8.010 ± 0.190	46.142 ± 15.509	88.903 ± 0.426
GOMPERTZ	30 °C	5.953 ± 0.258	0.152 ± 0.086	8.482 ± 0.116	53.358 ± 4.431	96.955 ± 0.258
	38 °C	5.776 ± 0.315	0.100 ± 0.049	8.238 ± 0.141	52.781 ± 4.885	94.777 ± 0.315
	45 °C	5.720 ± 0.427	0.081 ± 0.058	8.010 ± 0.190	51.195 ± 7.593	88.902 ± 0.426
LOGISTICO	30 °C	5.951 ± 0.263	0.130 ± 0.063	8.482 ± 0.116	48.686 ± 7.268	96.955 ± 0.258
	38 °C	5.750 ± 0.356	0.083 ± 0.037	8.238 ± 0.141	43.023 ± 10.402	94.777 ± 0.315
	45 °C	5.639 ± 0.592	0.061 ± 0.041	8.010 ± 0.190	36.931 ± 20.742	88.903 ± 0.426

Donde:

A : Logaritmo común de la población inicial en UFC/g (inoculo)

b : Pendiente de la curva y describe la tasa de crecimiento

C : Logaritmo común de la población final en la fase estacionaria

D : Tiempo en el cual la tasa de crecimiento es de mayor magnitud

R² : Coeficiente de determinación

En la Tabla 7, se muestran los parámetros cinéticos, fase de latencia () y la velocidad máxima de crecimiento exponencial (μ_{max}) se hacen mínimos, en la medida que la temperatura se incrementa, mientras que el tiempo de generación (T_g) muestra un comportamiento inverso.

Mediante los modelos secundarios, los parámetros cinéticos se destaca que la mejor expresión del crecimiento de cultivos iniciadores es a los 30 °C en los cuales se registran tiempo de generación (T_g) de 0.635 horas y velocidad máxima de crecimiento exponencial (μ_{max}) de 0.699 Log UFC/g/h y la fase de latencia () que requiere para duplicarse es de 48.359 horas. El parámetro () 4.144 con el modelo Logístico, indica que a mayor temperatura la fase de latencia siempre es menor, sin considerar que la activación de microorganismos tenga una determinada temperatura. Comparativamente encontramos Yousef & Carlstrom (2006) reportaron que la fase exponencial, el tiempo de generación (T_g) alcanza el valor más bajo y la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) el más elevado. Asimismo Lade & Chitanand (2006) obtienen valores de 1.89 horas, 1.16 Log UFC/ml/h y 0.22 horas respectivamente, Cayré & Garro (2007) hallaron para los mismos parámetros los siguientes valores, 1.78 horas, 1.35 Log UFC/ml/h y 0.19 horas estos datos permite afirmar que los ensayos realizados ofrecen respuestas fisiológicas bastante homogéneas de (*Lactococcus lactis subs lactis*, *Lactococcus lactis subs cremoris* y *Streptococcus thermophilus*) dentro su temperatura optima de crecimiento. A su vez, Neumeyer, *et al.* (1997) encontraron para el tiempo de generación (T_g) una relación de 1.50 para *Pseudomonas*, trabajando con datos expresados en transmitancia y Castillejo (2002) realizó estudios, con resultados similares; siendo la relación de $T_g = 1.17$ y 1.05 y la relación () 1.40 y 1.24 para *S. aureus* en aerobiosis y anaerobiosis respectivamente.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de crecimiento de cultivos iniciadores derivados de los modelos predictivos

MODELOS PREDICTIVOS	TEMPERATURAS		T_g	μ_{max}
BARANYI Y ROBERTZ	30 °C	48.359	0.635	0.699
	38 °C	42.925	0.676	0.445
	45 °C	37.37	0.896	0.336
GOMPERTZ	30 °C	46.779	0.635	0.474
	38 °C	42.781	0.993	0.303
	45 °C	38.849	1.261	0.239
LOGISTICO	30 °C	33.301	1.092	0.406
	38 °C	18.927	1.197	0.252
	45 °C	4.144	1.675	0.18

Donde:

t_l : Fase de latencia

T_g : Tiempo de generación

μ_{max} : Velocidad máxima de crecimiento exponencial

Las Figuras 5, 6 y 7 presentan las curvas obtenidas con los datos observados y ajustados por los diferentes modelos para la maduración del queso Edam. En ellas se aprecia también la similitud en el ajuste de los diferentes modelos a los datos observados experimentalmente. Debido a que los modelos Baranyi & Roberts y Gompertz y Logístico resultaron ser similares en el ajuste.

Castro, *et al.* (2008) compararon los modelos Gompertz, Logístico, Stannard y Richards, encontrando que los modelos Logístico y Gompertz ajustaron bien a los datos experimentales, aunque concluyeron que el modelo Gompertz fue que presentó los mejores para modelar el crecimiento del *Lactococcus lactis subs. Lactis* en leche estéril, Zwietering, *et al.* (1990) compararon los modelos de Gompertz, Logístico, Stannard y Richards encontrando que todos los modelos ajustaron bien, aunque concluyeron que el modelo de Gompertz fue suficiente para describir la curva de crecimiento bacteriano, debido en parte a su facilidad de ajuste. Quirino, *et al.* (1999) utilizaron cuatro modelos Sigmoidales Brody, Logístico, Gompertz y Richards para caracterizar la circunferencia escrotal en toros Nellore en crecimiento, utilizando la metodología de López (2008), para comparar los diferentes modelos, encontrando mayor error, menor R^2 y mayor dificultad (número de iteraciones) para el modelo Richard y el mejor modelo en este estudio resultó el modelo Logístico. Cayré, *et al* (2007) Compararon tres modelos primarios: Gompertz, Logístico y Baranyi, para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y *Brochothix* sobre emulsiones cárnicas para estimar los parámetros cinéticos de crecimiento: tiempo de latencia (), máxima velocidad específica de crecimiento (μ_{max}), los modelos Gompertz y Baranyi produjeron los mejores ajuste en la mayoría de los casos presentados.

4.1.1. Ajuste de curva con modelo matemático Baranyi & Roberts

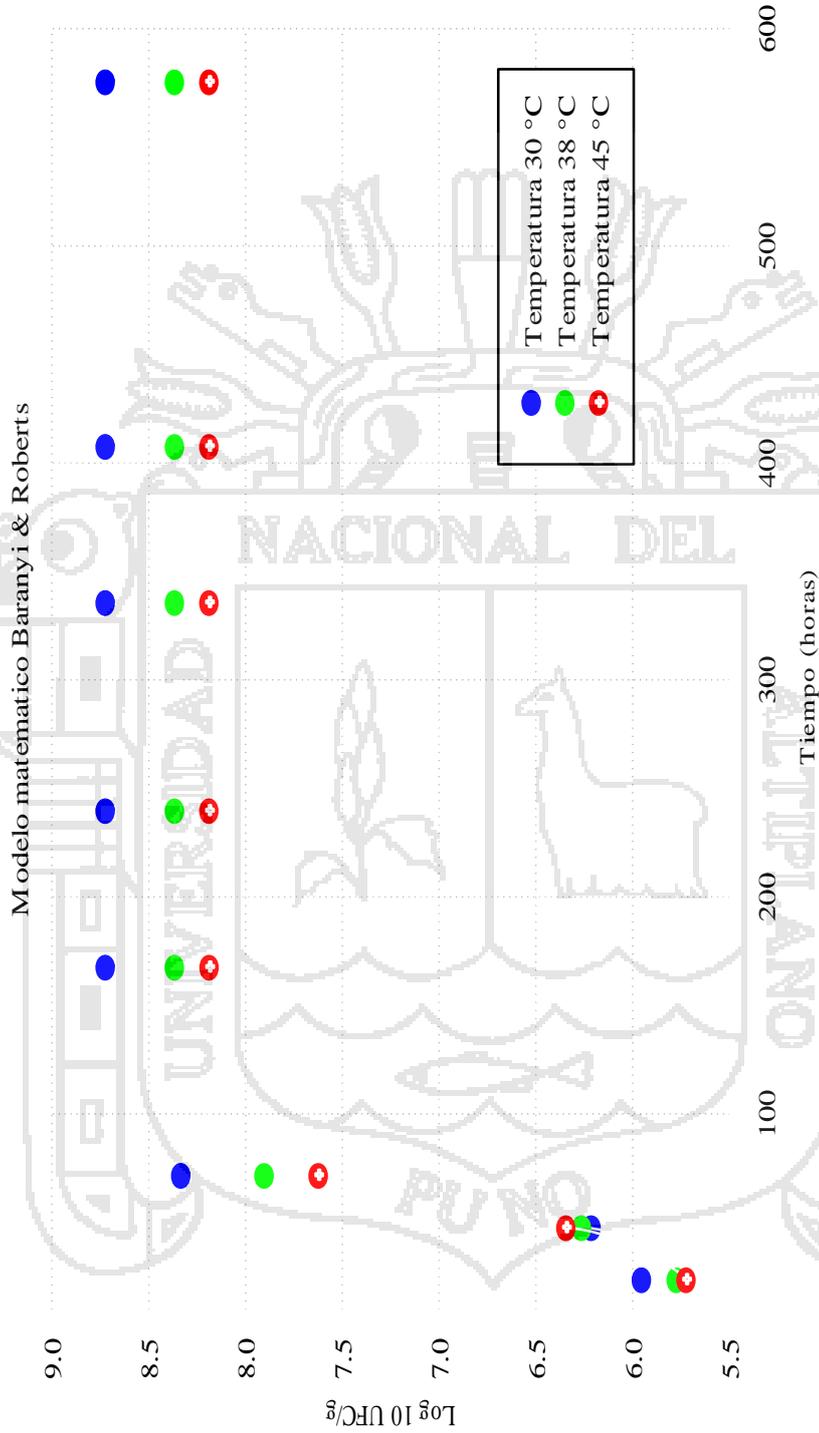


Figura 5. Curvas de crecimiento cinético del *Lactococcus lactis subs lactis*, *Lactococcus lactis subs cremoris* y *Streptococcus thermophilus* a 30, 38 y 45 °C, con modelo Baranyi & Roberts

4.1.2. Ajuste de curva con modelo matemático Gompertz

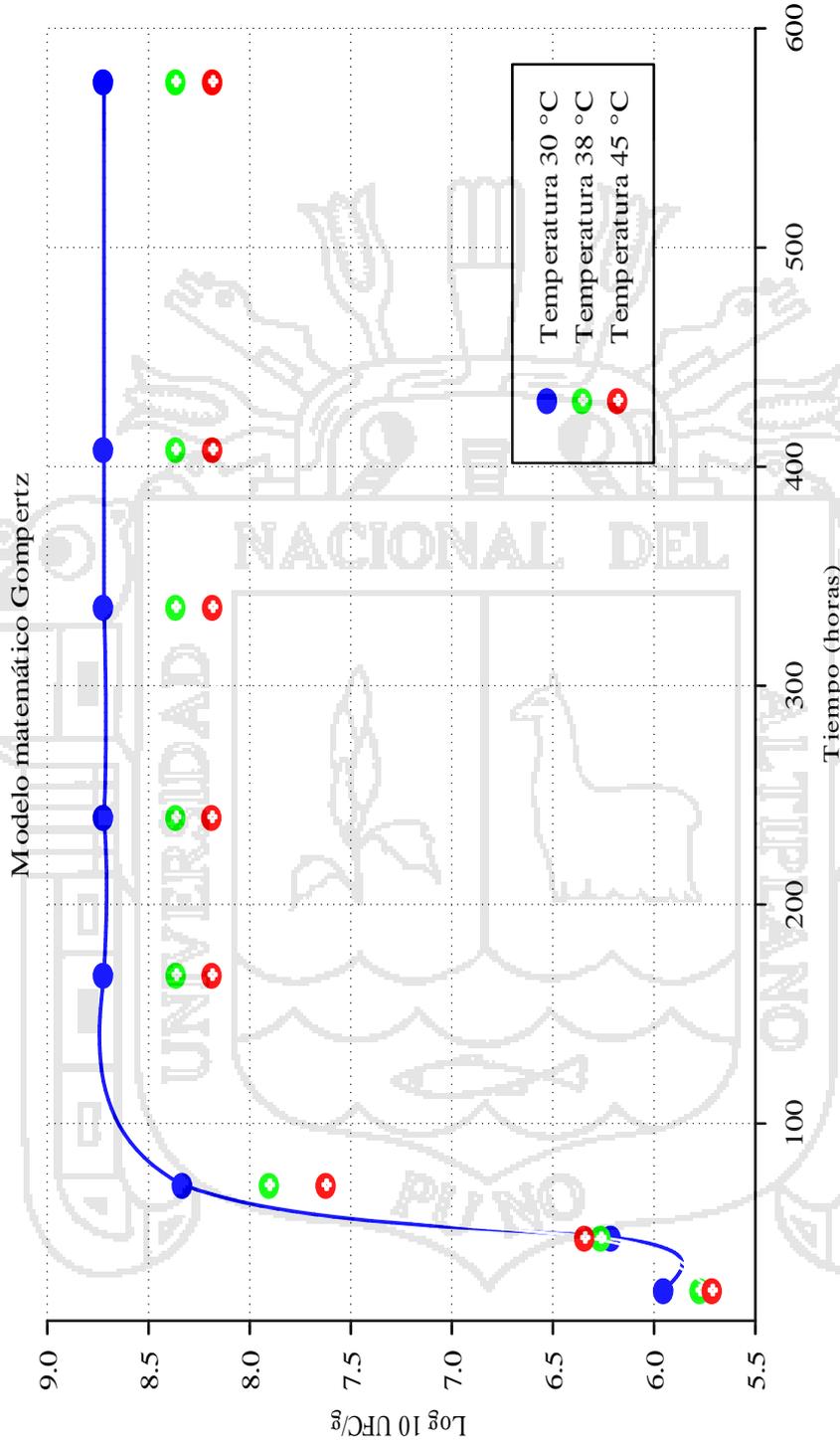


Figura 6. Curvas de crecimiento cinético del *Lactococcus lactis subs lactis*, *Lactococcus lactis subs cremoris* y *Streptococcus thermophilus* a 30, 38 y 45 °C, con modelo Gompertz

4.1.3. Ajuste de curva con modelo matemático Logístico

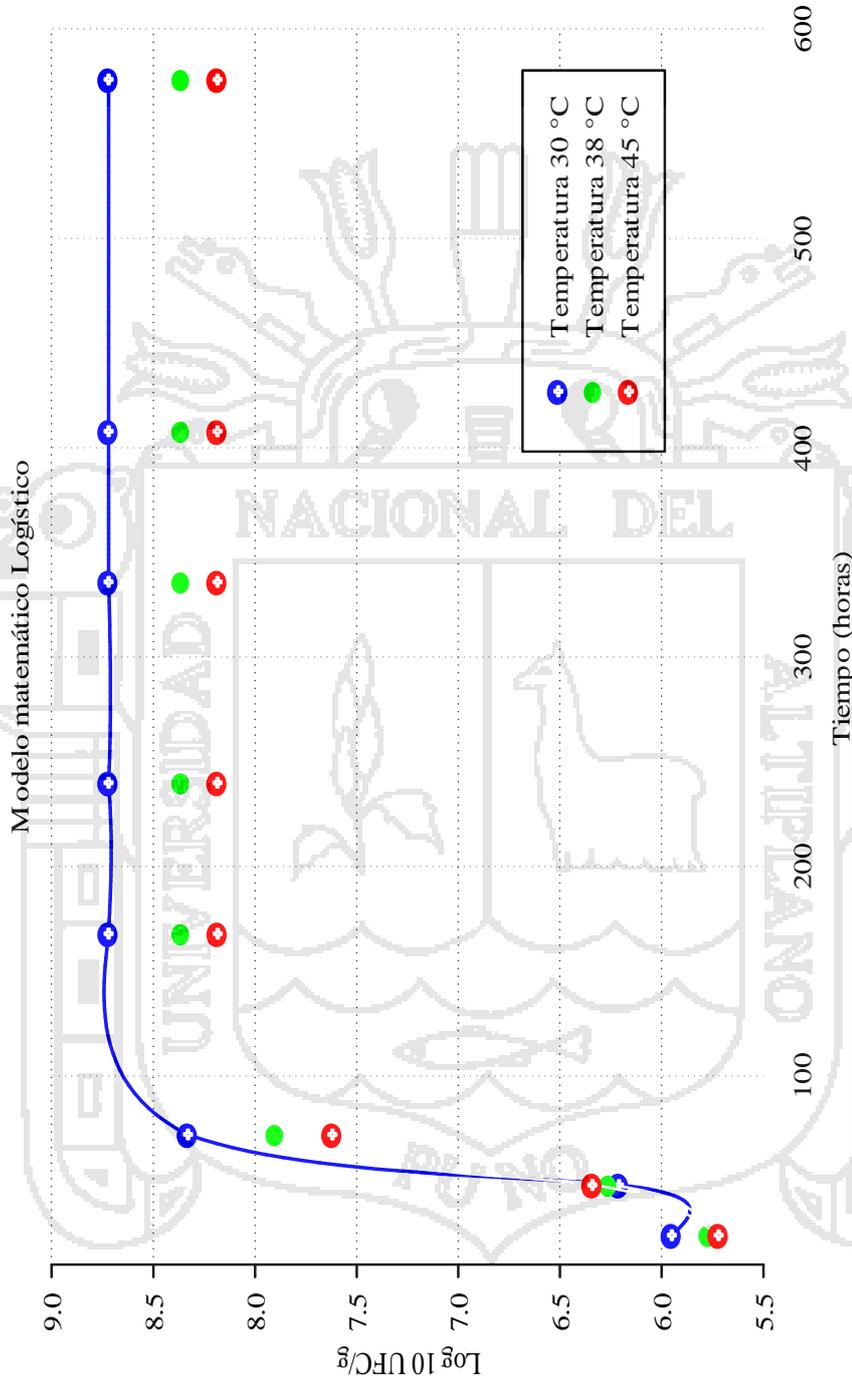


Figura 7. Curvas de crecimiento cinético del *Lactococcus lactis subs lactis*, *Lactococcus lactis subs cremoris* y *Streptococcus thermophilus* a 30, 38 y 45 °C, con modelo Logístico.

4.2. EVALUACIÓN DE pH y ACIDEZ DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO EDAM

4.2.1. Evaluación de pH en la maduración del queso Edam

Se evaluó la influencia de pH durante la maduración del queso Edam, en un periodo de 576 horas, con el fin de observar las características, procesos degradativos y desintegración biológica, sin embargo existen cambios bioquímicos por acción de cultivos iniciadores, adicionadas intencionalmente en la elaboración del queso Edam.

La Figura 8 y el Anexo 5 nos muestran, el periodo de maduración del queso Edam elaborado con cultivos iniciadores para diferentes temperaturas de activación. Se nota que el comportamiento con respecto a los tratamientos, el pH es diferente, lo que indica que estas cepas son adecuadas a 30 °C para ser utilizadas en un proceso de elaboración del queso Edam. Mientras que a 38 y 45 °C presentaron gran dificultad la evolución de pH, indicando que los cultivo iniciadores no son resistentes a estas temperaturas. Los valores alcanzados para el tratamiento a 30 °C, indican con 6.52 a las 24 horas, para luego descender a 5.95 a las 576 horas. Ccopa (2008) realizó un estudio del efecto de la temperatura y tiempo de calentamiento en la vida útil del queso con valores de pH = 6.323 máximo y pH = 5.00 mínimo, Hill (2007) reportó, durante el proceso de elaboración y de maduración del queso con características favorables de pH = 5.8 y 6.5, Núñez (1996) determinó el limite aceptable de pH = 3.13. Como se puede observar, los valores obtenidos en nuestra evaluación, indican que es aceptable dentro del rango descrito por estos autores.

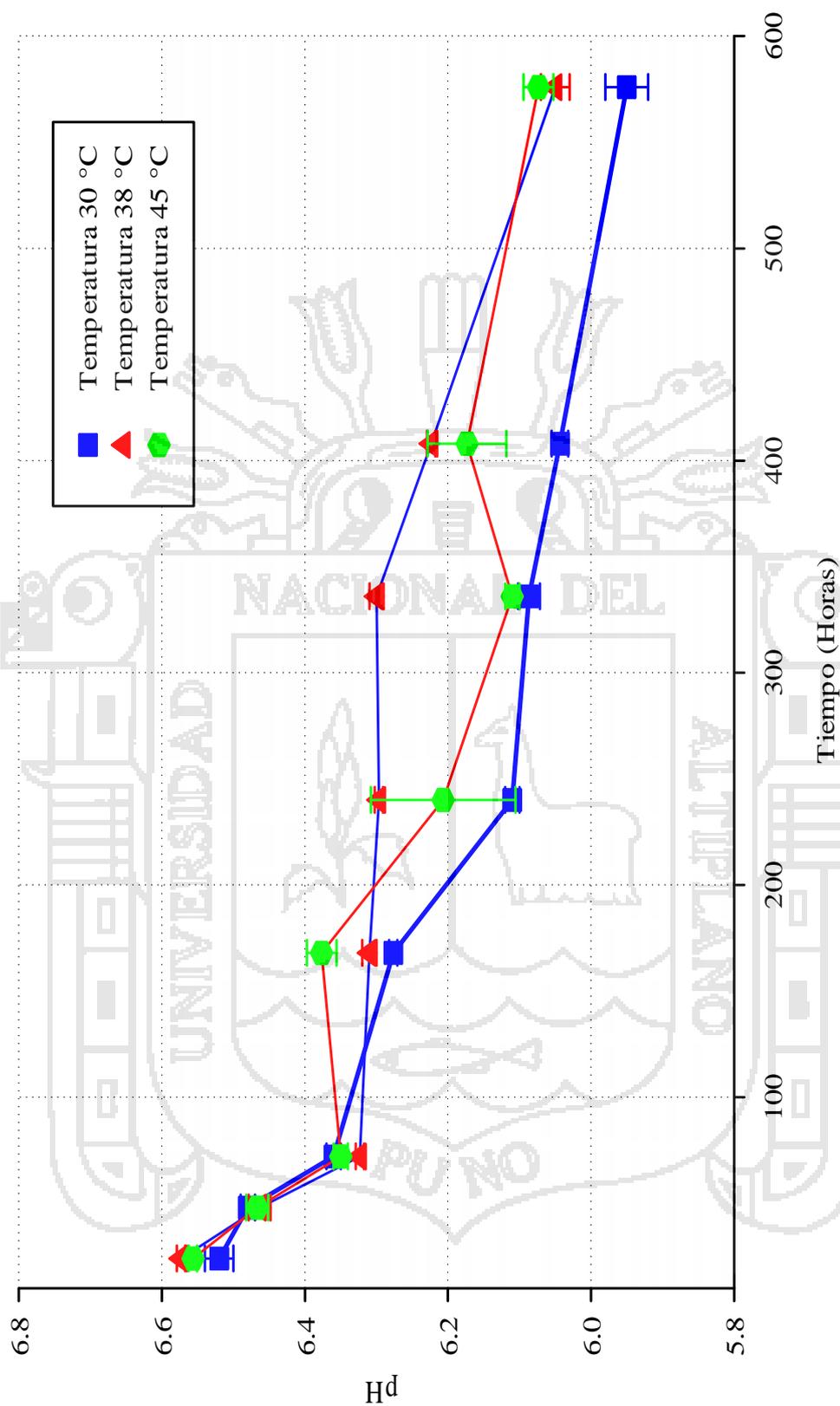


Figura 8. Evolución de pH durante la maduración en queso Edam

En la Tabla 8 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) para la evolución de pH, el cual nos indica una diferencia significativa ($P < 0.05$) para los factores tiempo y temperatura. Esto implica que estos factores es independiente a los tratamientos con un 95.0% de nivel de significancia.

Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) de Tukey para evolución de pH en maduración de queso Edam

F. de V.	G.L.	SC	CM	Fc	Significancia
TEMPERATURA(A)	2	0.0971211	0.0485606	65.58	**
TIEMPO(B)	7	1.91367	0.273382	369.21	**
AxB	14	0.134539	0.009609	12.98	**
Error Exp.	48	0.0355417	0.000740		
TOTAL	71	2.2202			

En la Tabla 9 se presenta el factor temperatura, se realizó la prueba de comparación múltiple Tukey se distingue de los tres tratamientos con resultados heterogéneas según las temperatura empleada. En el tratamiento a 30 °C la variación de pH fue significativa seguido de 45 y 38 °C presentan con similares características de pH: 6.28, 6.31 respectivamente.

Tabla 9. Pruebas de comparación múltiple de Tukey para pH por temperatura

Temperatura	Media
30 °C	6.22833± 0.0160389a
45 °C	6.28844± 0.0156701 b
38 °C	6.31750± 0.0159169 c

n=24

Para el factor tiempo se realizó la prueba de comparación múltiple Tukey con un nivel de significancia de 95.0% Tabla 10. En los resultados de esta prueba se distinguen 2 grupos con resultados similares que son 408, 240, 168 y 72 horas, se observó que el pH vario de forma sustancial e influyó el crecimiento de cultivos iniciadores adicionadas intencionalmente.

Tabla 10. Pruebas de comparación múltiple Tukey para pH por tiempo

Tiempo (horas)	Media
576	6.02250 ± 0.0263233a
408	6.14667 ± 0.0257915 b
336	6.20444 ± 0.0257915 b
240	6.16556 ± 0.0257915 c
168	6.32111 ± 0.0257915 d
72	6.34444 ± 0.0257915 d
48	6.47000 ± 0.0257915 e
24	6.55000 ± 0.0257915 f

n=9

4.2.2. Evaluación de % ácido láctico del queso Edam

La Figura 9 y en el Anexo 5, nos muestra el periodo de maduración del queso tipo Edam elaborado con cultivos iniciadores a diferentes temperaturas en activación. Se observa a 30 °C se encuentra entre las mejores en acidificación lográndose con % ácido láctico de 0.017 a 0.091. Los cultivos utilizadas requieren mucho las condiciones adecuadas para crecer, por ello es importante determinar la temperatura adecuada en el inóculo de cultivos en leche y con su actividad fermentativa proporciona a los quesos sus extraordinarias organolépticas. A 38 y 45 °C se muestra la evolución de % ácido láctico, con valores muy reducidos de 0.054, indicando que las cepas empleadas, no son resistencia mayor a 38 ° C. Ccopa (2008) reportó el límite aceptable de acidez expresado en porcentaje de ácido láctico, mediante evaluación sensorial del queso, el límite máximo aceptable de consumo Acidez = 0.030 ~ 0.170 % ácido láctico. Núñez (1996) determino el límite máximo aceptable de consumo, acidez = 0.23% de ácido láctico, que presentó en el queso. Se observa los valores obtenidos en nuestro estudio dentro del rango descrito por estos autores.

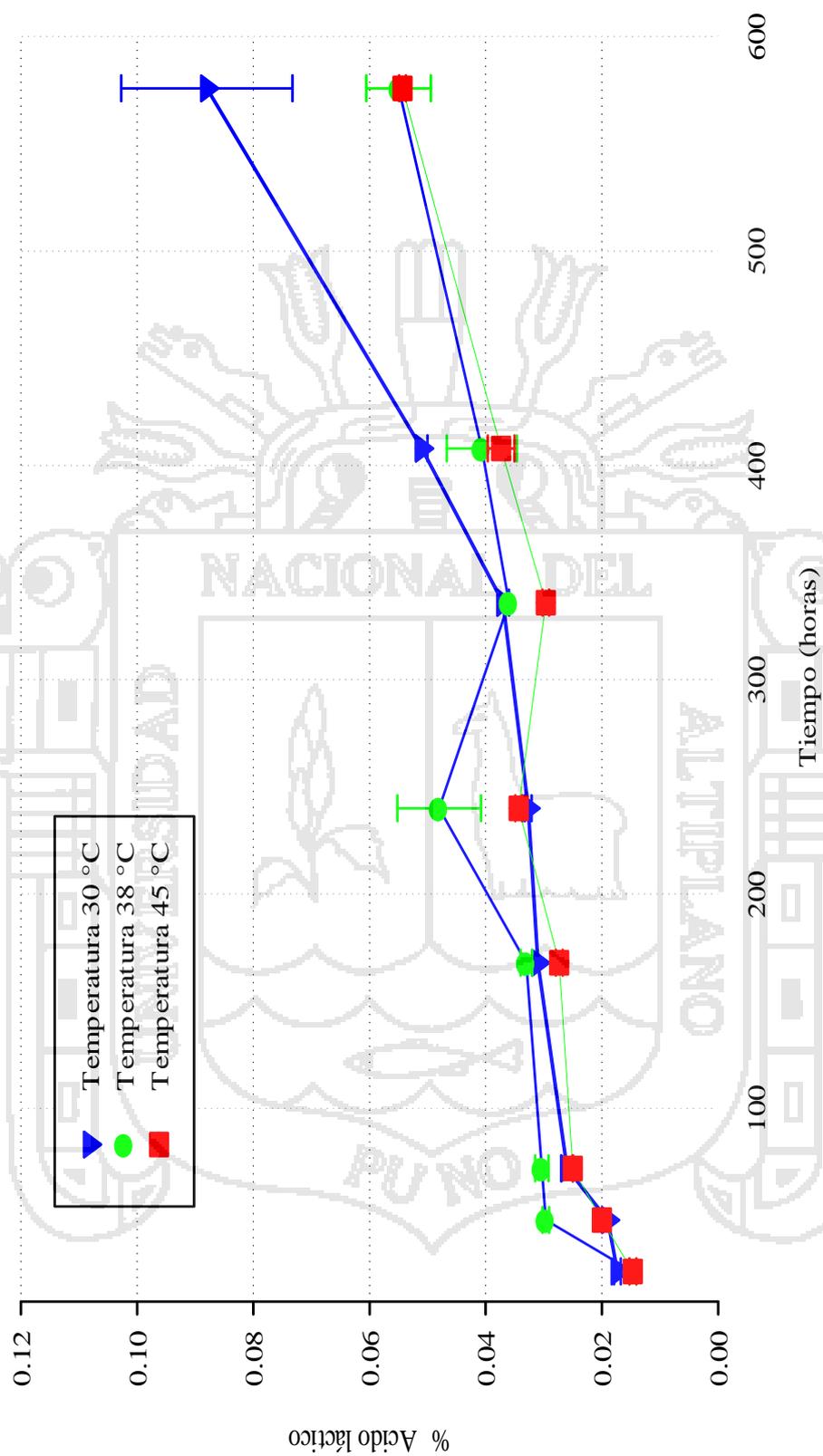


Figura 9. Evolución de Acidez durante la maduración en queso Edam

En la Tabla 11 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) para la evaluación de % ácido láctico, el cual nos indica que existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) para los factores temperatura de activación y tiempo de maduración en queso. Esto implica que los factores son independientes con respecto a los tratamientos con nivel de significancia de 95.0%.

Tabla 11. Análisis de varianza Tukey (ANOVA) para evolución de Acidez en maduración de queso Edam

F. de V.	G.L.	SC	CM	Fc	Significancia
TEMPERATURA(A)	2	0.000716	0.000358	24.56	**
TIEMPO(B)	7	0.014669	0.002096	143.69	**
AxB	14	0.002651	0.000189	12.98	**
Error Exp.	48	0.0007	0.000015		
TOTAL	71	0.018736			

Para el factor temperatura se realizó la prueba de comparación múltiple Tukey (ver tabla 12) en las muestras evaluadas del queso, la variación de % ácido láctico fue significativo con respecto a los tratamientos 30 y 38 °C con valores de 0.0378 y 0.0359 es decir que representa los mejores tratamientos en la activación de cultivos iniciadores durante la elaboración del queso Edam.

Tabla 12. Pruebas de comparación múltiple Tukey para acidez por temperatura

Temperatura	Media
30 °C	0.0378 ± 0.0159a
38 °C	0.0359 ± 0.0091a
45 °C	0.0303 ± 0.0086 b
n=24	

Para el factor tiempo se realizó la prueba de comparación múltiple Tukey con un nivel de significancia de 95.0 % (ver Tabla 13). en los resultados de esta prueba se distinguen dos grupos con resultados similares que son 408 y 240; 240 y 336; 336 y 168; 168 y 72 horas, es decir el % ácido láctico para el tiempo 576 horas representa muy significativo con respecto al tiempo de maduración del queso Edam.

Tabla 13. Pruebas de comparación múltiple Tukey HSD para acidez por tiempo

Tiempo (horas)	Media
576	0.0659 ± 0.0312a
408	0.0430 ± 0.0082 b
240	0.0385 ± 0.0038 bc
336	0.0341 ± 0.0006 cd
168	0.0304 ± 0.0043 de
72	0.0270 ± 0.0077 ef
48	0.0232 ± 0.0115 g
24	0.0156 ± 0.0191 h

n=9

4.3. VALIDACIÓN DE LOS MODELOS MATEMÁTICOS (Baranyi & Roberts, Gompertz y Logístico)

La validación matemática fue cuantificada por medio del cálculo de los índices A_f , B_f y $RMSE$ los cuales proporcionan un objetivo resumen de la fiabilidad de los modelos predictivos.

4.3.1. Modelamiento primario

En la Tabla 14, se muestra los datos experimentales de los tres modelos matemáticos sobre la velocidad máxima de crecimiento exponencial (μ_{max}) y coeficiente de determinación (R^2) de temperaturas 30, 38 y 45 °C en estudio. En este caso el factor más determinante en el crecimiento de cultivos iniciadores es la temperatura 30 °C a mayor temperatura se produce una disminución de (μ_{max}) y la bondad de ajuste es de $R^2 = 0.970$, seguido para temperatura 38 °C $R^2 = 0.948$ finalmente a 45 °C $R^2 = 0.889$.

Tabla 14. Velocidad máxima observada y error estándar del ajuste de los datos obtenidos para el crecimiento de cultivos iniciadores en función de la temperatura

MODELOS PREDICTIVOS	TEMPERATURAS	μ_{max} Obs(Ln UFC/g*Horas)	R^2
BARANYI Y ROBERTZ	30 °C	0.699	$0.970 \pm 2.58E-03$
	38 °C	0.445	$0.948 \pm 3.15E-03$
	45 °C	0.336	$0.889 \pm 4.26E-03$
GOMPERTZ	30 °C	0.474	$0.970 \pm 2.58E-03$
	38 °C	0.303	$0.948 \pm 3.15E-03$
	45 °C	0.239	$0.889 \pm 4.26E-03$
LOGISTICO	30 °C	0.406	$0.970 \pm 2.58E-03$
	38 °C	0.252	$0.948 \pm 3.15E-03$
	45 °C	0.180	$0.889 \pm 4.26E-03$

4.3.2. Modelamiento secundario

En la Tabla 15 muestra la determinación del efecto de la temperatura sobre velocidad máxima de crecimiento exponencial (μ_{max}) de cultivos iniciadores, es el desarrollo de modelo secundario, generados mediante una función polinómica tal como se detalla la ecuación 19 descrito en métodos y análisis, al analizar obtenemos los coeficientes que corresponden a los valores obtenidos mediante ajuste de regresión cuadrática.

Tabla 15. Valores generados con programa Curve Expert mediante el ajuste de regresión cuadrática

COEFICIENTES	BARANYI Y ROBERTZ	GOMPERTZ	LOGISTICO
C ₀	2.868	2.045	1.668
C ₁	0.104	0.077	0.060
C ₂	0.001	0.001	0.001

4.3.3. Validación de los modelos

Esta validación de los modelos predictivos desarrolla a una situación práctica, de esta forma, determinar que el modelo predice con exactitud el comportamiento de microorganismos estudiados en maduración del queso Edam. La validación matemática de ha realizado con datos experimentales obtenidos en condiciones de activación de cultivos en distintas temperaturas a las de los modelos empleados, pero dentro de los rangos establecidos. Para obtener estos nuevos valores se siguió la metodología citado por Cabeza (2013) propuso como medida para evaluar el desempeño de los modelos matemáticos usados en microbiología predictiva, el factor sesgo (B_f), factor exactitud (A_f) y raíz del error cuadrático medio ($RMSE$).

Tabla 16. Tabla de frecuencias para la validación del modelo generado

MODELOS	TEMPERATURAS	μ_{max} Obs (Ln UFC/g*Horas)	μ_{max} Est (Ln UFC/g*Horas)	Pre factor B_f	(Est-Obs)^2
BARANYI & ROBERTS	30 °C	0.699	0.726	0.016	7.15E-04
	38 °C	0.445	0.489	0.040	1.88E-03
	45 °C	0.336	0.397	0.073	3.75E-03
GOMPERTZ	30 °C	0.474	0.474	-0.0003	1.64E-03
	38 °C	0.303	0.303	-0.0001	4.19E-03
	45 °C	0.239	0.239	0.0006	8.19E-03
LOGISTICO	30 °C	0.406	0.405	-0.001	2.98E-07
	38 °C	0.252	0.251	-0.001	7.04E-07
	45 °C	0.180	0.179	-0.003	1.32E-06

En la Tabla 16, se observa que los valores experimentales para (μ_{max}) de cultivos iniciadores fueron, en general muy similares a los valores estimados por modelos predictivos. Los resultados obtenidos para el estadístico error cuadrado medio (*RSME*) mostraron desviaciones muy reducidas para los tres modelos, con valores de 0.056, 0.000 y 0.001 respectivamente. Con relación a los valores de B_f , se observa que el modelo de Gompertz asociado a conjunto fue el que mejor estimó la velocidad máxima de crecimiento exponencial (μ_{max}), ya que presenta un valor de 1.000, y para el resto de los modelos Baranyi & Roberts y Logístico, también fueron próximos a 1 $B_f = 1.1004, 0.996$ respectivamente. Estos índices, superiores o inferiores a la unidad, nos indica que las predicciones obtenidas con estos modelos sobrestiman la (μ_{max}) ya que los valores estimados son más elevados y bajos que los observados (ver Tabla 17). Esto indica que los valores estimados y observados para los modelos Baranyi & Roberts y Gompertz se encuentran en la línea de equivalencia, por lo que no existe una gran diferencia entre los valores es decir, se encuentran muy próximas a la unidad y para el modelo Logístico los detalles presentan lo contrario.

Tabla 17. Índice matemático y estadísticos obtenidos para los modelos de crecimiento de cultivos iniciadores

INDICES MATEMÁTICOS			
MODELOS PREDICTIVOS	B_f	A_f	<i>RMSE</i>
BARANYI & ROBERTS	1.104	1.104	0.056
GOMPERTZ	1.000	1.000	0.000
LOGISTICO	0.996	1.004	0.001

En la literatura se ha encontrado numerosos estudios científicos que hacen referencia a los índices de validación matemática, B_f y A_f , para velocidad máxima de crecimiento exponencial de diversos microorganismos. Rodríguez (2003) realizó un estudio de los índices de validación en bacterias Aerobiosis y Anaerobiosis para la predicción de vida comercial de productos cárnicos, en el cual las estimaciones más ajustadas se obtuvieron $B_f = 1.00$ y $A_f = 1.09$ indicando que existe muy buen ajuste entre los valores experimentales y los valores estimado a partir de los modelos empleados. (Barco, 2001) realizó un estudio con *E. coli* 0157: H7, en el cual las estimaciones más ajustadas se obtuvieron mediante el modelo de regresión ($B_f = 0.88$ y $A_f = 1.54$). Para este mismo parámetro y el microorganismo patógeno *S. aureus*, Castillejo (2002) observó valores para los índices de validación de $B_f = 1.13$ y $A_f = 1.71$ mediante el modelo de Respuesta en Superficie en aerobiosis. Como se puede observar, los índices obtenidos en nuestro estudio se sitúan dentro del rango descrito por estos autores, e incluso son mejores, ya que se aproxima más a la unidad.

V. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación se concluye que:

La temperatura favorable para el crecimiento de cultivos iniciadores es 30 °C ya que se activan y permite describir de mejor manera, el tiempo generación (T_g) y velocidad máxima de crecimiento exponencial (μ_{max}), que son indicadores para el manejo de los cultivos iniciadores.

El pH y acidez del queso Edam, a temperatura 30 °C fue la de mayor poder y velocidad de acidificación, lo que contribuyó mejor crecimiento microbiano del queso objeto de este estudio, lo que indica son apropiados para su fabricación.

Los modelos, Baranyi & Roberts y Gompertz, mostraron predicciones exactas sobre la velocidad máxima de crecimiento exponencial (μ_{max}); y en cuanto a la validación de los modelos, el factor sesgo (B_f) y factor exactitud (A_f), igualaron a la unidad, considerándose como seguros para describir los parámetros y ajuste de la curva de crecimiento.

VI. RECOMEDACIONES

Se recomienda realizar la comparación de los modelos con mayor cantidad de datos y bajo diferentes condiciones de crecimiento, a fin de determinar cómo se comportan las unidades formadoras de colonias (UFC/g).

Se recomienda realizar estudios de la producción de *lactococina pediocina nisina* que son inhibidores para los bacterias patógenos mediante la transformación de las bacterias de genero *lactococcus*.

Se recomienda el estudio de vida útil de los alimentos procesados, con programas PMP, ComBase, DMFit, ect. Y validación de los modelos matemáticos utilizando microbiología predictiva.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, E. J. & Carolyn, C., 2006. Manual de laboratorio microbiología de alimentos. Zaragoza: Acribia .
- Ayad, 2000. Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making: Int Dairy J.
- Barany, J. & Roberts, T. A., 1994. A dynamic aproach to predicting bacterial growth in food. Food Microbiol, Vol. XXIII, p. 277-294.
- Barco, E., 2001. Elaboración de modelos predictivos de crecimiento microbiana para *Escherichia coli* O157:H7. Tesis Doctoral: Universidad de Corboba.
- Buchanan, R. L. & Klawitter, L. A., 1991. Effect of temperature history on the growth of *Listeria Monocytogenes* Scott A at refrigeration tempeature. International Journal of Food microbiology, Vol. XI, p. 235-246.
- Cabeza, E. A., 2011. Aplicación de la Microbiología Predictiva para la determinación de la vida útil de los alimentos. Determinación y preservación de la vida útil de los alimentos, Vol. II, p. 4-12.
- Cabeza, E. A., 2013. Desarrollo de un modelo matemático para evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *S. Aureus* en caldo BHI. Fundamentos de Microbiología Predictiva: Aplicaciones teóricas y prácticas, p. 1-18.
- Castillejo, A., 2002. Elaboracion de modelos predictivos de crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus*. Validacion en productos carnicos envasados al vacio.

- Castro, G. y otros, 2008. Comparacion de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Revista Científica, FCV-LUZ, Vol. XVIII, p. 582-588.
- Cayré, E., Vignolo, M. & Garro, A., 2007. Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre Emulsiones Cárnicas Cocidas. Informacion Tecnológica, Vol. XVIII, p. 23-29.
- Cayré, M. & Garro, O., 2007. Evaluación del efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la flora alterante de emulsiones cárnicas cocidas usando modelos matemáticos. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Volumen II, p. 19-26.
- Ccopa, D., 2008. Evaluacion del efecto de temperatura y tiempo de calentamiento en la vida útil del queso tipo paria envasado al vacio. Tesis Ing. Agroindustrial, UNA-Puno, F. C. A.: Universitaria.
- Chacon, R. Z., 1992. Aislamiento e identificacion de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda de la zona alta Mérida. Tesis Biologo, Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias.
- Chacón, Z. & López, G., 2000. Evaluacion de cepas de *Lactococcus* como cultivos iniciadores en la elaboracion de quesos de pasta prensada. FCV-LUZ, Vol. X, p. 423-428.
- Chen, H. & Hoover, D. G., 2004. Use a weibull model to describe and predict pressure. Innovate Food Science and, Vol. V, p. 269-276.

- Cogan, T. M. & Hill, C., 1993. Cheese starter cultures. In cheese: chemistry, physics and microbiology. London: Chapman & Hall.
- Condori, C., 2010. Queseria Rural. 1° Ed. Juliaca: Lucero.
- Duh, Y. H. & Schaffner, D. W., 1993. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot, Vol. LVI, p. 205-210.
- Fennema, O. R., 2000. Química de los alimentos. 2° Ed. Zaragoza: Acribia.
- Fox, P. F. & Lucey, J. A., 1990. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. Food Sci. Nutr., Vol. XXIX, p. 237-253.
- García, A., Arrázola, S. & Durango, M., 2010. Producción de ácido láctico por vía Biotecnológico. Biotechnological production of lactic acid, Vol. II, p. 9-26.
- García, D., Ramos, A. J., Sanchis, V. & Marín, S., 2011. Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. Food Microbiology, p. 406-417.
- Gibson, A., Bratchell, N. & Roberts, T., 1987. The effect of sodium chloride and temperature on rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. J. Appl. Bacteriol, Vol. LXII, p. 479-490.
- Hill, A. R., 2007. Physical factors affecting flavour of Cheese. Wohead Publishing & CRC Pres, p. 252-283.
- Holzappel, W. F., 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale. Int. J. Food. Microbiol, Vol. LXXII, p. 197-212..

- Janes, M. J. & Martin, L. J., 2009. Microbiología moderna de los alimentos. Zaragoza: Acribia .
- Judet-Correia, D. y otros, 2010. Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium*. International Journal Food Microbiology, p. 106-113.
- Larpent, J. P., 1995. Las bacterias lácticas. Microbiología alimentaria, Vol. II, p. 3-17.
- Lima, S., 2010. Ajuste a un modelo matemático, producción y validación de un modelo experimental no-lineal. Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo.
- Madigan, M., Martiaku, J. & Parker, J., 2004. Biología de los microorganismos. Zaragoza: Acribia.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J., 1997. Brock Biology of microorganisms. Ed. Prentice Hall International, p. 149-177.
- Madrid, A., 1994. Nuevo manual de tecnología quesera. Madrid España: Iraga.
- McMeekin, T. A. & Ratkowsky, D. A., 1993. Predictive microbiology. Theory and application, Vol. X, p. 59-70.
- McSweeney, P. L. & Sousa, M. J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening.. Le Lait, Vol. LXXX, p. 293-324.
- Montville, T. J., 2000. Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana en los alimentos. En: Microbiología de los alimentos. Zaragoza: Acribia, p. 13-30.
- Mucio, F., 2008. Quesos Típicos de latino América. Revista industrial de laticinios, Issue 52.

- Neumeyer, K., Ross, T., Thomson, G. & McMeekin, T. A., 1997. Validation of a model describing the effects of temperature and water activity on the growth of *Psychrotrophic pseudomonasds*. Food Microbiol, Vol. XXXVIII, p. 55-63.
- NTP, 2010. Norma Técnica Peruana. Leches y productos lacteos, Quesos Madurados, p. 202-194.
- Nuñez, C., 1996. Determinacion de vida en anaquel de productos alimenticios mediante pruebas aceleradas. Lima.
- Nuñez, M., Medina, M. & Gaya, P., 1979. Ewes milk cheese: technology, Microbiology and Chemistry. Technology, Microbiology and Chemist, p. 56.
- Oria, R., 1991. Elaboracion de productos lacteos. Zaragoza: Acribia.
- Pavlidou, S., Bozoudi, D., Hatzikamari, M. & Tzanetakis, N., 2011. Differentiation of *Lactococci* from 2 greek cheese with protecd designation of origen by phenotypic criteria and RAPD-PCR. Food Sci., p. M175-M183.
- Pin, C., Sutherland, J. P. & Baranyi, J., 1999. Validating predictive models of food spoilage organisms. J. Appl. Microbiol, Vol. LXXXVII, p. 491-499.
- Pope, J. M., 2005. Aspectos nutricionales y tecnológicos de la leche. En: Dirección general de promoción agraria, p. 5.
- Quirino, C. y otros, 1999. Evaluation of four mathematical funtions to describe scrotal circumference maturation in Nellore bulls. Theriogenol, Vol. LII, p. 25-34.
- Ramirez, M. A., 2005. Manual práctico de quesería. 1° ed. Madrid: Ayala.

- Randazo, C. L. y otros, 2008. Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct on the volatile compounds of the pecorino Siciliano cheese. *Int J. Food Microbiol*, p. 269-278.
- Rehn, U., Vogensen, F. K., Persson, S. E. & Saeden, H., 2011. Influence of microflora on texture and contents of amino acids, organic, and volatiles in semi-hard cheese made with DL-starter and propionibacteria. *J.Dairy Sci.*, p. 1098-1111.
- Robins, M., Brocklehurst, T. & Wilson, P., 1994. Food structure and the growth of pathogenic bacteria. *Food Technology International Europe*, p. 31-36.
- Robinson, T. P., Kaloti, A. & Mackey, B. M., 1998. The effect of growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. XLIV, p. 83-92.
- Rodriguez, R., 2003. Desarrollo y validacion de los modelos matematicos para la prediccion de vida comercial de productos carnicos. Tesis Doctoral, p. 45.
- Ross, T., 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl Bacteriol*, Vol. LXXXI, p. 501-508.
- Ross, T. & McMeekin, T. A., 2003. Modelling microbial growth within food safety risk assessments. *Risk Anal*, Vol. XXIII, p. 179-197.
- Sandine, W., 1979. Lactis starter culture technology. In *Pfizer Cheese*, p. 4.
- Scott, R., Robinson, R. K. & Wilbey, R. A., 2002. Fabricación de queso. 2° ed. Zaragoza: Acribia.
- Smit, B., 2004. Formation of amino acid derived cheese flavour compounds, The Netherlands: Wageningen University.

- Smit, G. & Engels, W. J. M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products.. FEMS. Microbiol, Vol. XXIX, p. 591-610..
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. & Painter, P. R., 1989. Microbiologia. 2° ed:Reverté.
- Sutherland, J. P., Bayliss, A. J. & Roberts, T. A., 1994. Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. J. Food Microbiol, Vol. XXI, p. 217-236.
- Van Boekel, M. A., 1996. Statistical aspects of kinetic modelling for food science problems. J. Food Sci, Vol. LXI, p. 477-485.
- Villegas, A. & Santos, A., 2009. Manual Básico Para Elaborar Productos Lácteos. Primera edición ed. México: Trillas.
- Whiting, R. C. & Buchanan, R. L., 1994. Microbial modelling. Food Technol, Vol. XLVIII, p. 113-120.
- Yousef, A. E. & Carlstrom, C., 2006. Microbiología de los Alimentos. Zaragoza: Acribia.
- Zárate, E., 2009. Aplicacion del modelo Cinetico de Gompertz a la interaccion del efecto de la temperatura. Ciencia y Tecnología, p. 34-50.
- Zwietering, M. H., De Witt, J. C., Cuppers, H. G. & Van 't Riet, K., 1994. Modelling of bacterial growth with shifts in temperature. Appl. Environ Microbiol, Vol. L, pp. 204-213.
- Zwietering, M. H. & Hasenack, B. E., 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. Appl. Environ. Microbiol., Vol. LVII, p. 1094-1101.

Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F. & Vant Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol*, Vol. LVII, p. 1875-1881.







Anexo 1. Predicción de cultivos iniciadores

Tiempo (Horas)	TEMPERATURA 30 °C			TEMPERATURA 38 °C			TEMPERATURA 45 °C		
	BARANYI	GOMPERTZ	LOGISTICO	BARANYI	GOMPERTZ	LOGISTICO	BARANYI	GOMPERTZ	LOGISTICO
24	5.950	5.950	5.950	5.7700	5.7700	5.7700	5.72000	5.71999	5.72000
36	5.978	5.950	5.983	5.8716	5.7903	5.8786	5.90704	5.82176	5.91099
48	6.210	6.210	6.210	6.2600	6.2600	6.2600	6.34000	6.34003	6.34001
60	7.192	7.471	7.181	7.0951	7.2330	7.0998	7.00146	7.07366	7.00699
72	8.330	8.330	8.330	7.9000	7.9000	7.9000	7.62000	7.61995	7.61999
84	8.670	8.616	8.662	8.2510	8.1933	8.2390	7.97758	7.92143	7.96445
96	8.715	8.693	8.712	8.3398	8.3031	8.3329	8.11948	8.06692	8.10707
108	8.719	8.713	8.719	8.3581	8.3420	8.3556	8.16550	8.13309	8.15852
120	8.720	8.718	8.720	8.3616	8.3554	8.3609	8.17931	8.16243	8.17613
132	8.720	8.720	8.720	8.3623	8.3601	8.3621	8.18336	8.17529	8.18206
144	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3617	8.3624	8.18453	8.18090	8.18404
156	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3622	8.3625	8.18487	8.18334	8.18470
168	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3624	8.3625	8.18497	8.18440	8.18492
180	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18500	8.18486	8.18499
192	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18506	8.18502
204	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18515	8.18502
216	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18519	8.18503
228	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18520	8.18503
240	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
252	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
264	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503

Tiempo (Horas)	TEMPERATURA 30 °C			TEMPERATURA 38 °C			TEMPERATURA 45 °C		
	BARANYI	GOMPERTZ	LOGISTICO	BARANYI	GOMPERTZ	LOGISTICO	BARANYI	GOMPERTZ	LOGISTICO
276	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
288	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
300	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
312	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
324	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
336	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
348	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
360	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
372	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
384	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
396	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
408	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503
420	8.720	8.720	8.720	8.3625	8.3625	8.3625	8.18501	8.18521	8.18503

Anexo 2. Valores obtenidos mediante el análisis microbiológico de cultivos iniciadores en
leche pasteurizada

	TEMPERATURA 30 °C		TEMPERATURA 38 °C		TEMPERATURA 45 °C	
Tiempo (min)	Promedio de UFC/ml	Log 10 UFC/ml	Promedio de UFC/ml	Log 10 UFC/ml	Promedio de UFC/ml	Log 10 UFC/ml
0	9.50E+05	5.978	1.20E+06	6.079	1.00E+05	5.000
30	4.50E+06	6.653	3.15E+06	6.498	8.00E+05	5.903
60	7.75E+06	6.889	5.15E+06	6.712	3.80E+06	6.580
90	1.16E+07	7.064	8.25E+06	6.916	5.60E+06	6.748
120	3.02E+07	7.479	1.06E+07	7.023	1.10E+07	7.039

Anexo 3. Valores obtenidos mediante el análisis microbiológico de cultivos iniciadores
durante la maduración del queso Edam

	TEMPERATURA 30 °C		TEMPERATURA 38 °C		TEMPERATURA 45 °C	
Tiempo (horas)	Promedio de UFC/ml	Log 10 UFC/ml	Promedio de UFC/ml	Log 10 UFC/ml	Promedio de UFC/ml	Log 10 UFC/ml
24	8.98E+05	5.953	5.97E+05	5.776	5.25E+05	5.720
48	1.65E+06	6.217	1.85E+06	6.267	2.23E+06	6.347
72	2.18E+08	8.338	7.99E+07	7.902	4.19E+07	7.622
168	5.25E+08	8.720	2.49E+08	8.396	1.53E+08	8.184
240	3.55E+08	8.551	2.58E+08	8.412	9.70E+07	7.987
336	3.59E+08	8.555	1.43E+08	8.155	1.59E+08	8.200
408	3.51E+08	8.545	3.18E+08	8.503	2.44E+08	8.387
576	1.09E+08	8.039	5.28E+07	7.723	1.96E+07	7.292

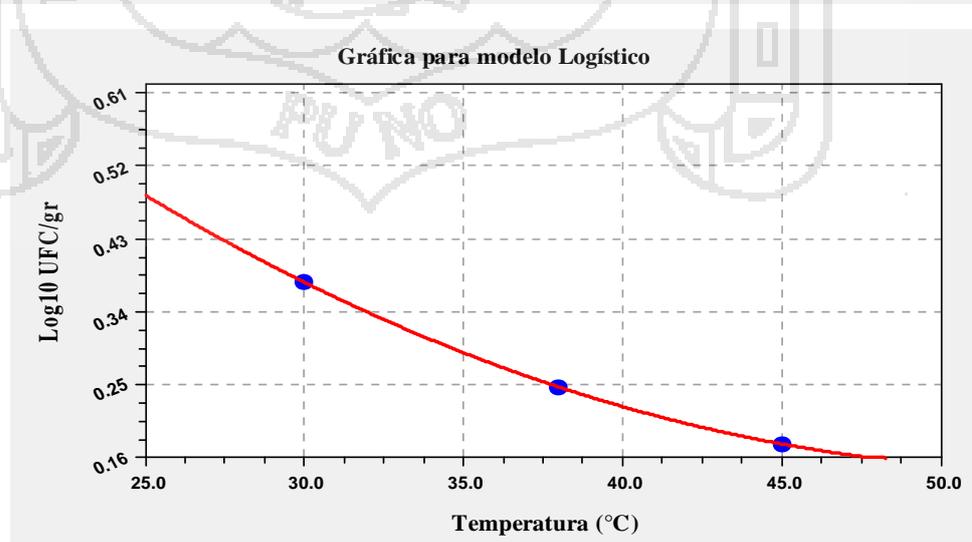
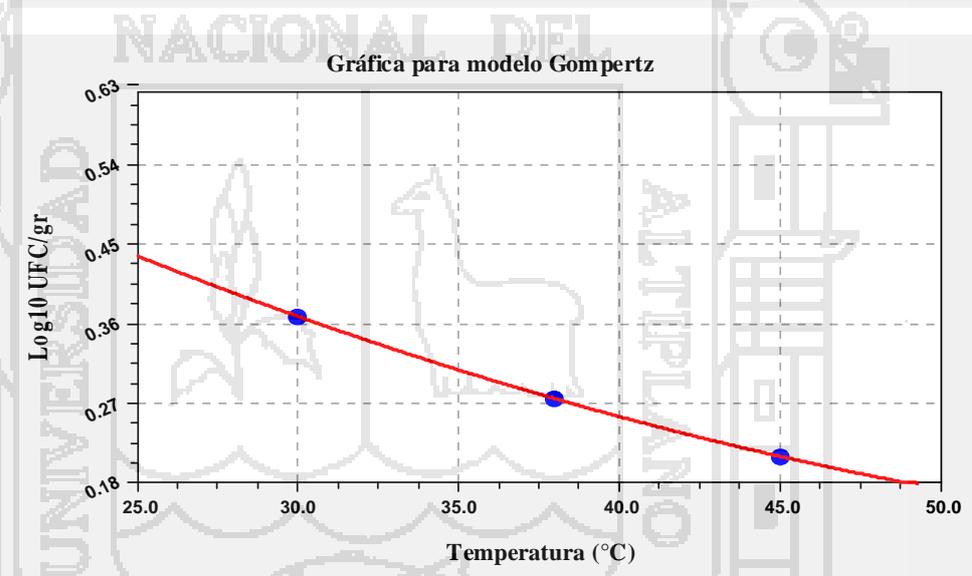
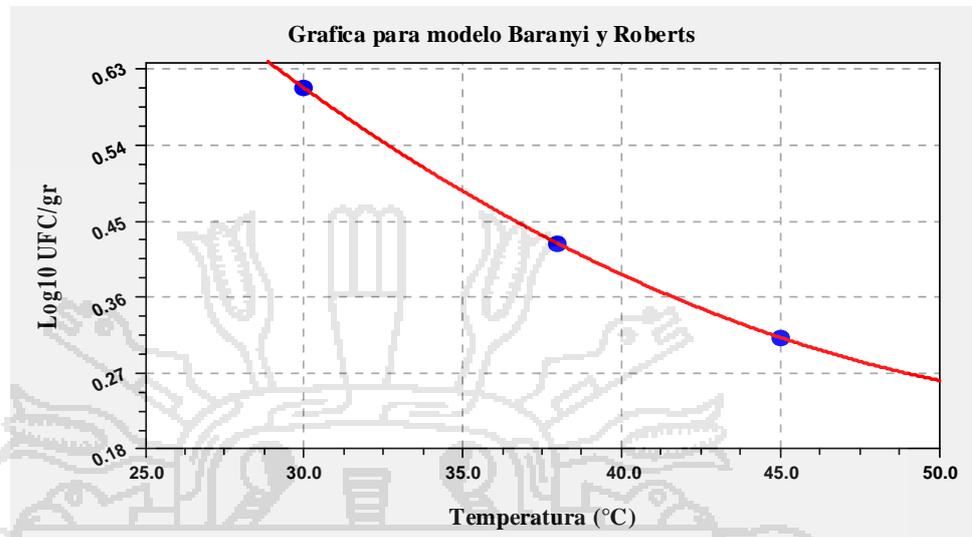
Anexo 4. Cuadro de valores obtenidos mediante el análisis de fisicoquímico en la activación de cultivos iniciadores en leche pasteurizada

N°	Tiempo (horas)	pH			% Acidez		
		30 °C	38 °C	45 °C	30 °C	38 °C	45 °C
1	0	6.58	6.61	6.7	0.160	0.160	0.150
		6.59	6.6	6.73	0.160	0.160	0.150
		6.58	6.6	6.71	0.159	0.159	0.150
2	0.5	6.56	6.6	6.64	0.160	0.165	0.150
		6.56	6.58	6.66	0.160	0.165	0.155
		6.55	6.59	6.64	0.165	0.160	0.155
3	1	6.52	6.59	6.62	0.170	0.170	0.160
		6.5	6.57	6.60	0.175	0.175	0.160
		6.51	6.58	6.61	0.170	0.170	0.160
4	1.5	6.46	6.55	6.57	0.180	0.180	0.165
		6.45	6.53	6.57	0.185	0.180	0.170
		6.46	6.55	6.55	0.180	0.185	0.165
5	2	6.4	6.47	6.47	0.195	0.190	0.180
		6.41	6.45	6.45	0.190	0.190	0.185
		6.39	6.43	6.44	0.195	0.190	0.180

Anexo 5. Cuadro de valores obtenidos mediante el análisis fisicoquímico de cultivos iniciadores en queso Edam

N°	Tiempo (horas)	pH			% Acidez		
		30 °C	38 °C	45 °C	30 °C	38 °C	45 °C
1	24	6.500	6.570	6.560	0.017	0.014	0.014
		6.540	6.580	6.550	0.018	0.015	0.015
		6.520	6.570	6.560	0.017	0.015	0.015
2	48	6.480	6.460	6.470	0.019	0.029	0.020
		6.470	6.450	6.480	0.019	0.030	0.020
		6.490	6.480	6.450	0.019	0.030	0.020
3	72	6.350	6.320	6.340	0.025	0.029	0.025
		6.360	6.330	6.350	0.026	0.031	0.025
		6.370	6.320	6.360	0.027	0.031	0.025
4	168	6.280	6.320	6.400	0.031	0.032	0.027
		6.270	6.300	6.360	0.031	0.034	0.027
		6.280	6.310	6.370	0.031	0.033	0.028
5	240	6.110	6.300	6.270	0.033	0.054	0.035
		6.100	6.290	6.260	0.033	0.050	0.034
		6.120	6.300	6.090	0.032	0.040	0.034
6	336	6.090	6.310	6.110	0.036	0.036	0.029
		6.070	6.290	6.120	0.038	0.036	0.030
		6.100	6.300	6.100	0.037	0.036	0.030
7	408	6.050	6.220	6.200	0.050	0.047	0.036
		6.030	6.220	6.110	0.052	0.035	0.036
		6.050	6.230	6.210	0.051	0.040	0.040
8	576	5.980	6.070	6.050	0.072	0.050	0.054
		5.950	6.030	6.080	0.101	0.061	0.055
		5.920	6.050	6.090	0.091	0.054	0.054

Anexo 6. Gráfica de la velocidad de crecimiento respecto a temperatura para ajuste de los modelos de cultivos iniciadores para obtener ecuaciones matemáticas generadas



Anexo 7. Representación de los valores de velocidad de crecimiento estimados respecto a observados para cultivos iniciadores

Gráfico de modelo Baranyi & Robertz

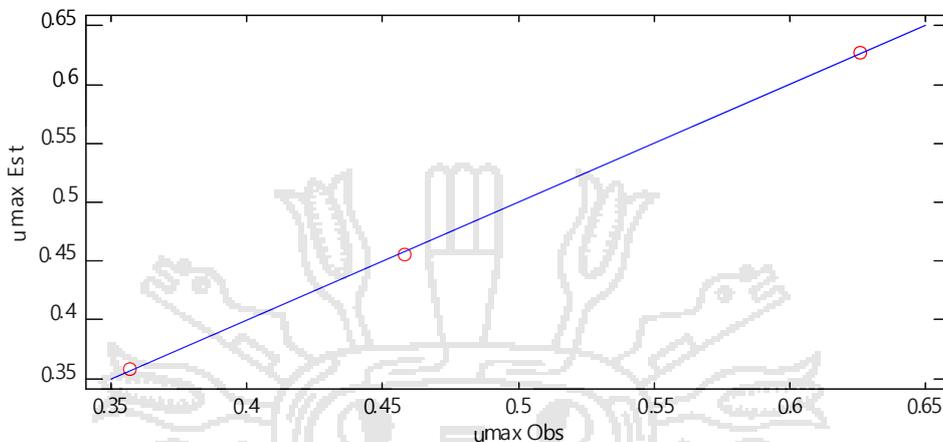


Gráfico de modelo Gompertz

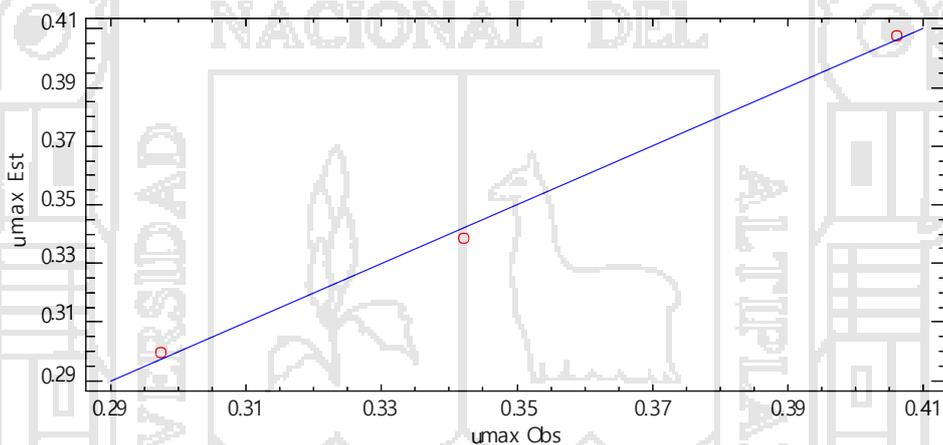
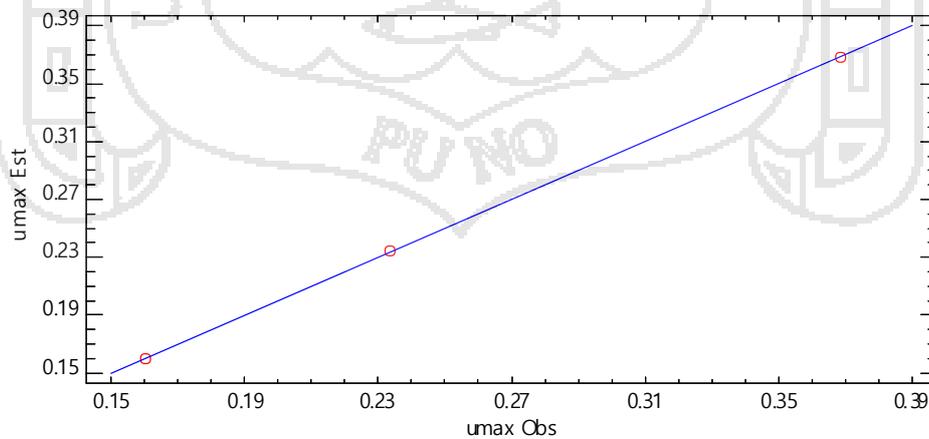


Gráfico de modelo Logístico



Anexo 8. Panel fotográfico en el proceso de elaboración de queso Edam



Fotografía 1 y 2. Elaboración de queso Edam a temperaturas 30, 38 y 45 °C



Fotografía 3 y 4. Obtención de queso Edam prensada elaborada a temperaturas 30, 38 y 45 °C



Fotografía 5 y 6. Maduración en cámara temperatura 15 °C y 85% humedad

Anexo 9. Panel fotográfico de análisis microbiológico UFC/ml en leche pasteurizada



Fotografía 7 y 8. Inicio de trabajo en laboratorio

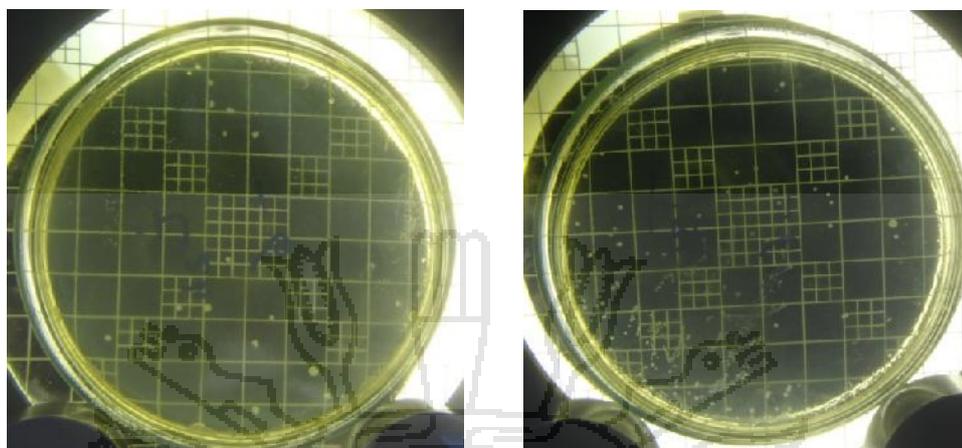


Fotografía 9 y 10. UFC/ml en activación en leche pasteurizada a 30 y 38 °C tiempo 30 minutos

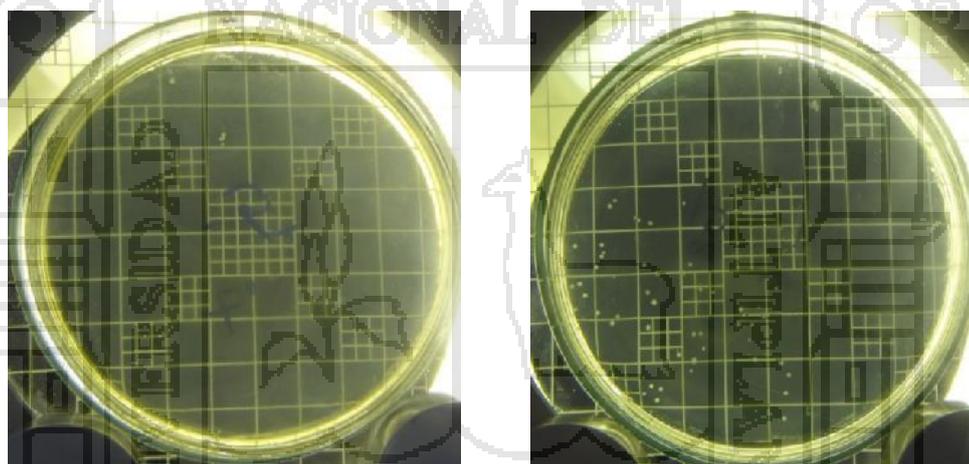


Fotografía 11 y 12. UFC/ml en activación en leche pasteurizada a 30 y 38 °C tiempo 120 minutos

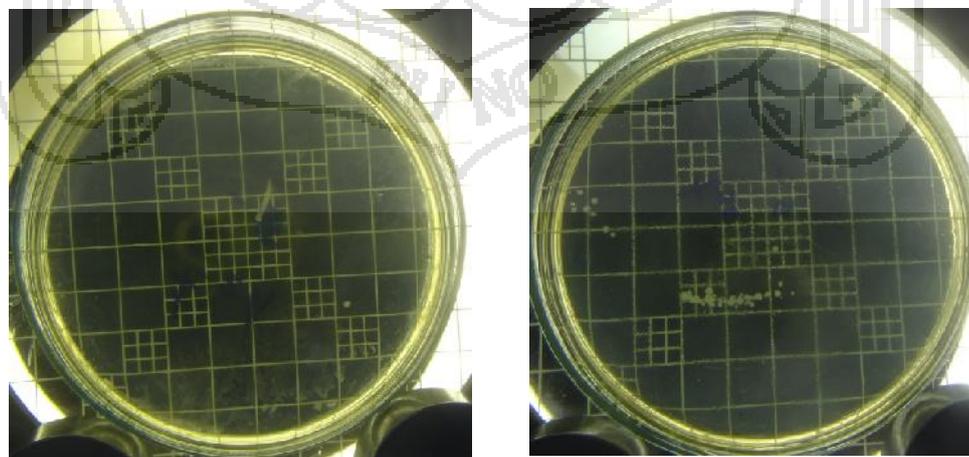
Anexo 10. Panel fotográfico de crecimiento de cultivos iniciadores tiempo 24 horas



Fotografía 13 y 14. UFC/gr en queso a temperatura 30 °C tiempo 24 horas

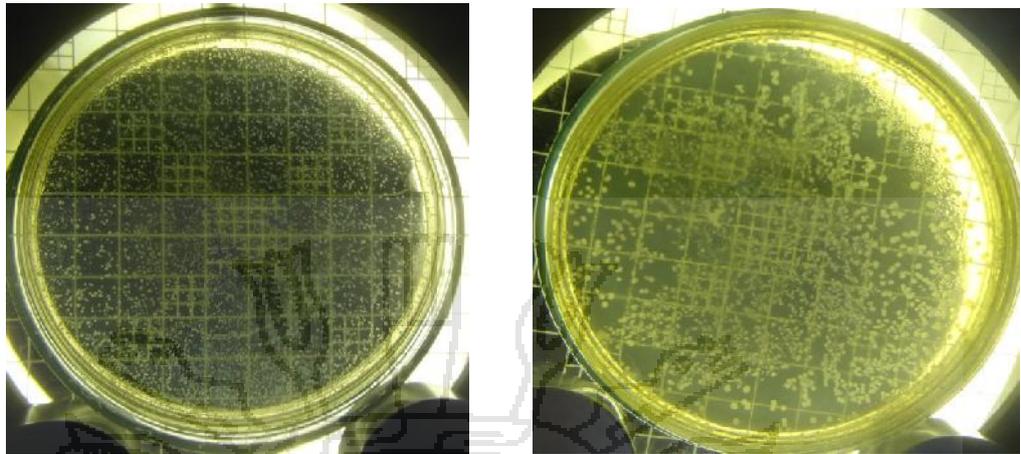


Fotografía 15 y 16. UFC/gr en queso a temperatura 38 °C tiempo 24 horas

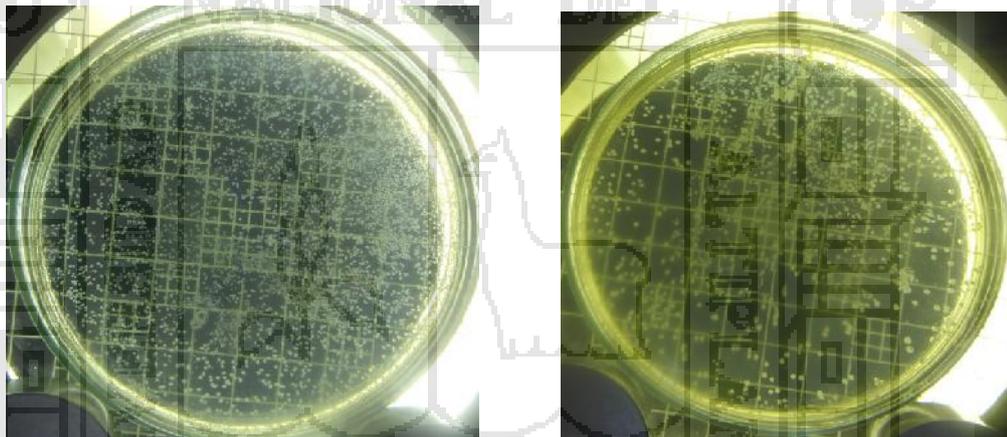


Fotografía 17 y 18. UFC/gr en queso a temperatura 45 °C tiempo 24 horas

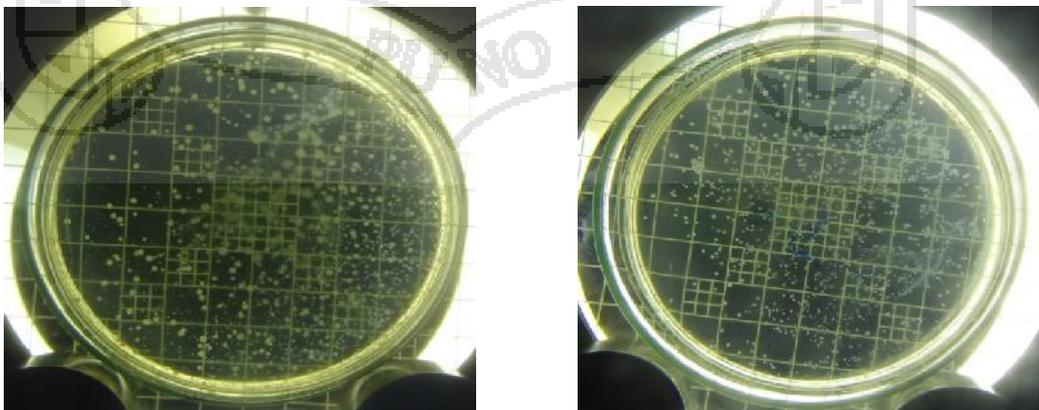
Anexo 11. Panel fotográfico de crecimiento máximo de la población microbiana



Fotografía 19 y 20. Máxima crecimiento de población de UFC/gr en queso a temperatura 30 °C tiempo 168 horas

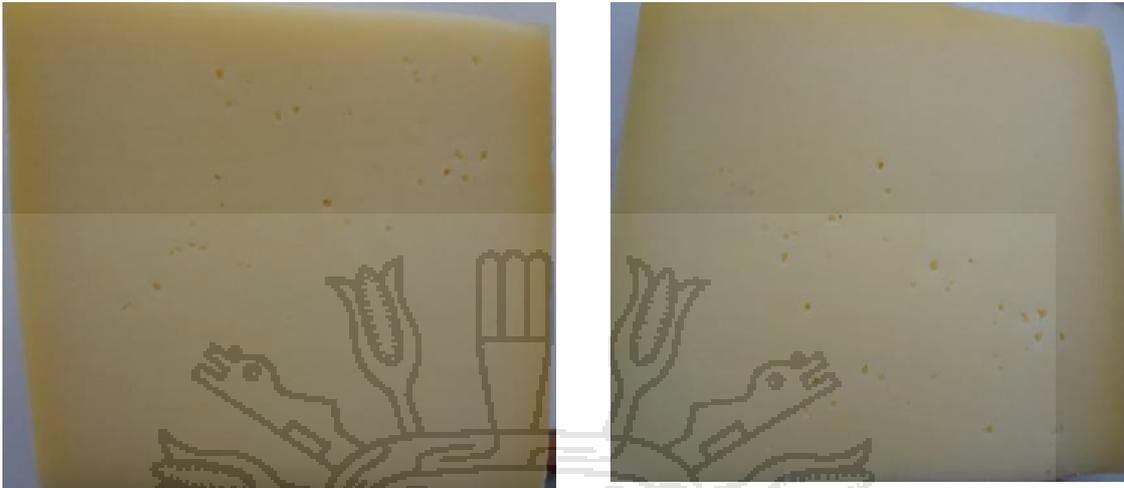


Fotografía 21 y 22. Máxima crecimiento de población de UFC/gr en queso a temperatura 38 °C tiempo 408 horas



Fotografía 23 y 24. Máxima crecimiento de población de UFC/gr en queso a temperatura 45 °C tiempo 408 horas

Anexo 12. Panel fotográfico de formación de ojos del queso Edam



Fotografía 25 y 26. Formación de ojos en queso a temperatura 30 y °C tiempo 576 horas



Fotografía 27 y 28. Formación de ojos en queso a temperatura 38 y 45 °C tiempo 576 horas

Anexo 13. Ficha técnica de cultivo



Improving food & health

FD-DVS RSF-742

Información de Producto
Versión: 1 PI-EU-ES 06-12-2010

Descripción	Cultivos mezcla de cepas definidas homofermentativas con una resistencia mejorada a fagos. El cultivo no produce CO ₂ .																																		
Taxonomía	Streptococcus thermophilus Lactobacillus helveticus Lactococcus lactis subsp. lactis Lactococcus lactis subsp. cremoris																																		
Envase	No Material: 703061	Tamaño 10X50 U	Tipo Sobre (s) en caja																																
Propiedades Físicas	Color:	Blanco a ligeramente rojizo o marrón																																	
	Aspecto Físico:	Granulado																																	
Aplicación	<p>Uso El cultivo es principalmente utilizado en la producción de queso semi-duro, duro y quesos prensados muy duros con una textura cerrada y una temperatura mínima de cocción a 35°C (95°F). Ejemplos de aplicaciones son quesos Cheddar, Cheshire, Colby, Monterey Jack, Munster, Fontal, Raclette y Saint Paulin.</p> <p>Dosis de inoculación recomendada</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 15%;">Cantidad de leche a inocular (en litros)</td> <td>500</td> <td>2,000</td> <td>5,000</td> <td>10,000</td> <td>15,000</td> <td>20,000</td> <td>25,000</td> </tr> <tr> <td>Cantidad de cultivo DVS</td> <td>50 U</td> <td>200 U</td> <td>500 U</td> <td>1,000 U</td> <td>1,500 U</td> <td>2,000 U</td> <td>2,500 U</td> </tr> <tr> <td style="border-top: 1px solid black;">Cantidad de leche a inocular (en libras)</td> <td style="border-top: 1px solid black;">1,140</td> <td style="border-top: 1px solid black;">4,500</td> <td style="border-top: 1px solid black;">11,350</td> <td style="border-top: 1px solid black;">22,700</td> <td style="border-top: 1px solid black;">34,000</td> <td style="border-top: 1px solid black;">45,500</td> <td style="border-top: 1px solid black;">57,000</td> </tr> <tr> <td style="border-top: 1px solid black;">Cantidad de cultivo DVS</td> <td style="border-top: 1px solid black;">50 U</td> <td style="border-top: 1px solid black;">200 U</td> <td style="border-top: 1px solid black;">500 U</td> <td style="border-top: 1px solid black;">1,000 U</td> <td style="border-top: 1px solid black;">1,500 U</td> <td style="border-top: 1px solid black;">2,000 U</td> <td style="border-top: 1px solid black;">2,500 U</td> </tr> </table>			Cantidad de leche a inocular (en litros)	500	2,000	5,000	10,000	15,000	20,000	25,000	Cantidad de cultivo DVS	50 U	200 U	500 U	1,000 U	1,500 U	2,000 U	2,500 U	Cantidad de leche a inocular (en libras)	1,140	4,500	11,350	22,700	34,000	45,500	57,000	Cantidad de cultivo DVS	50 U	200 U	500 U	1,000 U	1,500 U	2,000 U	2,500 U
Cantidad de leche a inocular (en litros)	500	2,000	5,000	10,000	15,000	20,000	25,000																												
Cantidad de cultivo DVS	50 U	200 U	500 U	1,000 U	1,500 U	2,000 U	2,500 U																												
Cantidad de leche a inocular (en libras)	1,140	4,500	11,350	22,700	34,000	45,500	57,000																												
Cantidad de cultivo DVS	50 U	200 U	500 U	1,000 U	1,500 U	2,000 U	2,500 U																												

www.chr-hansen.com

Página: 1 (3)

La información aquí contenida es según nuestro conocimiento verdadera y correcta, y presentada de buena fe. Puede sufrir modificaciones sin previo aviso. Ninguna garantía contra infringimiento a patentes está implícita o inferida. Esta información es ofrecida solamente para su consideración y verificación. Copyright© Chr. Hansen A/S. Todos los derechos reservados.



Improving food & health

FD-DVS RSF-742

Información de Producto

Versión: 1 PI-EU-ES 06-12-2010

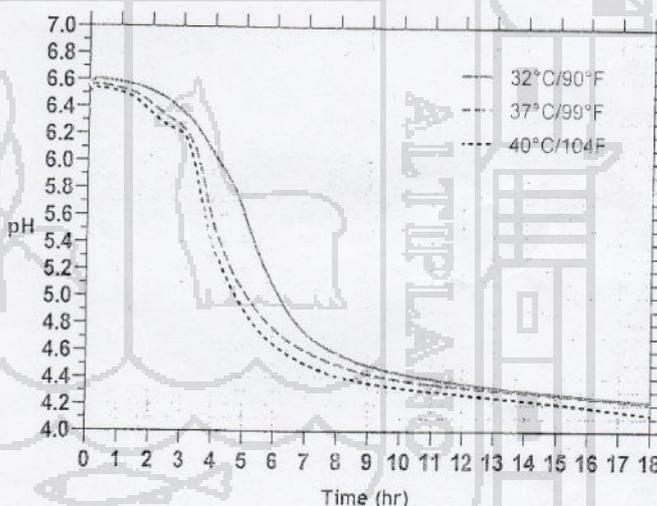
Directivas para su uso

Sacar el cultivo del congelador justo antes de su utilización. Limpiar la parte superior del sobre con cloro. Abrir el sobre y añadir los gránulos liofilizados directamente al producto pasteurizado mientras se agita suavemente. Agitar la mezcla durante 10-15 minutos para distribuir el cultivo homogéneamente. La temperatura recomendada de incubación depende de la aplicación en la que se va a utilizar el cultivo. Para más información sobre aplicaciones específicas, por favor, consulte nuestros catálogos técnicos y recetas recomendadas.

Almacenaje y manipulación < -18 °C / < 0 °F

Vida útil Como mínimo 24 meses desde la fecha de fabricación cuando se almacena siguiendo las recomendaciones.

Información técnica Curva de acidificación



Condiciones de fermentación:

Leche de lab. 9.5 % S.T.: 140°C/8 seg. -100°C/30 minutos

Inoculación: 250U/5000L

www.chr-hansen.com

Página: 2 (3)

La información aquí contenida es según nuestro conocimiento verdadera y correcta, y presentada de buena fe. Puede sufrir modificaciones sin previo aviso. Ninguna garantía contra infringimiento a patentes está implícita o inferida. Esta información es ofrecida solamente para su consideración y verificación. Copyright© Chr. Hansen A/S. Todos los derechos reservados.

