Transformación y agroindustria

Artículo de investigación

Efectos del *Bifidobacterium animalis* y dos cepas de *Lactococcus lactis* en el queso costeño

Effects of *Bifidobacterium animalis* and two strains of *Lactococcus lactis* in the costeño cheese

Efeitos do *Bifidobacterium animalis* e duas cepas de *Lactococcus lactis* no queijo *costeño*

Margarita Arteaga-Márquez,[1] Fernando Mendoza-Corvis,[2] Milton Montes-Guzmán,[3] Obeimar Ruiz-Sánchez[4]

[1] MSc, Universidad Austral de Chile. Docente, Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad de Córdoba. Montería, Colombia. mrarteaga@correo.unicordoba.edu.co

[2] MSc, Universidad de Córdoba. Docente. Departamento de Ingeniería de Alimentos. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Sucre. Sincelejo, Colombia. fmendoza@correo.unicordoba.edu.co

[3] Ingeniero de alimentos, Facultad de Ingeniería, profesional investigador. Universidad de Córdoba. Montería, Colombia. mmontes@correo.unicordoba.edu.do

[4] Ingeniero de alimentos, Facultad de Ingeniería, profesional investigador. Universidad de Córdoba. Montería, Colombia. oruizsanchez@correo.unicordoba.edu.do

Fecha de recepción: 25/11/2015
Fecha de aceptación: 06/01/2016

Para citar este artículo: Arteaga-Márquez M, Mendoza-Corvis F, Montes-Guzmán M, Ruiz-Sánchez O. Efectos del *Bifidobacterium animalis* y dos cepas de *Lactococcus lactis* en el queso costeño. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria. 17(3):391-402

DOI: http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol17_num3_art:515

Resumen

En esta investigación se evaluaron los efectos de la adición de cepas de *Bifidobacterium animalis*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* y *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, y la variación de la concentración de cloruro de sodio en las características fisicoquímicas del queso fresco costeño. Se realizaron cinco tratamientos: T1 (control, 2 % sal), T2 (1,5 % sal), T3 (2 % sal), T4 (2,5 % sal) y T5 (3,5 % sal). Los microorganismos se adicionaron a todos los tratamientos con excepción de T1 (control), y se almacenaron a una temperatura de 4-6 °C, con un muestreo por triplicado en los días 1, 9 y 18. Se realizaron recuentos de las cepas agregadas y medición de las características fisicoquímicas del queso (pH, acidez, humedad, sólidos totales, cenizas, proteína, materia grasa y cloruro de sodio). El pH y la acidez presentaron diferencia significativa entre los tratamientos, con variación inversa de su valor. El pH fue superior en los tratamientos con mayor contenido de cloruro de sodio y con menores recuentos microbianos. El porcentaje de sólidos totales, proteína, grasas, cenizas y NaCl aumentó con la disminución de la humedad de las muestras a medida que transcurría el tiempo de almacenamiento. El aumento de la concentración de sal en los tratamientos redujo significativamente los recuentos del *B. animalis*, *L. lactis* spp. *lactis* y *L. lactis* spp. *cremoris* durante los primeros nueve días de almacenamiento, con una mayor viabilidad en los tratamientos con 1,5 % y 2 % de cloruro de sodio.

Palabras clave: queso fresco, bacterias probióticas, cloruro de sodio, alimentos funcionales, tiempo de almacenamiento

© 2016 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

Abstract

The objetive of this study was to evaluate the effects of the addition of strains of *B. animalis*, *L. lactis* ssp. *lactis* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* and variation of the concentrations of sodium chloride in the physicochemical characteristics of costeño cheese. Five treatments were performed: T1 (Control, 2 % salt), T2 (1,5 % salt), T3 (2 % salt), T4 (2,5 % salt) and T5 (3,5 % salt), added the strains of microorganisms for treatments T2 to T5. The samples were stored of 4-6 °C, performing analysis the day 1, 9 and 18, for triplicate. Were performed counts of the strains and measuring physicochemical characteristics (pH, acidity, humidity, total solids, ash, protein, fat, and sodium chloride). The pH and acidity differ significantly between treatments, varying inversely. The pH was higher in treatments with higher content of sodium chloride and with lower microbial counts. The percentage of total solids, protein, fat, ash and NaCl increased with decreasing humidity of the samples as storage time passed. Increasing the salt concentration in the treatments significantly reduced counts of *B. animalis*, *L. lactis* spp. *lactis* and *L. lactis* spp. *cremoris* for the first nine days of storage, showing increased viability in the treatments with 1.5% and 2% of sodium chloride.

Keywords: Fresh cheese, Probiotic bacteria, Sodium chloride, Functional food, Storage time

Resumo

Em esta pesquisa se avaliaram os efeitos da adição de cepas de *Bifidobacterium animalis*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* e *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, e a variação da concentração de cloreto de sódio nas características físico-químicas do queijo fresco do tipo *costeño*. Realizaram-se cinco tratamentos: T1 (controle, 2 % sal), T2 (1,5 % sal), T3 (2 % sal), T4 (2,5 % sal) e T5 (3,5 % sal). Os microrganismos adicionaram-se a todos os tratamentos com exceção de T1 (controle), e se armazenam a temperatura de 4-6 °C, com uma amostragem por triplicata nos dias 1, 9 e 18. Realizaram-se recontos das cepas agregadas e medição das características físico-químicas do queijo (pH, acidez, humidade, sólidos totais, cinzas, proteína, matéria gordurosa e cloreto de sódio). O pH e a acidez apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, variando inversamente o seu valor. O pH foi superior nos tratamentos com maior conteúdo de cloreto de sódio e com menores recontos microbianos. A percentagem de sólidos totais, proteína, matéria gordurosa, cinzas e NaCl aumentou com a diminuição da humidade das amostras a medida que transcorria o tempo de armazenamento. O aumento da concentração de sal nos tratamentos reduz significativamente os recontos do *B. animalis*, *L. lactis* spp. *lactis* e *L. lactis* spp. cremoris durante os primeiros nove dias de armazenamento, apresentando maior viabilidade nos tratamentos com 1,5 % e 2 % de cloreto de sódio.

Palavras chave: queijo fresco, bactérias probióticas, cloreto de sódio, alimentos funcionais, tempo de armazenamento

Introducción

La popularidad de los alimentos funcionales continúa aumentando a medida que los consumidores desean alimentos apetitosos y que, además, mejoren sus condiciones de salud. Los probióticos pueden ejercer efectos positivos sobre la composición de la probiota intestinal y la salud en general; sin embargo, con el fin de ser beneficiosos, los cultivos bacterianos deben permanecer vivos y activos en el momento del consumo (Coman et al. 2012). Uno de los medios a través de los cuales se ha buscado la ingesta de microorganismos probióticos para las personas es el queso (Fritzen-Freire et al. 2010; Burns et al. 2012); aunque los alimentos convencionalmente utilizados para llevar al consumidor los beneficios de los probióticos han sido las leches fermentadas, ya que estas reúnen una serie de factores que las hacen aptas para tal fin. No obstante, el queso podría ser un mejor vehículo para estos microorganismos, por tener una mayor capacidad amortiguadora, mayor exclusión del oxígeno y mayor contenido graso, lo que favorecería la resistencia y supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento y el tránsito intestinal (Boza et al. 2010).

Con el fin de ofrecer a los consumidores del queso costeño un producto con características de un alimento potencialmente funcional, se le adicionaron cepas de *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* y *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, las cuales están asociadas al mejoramiento del sistema inmune, la disminución del síndrome del intestino irritable, la reducción de los niveles de colesterol sanguíneo, el efecto antimutagénico y anticarcinogénico (Manzano et al. 2012; Rizzardini et al. 2012; Abad-Castillo y Llenque-Díaz 2014). El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de la adición de microorganismos probióticos en las características fisicoquímicas del queso costeño, junto con la variación en su contenido de cloruro de sodio. Durante la investigación, las muestras de queso fueron almacenadas durante 18 días a una temperatura entre 4-6 °C.

Materiales y métodos

Elaboración del producto y cultivos probióticos empleados

Se emplearon cepas liofilizadas de *B. animalis* spp. *lactis* (Lyofast BLC 1), *L. lactis* spp. *lactis* y *L. lactis* spp. *cremoris* (Lyofast MO 032), las cuales se reactivaron en 250 ml de leche cada una, a 37 °C para la primera cepa y 32 °C para los *Lactococcus*, según procedimiento descrito por Alais (1985). Para el recuento de *B. lactis* se suplementó el medio Agar MRS con 0,5 % de una solución del 10 % de L-cisteína.

En la elaboración del producto se siguió la técnica descrita para preparar queso campesino (ICTA 1998), complementada con lo propuesto por Castaño (2000). Se realizaron modificaciones en la adición de sal, la cantidad de cultivo probiótico y el recuento de mesófilos aerobios, según la metodología descrita por la Sociedad Americana de Salud Pública (APHA 1992). El proceso de elaboración consistió en la filtración y estandarización de la leche, pasteurización (65 °C por 30 min), enfriamiento (35-36 °C), inoculación de cepas (0,01625 g/L de cada microorganismo, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para obtener concentraciones mínimas de 10^7 ufc/g de producto), adición de cloruro de sodio (20 g/100 L), adición de cuajo (según proveedor), coagulación de 45 minutos —según procedimiento descrito por Castaño (2000)—, corte, desuerado total, salado en seco (según tratamiento), prensado (12 h a 28 °C), desmolde y almacenamiento a 4-6 °C.

Tratamientos y análisis fisicoquímicos y microbiológicos

Para seleccionar las concentraciones de sal, se tomó como base lo establecido en la Resolución 2310 de 1986 del Ministerio de Salud de Colombia (Colombia 1986), que corresponde a 4,0 % (p/p) de cloruro de sodio como máximo. Los tratamientos realizados fueron: T1 (queso con 2,0 % de sal, sin cultivo probiótico - control), T2 (1,5 % de sal y cultivo probiótico), T3 (2,0 % de sal y cultivo

© 2016 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

probiótico), T4 (2,5 % de sal y cultivo probiótico) y T5 (3,5 % de sal y cultivo probiótico). Se determinó el contenido de grasa (método Gerber) (Pinto et al. 1998), la humedad (gravimetría) (Icontec 2000), las proteínas (método Kjeldahl) (AOAC 1990 / 920.05), las cenizas (AOAC 1990 / 935.42), los sólidos totales (gravimetría) (Icontec 2000), pH (AOAC 1990 / 981.12), acidez titulable (AOAC 1990) y cloruro de sodio por el método de Mohr (Chávez 2006), para cada uno de los tratamientos.

Para el análisis microbiológico se emplearon 100 g de muestra de cada tratamiento, de los cuales se pesaron 25 g asépticamente y fueron colocados en bolsas plásticas con cierre hermético y una adición de 225 ml de agua peptonada. Las muestras se homogenizaron en un Stomacher 400, durante 3 minutos, lo que correspondió a la dilución 10^{-1}, a partir de la cual se realizaron diluciones hasta de 10^{-8}.

Para el recuento de *B. lactis* se suplementó el medio Agar MRS con el 0,5 % de una solución del 10 % de L-cisteína, el 0,5 % de una solución de dicloxacilina (10 mg/100 ml de agua destilada) y el 1 % de una solución de cloruro de litio al 10 %. La incubación se llevó a cabo durante 72 horas, a 37 °C, en una jarra para anaerobiosis con un sobre de AnaeroGen y una tirilla indicadora de oxígeno. Para el *Lactococcus* sp. se utilizó Agar MRS sin modificaciones, en forma aeróbica, con incubación de 72 horas a 30 °C (Vinderola y Reinheimer 1999). Adicionalmente, se realizó la determinación de microorganismos contaminantes en los distintos tratamientos, de acuerdo con los requerimientos de la Resolución 1804 (Colombia 1989), el Decreto 1880 de 2011 (Colombia 2011) y las técnicas descritas por Vanderzant y Splittstoesser (1992).

Diseño experimental y análisis de datos

Se empleó un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos y tres repeticiones. Las características fisicoquímicas del queso fueron evaluadas durante el almacenamiento (1, 9 y 18 días). El análisis de los datos se realizó mediante el *software* estadístico SAS (Statistical Analisys System), versión 5.0.

Resultados y discusión

Características fisicoquímicas de la leche empleada

En la tabla 1 se referencian las características fisicoquímicas y microbiológicas de la leche empleada para llevar a cabo los tratamientos. Estos resultados están acordes con los establecidos en la normatividad colombiana —Decreto 616 (Colombia 2006a) y Decreto 2838 (Colombia 2006b)— y con los reportados por Rivelli et al. (2011).

Tabla 1. Características fisicoquímicas de la leche

Característica	Valor	Característica	Valor
Materia grasa (%)	5,14 ± 0,18	Proteína (%)	3,60 ± 0,08
Lactosa (%)	4,76 ± 0,09	Densidad (g/ml)	1,031 ± 0,001
Sólidos no grasos (%)	9,10 ± 0,25	pH	6,43 ± 0,02
Sales minerales (%)	0,74 ± 0,01	Acidez (% ácido láctico)	0,138 ± 0,01
Punto crioscópico (°C)	-0,55 ± 0,03	Mesófilos (Log_{10} ufc/ml)	5,72 ± 0,02

Fuente: Elaboración propia

Parámetros fisicoquímicos de los quesos elaborados

pH. El análisis de varianza revela que se presentan diferencias significativas entre las muestras a medida que transcurren los días de almacenamiento y entre los tratamientos ($p < 0,05$). En la tabla 2, se observa que el tratamiento T1 (control) presentó los mayores valores de pH en todos los días evaluados, mientras que, en los demás tratamientos, el pH aumentó a medida que se incrementaba el porcentaje de sal adicionada al producto. La diferencia entre el pH del T1 y los demás tratamientos se puede explicar principalmente por la actividad de los microorganismos adicionados, pues estos degradan la lactosa en ácido láctico, lo cual ocasiona la disminución del pH de las muestras.

Resultados similares fueron reportados por Burns et al. (2012) en estudios sobre queso fresco con cepas probióticas, quienes encontraron valores significativamente bajos en el pH de las muestras, al cabo de siete días de almacenamiento, tanto en los quesos con cultivo probiótico como en la muestra de control (esta última con un pH mayor). Además de esto, se observó en el presente estudio que el cloruro de sodio pudo haber tenido un efecto inhibidor sobre los microorganismos, lo cual limitaría su actividad. Esto se evidenció al comparar el tratamiento T2 (1,5 % NaCl) —que tuvo los recuentos más elevados de cepas probióticas y los valores de pH más bajos— con el tratamiento T5 (3,5 % NaCl) —que, por el contrario, presentó los recuentos más bajos de *B. animalis* y *L. lactis* y los valores más altos de pH—.

Tabla 2. pH, acidez, humedad y sólidos totales de los quesos durante el almacenamiento

Días	pH					% Acidez				
	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5
1	$6,33^{aA}$	$5,13^{bA}$	$5,32^{cA}$	$5,92^{dA}$	$5,93^{dA}$	$0,14^{aA}$	$0,95^{bA}$	$0,50^{cA}$	$0,33^{dA}$	$0,20^{eA}$
9	$6,15^{aB}$	$5,00^{bB}$	$5,03^{bB}$	$5,60^{cB}$	$5,88^{eB}$	$0,15^{aAB}$	$0,93^{bA}$	$0,64^{cB}$	$0,29^{dB}$	$0,20^{eA}$
18	$5,95^{aC}$	$4,92^{bC}$	$5,24^{cC}$	$5,50^{dC}$	$5,72^{eC}$	$0,16^{aB}$	$1,07^{bB}$	$0,66^{cC}$	$0,37^{dC}$	$0,34^{eB}$
Días	**% Humedad**					**% Sólidos totales**				
	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5
1	$57,86^{aA}$	$55,27^{cA}$	$57,79^{aA}$	$56,93^{bA}$	$55,50^{cA}$	$42,14^{aA}$	$44,74^{bA}$	$42,21^{aA}$	$43,07^{cA}$	$44,50^{bA}$
9	$53,73^{aB}$	$54,42^{aB}$	$54,04^{aB}$	$49,94^{bB}$	$47,96^{cB}$	$46,27^{aB}$	$45,58^{aB}$	$45,96^{aB}$	$50,06^{bB}$	$52,04^{cB}$
18	$51,87^{aC}$	$53,34^{aC}$	$51,05^{aC}$	$47,04^{bC}$	$45,72^{bC}$	$48,13^{aC}$	$46,66^{aC}$	$48,95^{aC}$	$52,96^{bC}$	$54,28^{bC}$
Días	**% Cenizas**					**% Proteína**				
	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5
1	$4,12^{aA}$	$3,16^{bA}$	$3,33^{cA}$	$3,85^{dA}$	4.57^{eA}	$19,07^{aA}$	$19,21^{aA}$	$19,64^{aA}$	19.70^{aA}	$19,74^{aA}$
9	$4,25^{aA}$	$3,41^{bB}$	$3,81^{cB}$	$3,93^{cA}$	$4,80^{dB}$	$19,96^{aB}$	$19,95^{aB}$	$19,94^{aB}$	$20,71^{aB}$	$19,81^{aB}$
18	$4,28^{aA}$	$3,44^{bB}$	$4,16^{aC}$	$4,11^{aB}$	$4,94^{cB}$	$20,82^{abC}$	$20,08^{aB}$	$20,40^{abC}$	$21,27^{bC}$	$19,90^{aC}$

(Continúa)

© 2016 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

(Continuación tabla 2)

Días	% Grasa					% NaCl				
	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5
1	24,59^{cA}	23,50^{dA}	25,42^{aA}	26,25^{bA}	26,00^{bA}	1,63^{aA}	1,31^{bA}	1,68^{aA}	2,04^{cA}	3,15^{dA}
9	26,45^{aB}	26,83^{abB}	26,50^{aB}	27,42^{bB}	27,30^{bB}	1,87^{aB}	1,43^{bB}	1,91^{cB}	2,47^{dB}	3,60^{eB}
18	28,00^{aC}	27,67^{abA}	26,94^{cbB}	26,60^{cA}	27,92^{aC}	1,94^{aC}	1,48^{bC}	1,97^{aC}	2,54^{cC}	3,81^{dC}

a, b, c, d Diferentes letras en una misma fila indican una diferencia significativa entre los promedios de los tratamientos ($p < 0,05$)
A, B, C Diferentes letras en una misma columna indican una diferencia significativa entre los tiempos de almacenamiento ($p < 0,05$)
Fuente: Elaboración propia

El *B. animalis* presentó una disminución significativa en su población, entre los días 1 y 9 de almacenamiento (tabla 3), con excepción del tratamiento T5, cuya disminución de población fue baja; mientras que para los días 9 y 18, la población de *B. animalis* no exhibió diferencia significativa (con la excepción de T2), lo que podría deberse de manera general a una adaptación de este a las distintas condiciones de cada tratamiento. Por su parte, las cepas de *L. lactis* no presentaron diferencia significativa en su población durante los primeros 9 días, pero a los 18 días de almacenamiento del queso, su población disminuyó.

Estos datos nos sugieren que los procesos fermentativos de las bacterias probióticas empleadas disminuyeron el pH del producto, con un descenso de este, al noveno día de almacenamiento, hasta unos valores entre 5,00 y 5,88 para T2 y T5, respectivamente. Tales valores afectaron sensiblemente al *B. animalis*, cuya población disminuyó bastante; mientras que las cepas de *L. lactis* presentaron mayor estabilidad frente a las condiciones del medio y no exhibieron una diferencia significativa en su recuento hasta este momento. Estos hechos pueden deberse al proceso de adaptación y fermentación de la lactosa por parte de las bacterias probióticas, sobre todo, de las cepas de *L. lactis* y *L. cremoris*.

Dentro de los primeros nueve días de almacenamiento, la población de estas bacterias no varió significativamente, mientras que después de este tiempo su concentración se redujo de manera importante, lo cual ocasionó una menor actividad metabólica y una menor producción de ácido. Alrededor del 98 % de la lactosa se retiró durante el drenaje (como lactosa o lactato), a través del suero de la leche. Esto afectó la producción de ácido durante el almacenamiento, cuyo valor es el resultado de la fermentación de la lactosa residual por parte de los microorganismos iniciadores y probióticos (Fox et al. 2000).

Tabla 3. Recuento de *B. animalis*, *L. lactis* spp. *lactis* y *L. lactis* spp. *cremoris* (Log_{10} ufc/g)

Días	T1 (2,0 % sal)		T2 (1,5 % sal)		T3 (2,0 % sal)		T4 (2,5 % sal)		T5 (3,5 % sal)	
	B. animalis	*L. lactis cremoris*	*B. animalis*	*L. lactis cremoris*	*B. animalis*	*L. lactis cremoris*	*B. animalis*	*L. lactis cremoris*	*B. animalis*	*L. lactis cremoris*
1	NC		8,11^{aA}	9,89^{aA}	8,04^{abA}	9,44^{bA}	7,96^{bcA}	9,33^{cbA}	7,88^{cA}	9,22^{cA}
9	NC		7,97^{aB}	9,53^{aA}	7,87^{aB}	9,37^{bA}	7,84^{abAB}	9,28^{bA}	7,71^{bA}	9,15^{cA}
18	NC		7,78^{aC}	8,63^{aB}	7,75^{aB}	8,58^{aB}	7,74^{aB}	8,39^{aB}	7,69^{aA}	8,60^{aB}

a, b, c, d Diferentes letras en una misma fila indican diferencia significativa entre los promedios de los tratamientos ($p < 0,05$)
A, B, C Diferentes letras en una misma columna indican diferencia significativa entre los tiempos de almacenamiento ($p < 0,05$)
NC: no hubo crecimiento
Fuente: Elaboración propia

Acidez. Como puede observarse en la tabla 2, la acidez en los tratamientos 1, 3 y 4 aumentó significativamente entre los días 1 y 9 de almacenamiento del producto. Después del noveno día, no se presentó una diferencia importante en el T1, mientras que para los demás tratamientos dicho valor aumentó significativamente. La acidez presentó una relación inversa respecto a los valores de pH, pues el T1 exhibió los menores valores en acidez y los pH más elevados. En los demás tratamientos, en cambio, se evidenció que la acidez aumentó significativamente a medida que se incrementaba el contenido de sal. Durante los días 1 y 9, en los tratamientos T2, T3 y T4, la acidez aumentó bastante, mientras que el valor del pH disminuyó; sin embargo, entre los días 9 y 18, todas las muestras presentaron una disminución en su acidez con un consecuente aumento en el pH.

Este comportamiento halla su explicación en una elevada actividad metabólica de los microorganismos durante los primeros nueve días de almacenamiento del producto, seguido por una disminución de esta posiblemente por agotamiento de los nutrientes necesarios para su desarrollo. Este hecho concuerda con los recuentos de cepas de *L. lactis*, que se mantuvieron constantes dentro de los primeros nueve días de almacenamiento, con una subsecuente disminución de su población. Souza y Saad (2009) obtuvieron resultados similares en estudios sobre queso fresco, en los cuales la acidez de los tratamientos realizados iba en aumento de manera relevante a lo largo de los días de almacenamiento de las muestras. Los autores le atribuyeron este comportamiento al *Streptococcus thermophilus*, que produce pequeñas cantidades de ácido fórmico y CO_2, a partir de la lactosa, lo cual ocasiona un aumento de la acidez.

Este aumento también se evidencia al comparar el T3 con el T1 (control), ya que ambos tienen la misma concentración de NaCl y se diferencian únicamente en que el primero presenta adición de cultivos probióticos, mientras que el segundo no. Como se observa en la tabla 2, tanto la acidez como el pH presentan diferencia significativa en estos dos tratamientos: el pH varía inversamente a la acidez de las muestras. Lo anterior corrobora la influencia del *B. animalis* y del *L. lactis* en las características fisicoquímicas del queso elaborado.

Humedad. Este parámetro presentó una diferencia significativa ($p < 0,05$) a lo largo del tiempo de almacenamiento y entre los tratamientos (tabla 2). En general, su valor disminuyó con el aumento del tiempo de almacenamiento. En los tratamientos con cultivos probióticos, el descenso de humedad se promovió con el aumento del contenido de sal en ellos, con excepción del día 1, en el que el T2 muestra un comportamiento diferente, pues arroja un valor menor. Esto puede estar relacionado con el pH bajo (5,13) exhibido en ese momento, como causa de una mayor pérdida de humedad. Al respecto, Alais (1985) expone que hay una relación entre el pH y el porcentaje de humedad adquirida, ya que la fermentación láctica, hace que el pH se vuelva más ácido (o aumente la acidez), lo que disminuye el contenido de humedad en los quesos.

Lo anterior también puede verse reflejado en los resultados de los tratamientos con microorganismos probióticos, que obtuvieron descensos de humedad entre los días 1 y 9, y que, paralelamente, exhibieron un aumento de acidez y un pH más bajo. Este resultado es semejante al reportado por Fritzen-Freire et al. (2010) en la elaboración de queso fresco de Minas con cultivos probióticos. La tasa de sinéresis está directamente relacionada con la acidez y, por lo tanto, inversamente relacionada con el pH. A medida que la concentración de iones de hidrógeno aumenta durante la acidificación, las fuerzas repulsivas decrecen, lo que hace que las micelas de caseína se agreguen (Fox et al. 2000; Souza y Saad 2009).

Ong y Shah (2009) expresaron que la caída en el pH del queso *cheddar* probiótico es probablemente uno de los factores que causa la reducción significativa del contenido de humedad en estos. Ellos encontraron pequeñas porciones de suero en los empaques del queso almacenado a 8 °C después de 24 semanas, probablemente, debido a la inducción de enlaces proteína-proteína en la matriz de caseína por la disminución del pH, lo que conduciría a la sinéresis.

© 2016 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

Sólidos totales. Para todos los tratamientos, el porcentaje de los sólidos totales aumentó significativamente cuando se incrementó el tiempo de almacenamiento. Así mismo, para T2, T3, T4 y T5, los sólidos totales aumentaron al incrementar el contenido de sal en los tratamientos, con excepción de T2, que en el día 1 presentó un mayor valor de dicho parámetro que los demás quesos. En consecuencia, se observó una relación inversa entre el contenido de humedad de las muestras y el porcentaje de sólidos totales de estas para todos los tratamientos (tabla 2).

Con respecto a esto, Arteaga (2004) expresó que el comportamiento de los sólidos totales depende directamente del comportamiento de la humedad, parámetros que son inversamente proporcionales. Según lo anterior, puede asumirse en este estudio que los factores que logren descender la humedad, aumentarán consecuentemente los sólidos totales. Ahora bien, la disminución de la humedad y el aumento de los sólidos totales (que se dan con el incremento del porcentaje de sal en los tratamientos y con los días de almacenamiento) pudieron ser causados por el NaCl, ya que este promueve en la cuajada un mayor drenaje de suero o sinéresis y complementa el desuerado durante el almacenamiento por su acción higroscópica (Alais 1985). Es probable que este sea el principal motivo de la disminución de la humedad en las muestras y del consecuente aumento de los sólidos totales, y no la disminución de pH provocada por la adición de los cultivos probióticos. Esto es así con excepción del T2 (día 1), en el que posiblemente este parámetro sí ejerció una mayor influencia en la pérdida de humedad.

Cenizas. Se evidenció un aumento significativo en el porcentaje de cenizas en los tratamientos realizados y en las muestras, a lo largo del tiempo de almacenamiento (tabla 2) y con el aumento de la concentración de sal. El T1 no presentó diferencia significativa a través del tiempo de almacenamiento evaluado, al igual que el T4 entre los días 1 y 9, y el T2 y el T5 entre los días 9 y 18.

Dado que el T3 (2,0 % de sal, con probióticos) no presenta homogeneidad con T1 (2,0 % de sal, sin probióticos) en los primeros días de almacenamiento (1 y 9), es probable que la adición de los cultivos probióticos en los quesos incida en los valores de cenizas durante los primeros días de almacenamiento, debido a que se incrementa la acidez, lo cual afecta el grado de desmineralización. Un análisis semejante podría explicar el comportamiento que presentó el T2, el cual contiene la menor concentración de NaCl y la mayor población de cepas probióticas: el aumento de la acidez de estas incidió en la desmineralización de las muestras. Al respecto, Alais (1985) expresa que las sales del queso se determinan globalmente bajo la forma de cenizas (calcio y fósforo principalmente). El contenido de cenizas (sin cloruro) varía de 0,19 % a 2,6 % en los quesos de acuerdo con la desmineralización por la acidez. Esto quiere decir que existe una relación entre los cloruros y las cenizas, según la cual cabe esperar que a mayor cantidad de cloruros (NaCl) mayor presencia de cenizas. Estas últimas dependerán también del grado de acidez, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

Proteína. El análisis de varianza reporta que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, pero sí en las muestras, a lo largo del tiempo de almacenamiento (tabla 2). El incremento en el porcentaje de proteína es normal si se tiene en cuenta que la humedad de las muestras fue disminuyendo con el tiempo. Resultados similares a estos fueron obtenidos por Fritzen-Freire et al. (2010), quienes, al estudiar la influencia del *Bifidobacterium* sp. Bb-12 y la incorporación de ácido láctico en las propiedades del queso fresco de Minas, no evidenciaron diferencias significativas en el contenido de proteína entre los tratamientos realizados.

Al aplicar el test de comparación múltiple se evidenció que no existió diferencia significativa en el contenido de proteína entre los días 1 y 18 en todos los tratamientos, con excepción del T4, que presentó la mayor concentración (21,27 %). El tratamiento T5 presentó el menor porcentaje de proteína, lo cual es contradictorio ya que exhibió el menor valor de humedad. Esto probablemente se debió a que la concentración de sal (3,5 % durante la etapa de salado-prensado para este tratamiento)

causó una mayor solubilización de la proteína en comparación con los demás ensayos, lo cual generó su pérdida en el suero liberado. Con respecto a esto, Alais (1985) reportó que uno de los efectos del salado es un ligero aumento de la solubilidad de las proteínas del queso fresco en el agua que sale de este durante el salado.

Ahora bien, según los resultados acá obtenidos, puede pensarse que la adición de los cultivos probióticos a los quesos no afectó de manera significativa el valor de proteína durante el tiempo de almacenamiento, de acuerdo con la homogeneidad estadística que presentaron el T1 (2,0 % de sal, sin probióticos) y el T3 (2,0 % de sal, con probióticos). Sin embargo, el T2 —que tenía la menor concentración de NaCl (1,5 %)— presentó en promedio el menor contenido de proteínas y los mayores recuentos de *L. lactis* y *B. animalis* (tabla 3): es posible que los cultivos probióticos hayan efectuado una leve proteólisis en el producto durante el almacenamiento.

Hay que resaltar que, aunque no se estudió la proteólisis en los quesos, no se descarta su posible efecto sobre las proteínas totales. Según Alais (1985), el contenido en proteasas del *L. lactis* (objeto de estudio) y del *Lactobacillus* sp. corresponde a enzimas intracelulares o que están fuertemente ligadas a la pared microbiana, las cuales no logran ejercer una proteólisis rápida y amplia en el medio. Sin embargo, las proteasas de las paredes son aptas para producir péptidos y aminoácidos a expensas de la caseína.

Grasa. El análisis de varianza reporta diferencia significativa entre los tratamientos y entre las muestras a lo largo del tiempo de almacenamiento. En la tabla 2 se observa que el T1 y el T2 fueron homogéneos en el noveno día de muestreo, pues presentan en promedio porcentajes de grasa muy similares (26,34 % y 26,28 %, respectivamente). Según lo anterior, la adición de cultivos probióticos no afectó de manera significativa la cantidad de grasa retenida en los quesos durante el tiempo de almacenamiento. De manera general, se observa que el porcentaje de grasa de los tratamientos aumentó a través del tiempo de almacenamiento, lo cual está relacionado con la humedad. Con la disminución de esta última durante el almacenamiento, se incrementa el porcentaje de los demás componentes (el de grasa, entre ellos).

El T2 presentó el menor contenido de grasa, lo que lleva a pensar que su bajo contenido en sal (1,4 %) permitió una mayor acción de las lipasas, que junto con el elevado recuento de probióticos (tabla 3) facilitó una leve lipólisis. Según Alais (1985), la sal inhibe mucho menos a las lipasas que a las proteasas, sin embargo, el análisis estadístico muestra que no existe diferencia significativa entre el T1 y el T2 en los días 9 y 18 de almacenamiento. Hay que resaltar que, aunque no se estudió la lipólisis del queso, no se descarta su posible efecto sobre la grasa.

Cloruro de sodio. El análisis de varianza reportó diferencias significativas entre los tratamientos y entre las muestras a lo largo de los días de almacenamiento. Según la tabla 2, el contenido de cloruro de sodio en las muestras presentó un incremento significativo a medida que transcurrían los días de almacenamiento. Esto es normal si se tiene en cuenta que, con la disminución de la humedad (tabla 2), aumenta la concentración del NaCl en las muestras. Al respecto, Scott et al. (1991) afirman que la cantidad de agua presente en la cuajada determina la concentración de las sustancias solubles presentes en ella (NaCl, en este caso). Resultados similares fueron descritos por Kiliç et al. (2009), durante la manufacturación del queso turco beyaz añadido con un cultivo de cepas mixtas probióticas, en el cual la cantidad de grasa y de sal aumentó durante el almacenamiento de las muestras.

En el primer día de muestreo, todos los tratamientos exhibieron una concentración de NaCl inferior a la del tratamiento correspondiente en días posteriores. Scott et al. (1991) afirman que, con el aumento de la velocidad de acidificación y con la disminución del pH, el metabolismo de los cultivos lácticos promueve la retracción de la cuajada, lo cual facilita la eliminación del suero, de la lactosa y de otras sustancias solubles. A partir de lo anterior, es posible explicar por qué los tratamientos presentaron dicho comportamiento.

© 2016 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

Recuento de microrganismos indicadores

En la tabla 4 se observa el recuento de microrganismos indicadores, al cabo de los 18 días de almacenamiento para todos los tratamientos. Los resultados de este procedimiento se encuentran dentro de los parámetros establecidos en la Resolución 1804 (Colombia 1989), relacionados con la implementación de buenas prácticas de manufactura durante la elaboración y conservación de los tratamientos, lo que hace que estos productos sean aptos para el consumo humano.

Tabla 4. Recuento de microrganismos contaminantes en el queso al término de los 18 días de conservación

Recuento	T1	T2	T3	T4	T5
Coliformes fecales (nmp)	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Mohos y levaduras (ufc/g)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Staphylococcus aureus (ufc/g)	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Salmonella sp./ 25 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Fuente: Elaboración propia

Conclusiones

El aumento de las concentraciones de sal en los tratamientos disminuyó significativamente los recuentos del *B. animalis*, el *L. lactis* spp. *lactis* y el *L. lactis* spp. *cremoris* durante los primeros 9 días de almacenamiento. Se presentó, por tanto, una mayor viabilidad en los tratamientos con 1,5 % y 2 % de cloruro de sodio, con recuentos mínimos del orden de 107 ufc/g y 109 ufc/g para el *Bifidobacterium* sp. y el *Lactococcus* sp., respectivamente. Al final de la investigación no se presentó diferencia significativa, con valores alrededor de 10^7 ufc/g y 10^8 ufc/g, respectivamente.

El pH y la acidez son variables que se vieron influenciadas directamente por la adición de cepas microbianas al queso costeño, así como por la variación en la concentración de sal en los tratamientos. Estos parámetros presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, pues variaron inversamente durante el tiempo de almacenamiento y con el aumento en la concentración de sal. El porcentaje de sólidos totales, proteína, grasas, cenizas y NaCl aumentó a lo largo del tiempo de almacenamiento y varió de manera inversa con la humedad de las muestras, ya que este último parámetro disminuyó a medida que se incrementó la concentración de sal adicionada y según el paso del tiempo de conservación.

Descargos de responsabilidad

Los autores están de acuerdo con la publicación del presente artículo y declaran que no existe ningún conflicto de interés que afecte los resultados.

Referencias

Abad-Castillo JC, Llenque-Díaz LA. 2014. Efecto del sobrenadante del cultivo de *Bifidobacterium animalis lactis* sobre la supervivencia de Salmonella typhi. Rev Cient Estudiantes. 2(1):1-7.

Alais C. 1985. Ciencia de la leche, principios de técnica lechera. Barcelona: Editorial Reverté S.A.

[AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of analysis. 15th ed. Arlington, EE. UU.: AOAC International.

[APHA] American Public Health Association. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington DC: APHA, AWWA, WPCF.

Arteaga MM. 2004. Evolución de la maduración del queso chanco elaborado con adición de suero en polvo [tesis de maestría]. [Valdivia, Chile]: Universidad Austral de Chile.

Boza E, Morales I, Henderson M. 2010. Development of mature cheese with the addition of the probiotic culture *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LC-01. Rev Chil Nutr. 37(2):215-223.

Burns P, Cuffia F, Milesi M, Vinderola G, Meinardi C, Sabbag N, Hynes E. 2012. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter *Lactobacilli* in soft cheeses. Food Microbiol. 30(1):45-50.

Cardarelli HR, Buriti FC, Castro IA, Saad SMI. 2008. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. LWT Food Sci Technol. 41(6):1037-1046.

Castaño MV. 2000. Viabilidad de un cultivo probiótico en un queso fresco bajo en grasa. [trabajo de grado]. [Manizales, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia.

Chávez G. 2006. Revisión experimental del intervalo de pH para la determinación de cloruros por el método de Mohr. Rev Bol Qui. 23(1):24-26.

Colombia, Ministerio de Protección Social. 2006a. Decreto 616, Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expenda, importe o exporte en el país. Bogotá, Colombia: Diario Oficial, 28 de febrero de 2006. ICA; [consultado mayo 2015]. http://www.ica.gov.co/getattachment/15425e0f-81fb-4111-b215-63e61e9e9130/2006D616.aspx.

Colombia, Ministerio de Protección Social. 2006b. Decreto 2838, Por el cual se modifica parcialmente el Decreto 616 de 2006 y se dictan otras disposiciones. Bogotá, Colombia: Diario Oficial, 24 de agosto de 2006. ICA; [consultado mayo 2015]. http://www.ica.gov.co/getattachment/d3de0922-5311-4ee3-b186-33c1f4c5afe7/2006D2838.aspx.

Colombia, Ministerio de Protección Social. 2011. Decreto 1880, Por el cual se señalan los requisitos para la comercialización de leche cruda para consumo humano directo en el territorio nacional. Bogotá, Colombia: Diario Oficial, 27 de mayo de 2011, 3 de febrero de 1989. Invima; [consultado junio 2015]. file:///D:/Descargas/DECRETO%20NO.%201880%2027%20MAY%20DE%202011.pdf

Colombia, Ministerio de Salud. 1986. Resolución 2310, Por la cual se reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 09 de 1979, en lo referente a procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los Derivados Lácteos. . Bogotá, Colombia: Ministerio de Salud, 24 de febrero de 1986; [consultado junio 2015]. https://www.invima.gov.co/images/stories/resoluciones/resolucion_02310_1986.pdf.

Colombia, Ministerio de Salud. 1989. Resolución 1804, Por la cual se modifica la Resolución N.° 02310 de 1986, (24 de febrero) que reglamenta parcialmente el título V de la Ley 09 de 1989. Bogotá, Colombia: Ministerio de Salud, 3 de febrero 1989. Invima; [consultado junio 2015]. https://www.invima.gov.co/images/stories/resoluciones/resolucion_01804_1989.pdf.

Coman MM, Cecchini C, Verdenelli MC, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. 2012. Functional foods as carriers for SYNBIO®, a probiotic bacteria combination. Int J Food Microbiol. 157(3):346-352.

Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP. 2000. Fundamentals of cheese science. Gaithersburg, EE. UU.: Aspen Publishers.

Fritzen-Freire CB, Müller CMO, Laurindo JB, Prudêncio ES. 2010. The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. J Food Eng. 96(4):621-627.

[Icontec] Instituto colombiano de normas técnicas. 2000. NTC 750. Productos lácteos. Queso. Tercera edición. Santafé de Bogotá, Colombia: Instituto colombiano de normas técnicas.

[ICTA] Instituto de Ciencia y Tecnología. 1998. Inventario y desarrollo de la tecnología de productos lácteos campesinos en Colombia. Manual de elaboración de queso campesino y prensado. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia-ICTA.

Kılıç GB, Kuleaşan H, Eralp İ, Karahan AG. 2009. Manufacture of Turkish Beyaz cheese added with probiotic strains. LWT Food Sci Technol. 42(5):1003-1008.

Manzano C, Estupiñán D, Poveda E. 2012. Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia. Rev Chil Nutr. 39(1):98-110.

Ong L, Shah NP. 2009. Probiotic Cheddar cheese: influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. LWT Food Sci Technol. 42(7):1260-1268.

© 2016 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

Pinto M, Vega S, Pérez N. 1998. Métodos de análisis de la leche y derivados. Garantía de calidad. Valdivia, Chile: UACH y Universidad Autónoma Metropolitana.

Revelli GR, Sbodio OA, Tercero EJ. 2011. Estudio y evolución de la calidad de leche cruda en tambos de la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero, Argentina (1993-2009). RIA Rev Investig Agropecu. 37(2):128-139.

Rizzardini G, Eskesen D, Calder PC, Capetti A, Jespersen L, Clerici M. 2012. Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains *Bifidobacterium* animalis spp. lactis, BB-12® and *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei*, L. casei 431® in an influenza vaccination model: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. Br J Nutr. 107(6):876-884.

Scott R, Robinson RK, Wilbey RA. 1991. Fabricación de queso. Zaragoza, España: Acribia Editorial.

Souza CHB, Saad SMI. 2009. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. LWT Food Sci Technol. 42(2):633-640.

Vanderzant C, Splittstoesser D, editors. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of food. 3rd ed. Washington, DC: APHA.

Vinderola CG, Reinheimer JA. 1999. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. Int Dairy J. 9(8):497-505.