



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

**Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y
Agrimensura**

***“Flora de levaduras en Quesos Artesanales de Corrientes.
Su actividad bioquímica y su interacción con bacterias de
starters”***

TESIS DOCTORAL

Bioquímica Marina Cecilia Cardozo

Directora: Marta Susana Carrasco

Co-director: Ángel José Vicente Fusco

Subdirectora: Olga Myrian Vasek

Año 2010



*Este trabajo de Tesis fue realizado en el Laboratorio de
Bromatología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias
Exactas, Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del
Nordeste, Corrientes*

y en el



*Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Facultad de
Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe*

Agradecimientos

Gracias a la Dra. Marta Carrasco por brindarme su experiencia, conocimiento y constante ayuda en la realización del presente trabajo.

Gracias al Dr. Ángel Fusco quién confió en mí y me proveyó los medios necesarios para la materialización de este proyecto.

Gracias a la Dra. Olga Vasek por iniciarme en la investigación y colaborar durante todo el desarrollo de este proceso.

Gracias a la Secretaria General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste por otorgarme las becas que me permitieron realizar el doctorado.

Gracias a amigos y compañeros del laboratorio, entre ellos Belén, Guada, Pinty y Victoria, por su ayuda, consejo y amistad.

Gracias a los profesionales del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química (UNL) por permitirme trabajar en su laboratorio. Especialmente a Hugo, Nancy y Karen por hacer tan amenas y productivas mis pasantías en la FIQ.

Gracias a Verónica por la amabilidad de hospedarme en su hogar durante mis estadías en la ciudad de Santa Fe.

Gracias a Carolina por su consejo y apoyo.

Finalmente, gracias a quien me ha acompañado y soportado incondicionalmente por casi la mitad de mi vida, Francisco, por la ayuda, contención y cariño brindados día a día.

Índice
Capítulo 1: Introducción

1.1.Evolución de la producción de leche en la Argentina.....	2
1.2.Características de la producción lechera. Elaboración y consumo de quesos en Argentina.....	5
1.3.Las exportaciones argentinas de productos lácteos.....	8
1.4.Quesos. Legislación. Clasificaciones.....	9
1.5.La leche cruda como materia prima para la elaboración de quesos.....	11
1.6.Conservación de la leche por enfriamiento.....	12
1.7.Elaboración de quesos. Etapas del proceso.....	13
1.7.1.Preparación de la leche.....	13
1.7.2.Adición de cultivo iniciador.....	14
1.7.3.Formación de la cuajada.....	15
1.7.4.Desuerado.....	16
1.7.5.Moldeo.....	17
1.7.6.Salado.....	17
1.7.7.Maduración.....	18
1.8.Fermento o cultivo iniciador.....	22
1.9.Efectos positivos y negativos de levaduras en productos lácteos.....	23
1.10.Levaduras en quesos.....	26
1.10.1.Aportes de las levaduras al proceso de maduración de quesos.....	37
1.10.2.Interacciones entre levaduras y bacterias lácticas en quesos.....	39
1.11.Quesos Artesanales de Corrientes.....	42
Objetivos.....	45

Capítulo 2: Materiales y Métodos

2.1.Elaboración del Queso Artesanal de Corrientes con el agregado del fermento "Gaucho".....	47
2.1.1.Reactivación de las cepas del fermento empleado.....	48
2.1.2.Purificación y control de las cepas.....	51
2.1.3.Conservación de las cepas del fermento.....	51
2.1.4.Pruebas de escalamiento y estandarización del fermento para la elaboración a escala de producción.....	51
2.1.5.Preparación del fermento.....	52

2.1.6.Elaboración de quesos.....	52
2.2.Recuento y aislamiento de levaduras a partir de materia prima y producto final a distintos períodos de maduración.....	55
2.2.1.Muestreo y preparación de las muestras.....	55
2.2.2.Recuento total de levaduras.....	55
2.2.3.Aislamiento y purificación de levaduras.....	55
2.2.4.Conservación.....	56
2.3.Caracterización taxonómica de las cepas aisladas.....	56
2.3.1.Características morfológicas.....	56
2.3.2.Características fisiológicas y bioquímicas.....	57
2.4.Caracterización tecnológica de las cepas aisladas.....	61
2.4.1.Respuesta a distintos valores de pH.....	62
2.4.2.Respuesta a distintas temperaturas.....	62
2.4.3.Respuesta a distintas concentraciones de ácido láctico.....	63
2.4.4.Respuesta a distintas concentraciones de lactosa.....	63
2.4.5.Respuesta a distintas concentraciones de cloruro de sodio.....	63
2.5.Propiedades tecnológicas de las cepas aisladas.....	64
2.5.1.Actividad proteolítica.....	64
2.5.2.Actividad lipolítica.....	65
2.5.3.Degradación de aminoácidos a amoníaco.....	65
2.5.4.Metabolización de aminas biógenas.....	65
2.6.Interacciones con las bacterias lácticas del fermento.....	66
2.6.1.Determinación de la actividad antagónica.....	66
2.6.1. a Método de estrías cruzadas.....	66
2.6.1. b Método de difusión en agar.....	66
2.6.2.Estimulación o inhibición del crecimiento de levaduras por bacterias lácticas.....	67
2.7.Estimulación de propiedades tecnológicas deseadas.....	68
2.7.1.Estimulación de actividad proteolítica y lipolítica por métodos cualitativos	68
2.7.2.Estimulación de actividad proteolítica por métodos cuantitativos.....	69
2.8.Elaboración de quesos a escala de laboratorio usando el fermento "Gaucho" con la adición de levaduras como adjunto. Análisis sensorial.....	70
2.8.1.Microorganismos y condiciones de cultivo.....	70
2.8.2.Elaboración de quesos.....	71

2.8.3.Análisis sensorial de los quesos.....	71
2.8.4.Análisis estadístico.....	74

Capítulo 3: Resultados y Discusión

3.1.Elaboración del Queso Artesanal de Corrientes con el agregado del fermento "Gaucho"	76
3.1.1.Control de cepas del fermento. Características fisiológicas y micro-morfológicas de las cepas de bacterias lácticas.....	76
3.2.Recuento y aislamiento de levaduras.....	77
3.3.Caracterización taxonómica de las cepas aisladas.....	86
3.3.1.Características morfológicas.....	86
3.3.2.Características fisiológicas.....	86
3.4.Caracterización tecnológica de las cepas aisladas.....	106
3.4.1.Respuesta a distintos valores de pH y temperatura.....	106
3.4.2.Respuesta a distintos valores de concentración de ácido láctico y lactosa	110
3.4.3.Respuesta a distintos valores de concentración de cloruro de sodio.....	115
3.5.Propiedades tecnológicas de las cepas de levaduras.....	120
3.5.1.Actividad proteolítica.....	120
3.5.2.Actividad lipolítica.....	121
3.5.3.Degradación de aminoácidos a amoníaco.....	125
3.5.4.Capacidad para degradar aminas biógenas.....	128
3.6.Interacciones con bacterias lácticas constituyentes del fermento "Gaucho"	129
3.6.1.Determinación de la actividad antagónica.....	129
3.6.1. a Método de estrías cruzada.....	129
3.6.1. b Método de difusión en agar.....	131
3.6.2.Estimulación o inhibición del crecimiento de levaduras por bacterias lácticas.....	135
3.7.Estimulación de propiedades tecnológicas deseadas.....	139
3.7.1.Métodos cualitativos.....	139
3.7.2.Métodos cuantitativos.....	141
3.8.Elaboración de quesos a escala de laboratorio usando el fermento "Gaucho" con la adición de levaduras como adjunto.....	144
3.8.1.Microorganismos.....	144
3.8.2.Quesos Artesanales de Corrientes a escala de laboratorio.....	144
3.8.3.Análisis sensorial.....	147
3.8.3. a Ordenamiento de preferencia.....	147

3.8.3. b Ensayo de aceptabilidad utilizando escala hedónica.....	149
Capítulo 4: Conclusiones.....	154
Anexo I: Medios de cultivo y Reactivos.....	159
Anexo II: Características de los géneros hallados	167
Anexo III: Estadísticas.....	173

Capítulo 1

Introducción



1.1. Evolución de la producción de leche en la Argentina

Una de las principales producciones agropecuarias en la Argentina es la lechería.

En la última década una fuerte reconversión tecnológica tanto en el área industrial como en la producción primaria ha permitido al sector alcanzar niveles de calidad y eficiencia que lo posicionan en condiciones de competitividad internacional (CIL, 2009).

Además, los cambios y transformaciones que han tenido lugar en estos años le permitieron al país incrementar considerablemente su productividad.

Esto puede apreciarse en función de que de los 40.000 tambos que existían en el año 1978 y que producían 5.056 millones de litros de leche por año, hoy se estima que la República Argentina cuenta con alrededor de 12.000 a 13.000 tambos que totalizaron una producción de 10.054 millones de litros de leche en el año 2009 [Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación S.A.G.P. y A.].

Actualmente, la leche y sus derivados ocupan un lugar de importancia entre los productos alimenticios naturales, con un consumo creciente (Mastellone, 2000) de los alimentos industrialmente procesados.

Uno de los rasgos característicos en la evolución histórica del sector lechero argentino ha sido un acentuado comportamiento cíclico. Los modelos de producción, patrones de consumo, la evolución de la demanda y el funcionamiento de los mercados externos, fuertemente subsidiados, dieron lugar a una producción caracterizada por la combinación de dos ciclos, un ciclo anual estacional y otro plurianual (Gutman *et al.*, 2003).

En la Fig. 1.1 se puede apreciar la evolución de la producción de leche entrada a fábrica en la República Argentina durante el período comprendido entre 1970 y 2009.

Los períodos de expansión fueron seguidos por períodos de estancamiento, con un nivel de producción de 4.200 millones de litros desde 1950 hasta 1970 (James, 1997), seguido de un período recesivo que luego dio lugar a una nueva expansión a partir de 1982 que alcanzó a producir 6.200 millones en el año 1986.

Las exportaciones fueron esporádicas, poco significativas en relación al volumen producido y vinculadas a los excedentes de la producción sobre la demanda interna. Durante los años 1987 y 1988 se produjo un aumento en las exportaciones debido

justamente a la disminución del consumo interno por la crisis económica que atravesaba el país en esos años.

La evolución cíclica se atenuó durante la década de los 90. En un contexto de desregulación y apertura de la economía se registró un aumento en la producción a lo largo de ocho años consecutivos, hasta un récord de 10.329 millones de litros en 1999, sustentado en el incremento del consumo interno y las exportaciones que dio lugar a un crecimiento sostenido en la producción primaria e industrial (Gutman *et al.*, 2003). El plan real en Brasil provocó una expansión en la demanda de productos lácteos que contribuyó a estimular el mercado Argentino con producción alta y sostenida (Parellada y Schilder, 1999).

Además se produjeron cambios en la coyuntura internacional de la lechería. A partir de 1995 los países más importantes en consumo y producción de leche (países de la Unión Europea) tomaron medidas conducentes a limitar su producción. Esta restricción fue eliminando gradualmente los subsidios y liberando, consecuentemente, el mercado internacional (James, 1996) con una notable suba en los precios que también favoreció a la producción argentina.

En 1995 se produjeron 8.500 millones de litros de leche que provinieron de unos 23.000 tambos, lo que implica una expansión en la producción del 300 % respecto a la década del 70 (Zalazar, 1998; CIL, 1999; CIL, 2002).

El desarrollo histórico de la lechería argentina, sustentado en sus orígenes en un sistema pastoril, fue cambiando, sobre todo en los noventa, hacia otro semi-pastoril, con genética importada, aumento en el número de vacas de ordeño por hectárea y la aparición de mega-tambos (Gutman *et al.*, 2003).

A fines de los años noventa la expansión productiva llegó a su límite, como consecuencia de la crisis económica el mercado interno se contrajo al igual que la demanda externa. En el 2000 se produce una caída en la producción debida a condiciones climáticas adversas, a la que se sumaron la baja de precios y los factores antes mencionados (CIL, 2000).

Estos procesos reinstalaron el comportamiento cíclico, el sector lechero atravesó un período recesivo con fuertes caídas en la producción, cierre de tambos y expulsión de

pequeñas empresas. En el año 2002, según las estimaciones oficiales, la producción registró un descenso récord del 14,4 %, lo que implica un volumen de 8.111 millones de litros de leche producida en dicho año (CIL, 2003).

El declive en el número de explotaciones y existencias ganaderas fue marcado. El cierre de las explotaciones afectó a los productores más pequeños y por ello el promedio de vacas por tambo ascendió ligeramente. El número de tambos estimados para el año 2002 fue de 15.000 y el número de vacas por tambo de 117. El nuevo contexto económico afectó a la producción, debido al incremento en los insumos, que en muchos casos estaban relacionados directamente con el valor del dólar, y a la falta de ajuste en el precio y en los plazos de pago de la leche. Las consecuencias se manifestaron en que algunos productores no pudieron mantenerse en el negocio e incluso muchos debieron abandonar totalmente la producción (CIL, 2003).

La estructura del sector primario fue concentrándose a lo largo de los años, con una disminución en el número de tambos y un aumento en la escala productiva. El total de tambos en actividad, que ya había sufrido una disminución de casi un 50 % entre 1988 y 2000, tuvo una fuerte contracción adicional los años subsiguientes. La menor cantidad de explotaciones tamberas fue acompañada de un mayor tamaño de explotaciones, aumentos en la productividad e importantes mejoras en los patrones tecnológicos incorporados (Gutman *et al.*, 2003)

Las modificaciones macroeconómicas y regulatorias implementadas desde fines del 2001 introdujeron cambios significativos para la actividad en su conjunto. La devaluación de la moneda protegió a los mercados internos de las exportaciones pero a su vez el nuevo tipo de cambio promovió mayores colocaciones externas de productos lácteos con el consecuente incremento en los precios internos. Como consecuencia de la crisis y este aumento de precios el consumo interno también decreció marcadamente en los años 2002 y 2003 (CIL, 2003).

A partir del año 2004 comienza un nuevo período de crecimiento en la producción acompañado a partir del 2005 de un paulatino incremento en el consumo interno hasta el año 2009, alcanzando en este último año, una producción de 10.054 millones de litros de leche (S.A.G.P. y A.). Sin embargo, el número de tambos continuó disminuyendo, hoy se estima que existen entre de 13.000 y 12.000 explotaciones (Gutman *et al.*, 2003; Schaller, 2010).



Figura 1.1 Evolución de la producción de leche entrada a fábrica en la República Argentina

1.2. Características de la producción lechera. Elaboración y consumo de quesos en Argentina

En la actualidad la Industria Láctea Nacional está conformada por grandes y medianas empresas de capital nacional, grandes empresas multinacionales y numerosas pymes. Si se compara a la Argentina con otros países de reconocida tradición lechera, nuestro país se caracteriza por tener una gran proporción de empresas lácteas (www.quesosargentinos.gov.ar; CIL, 2003).

Los productos lácteos absorben entre el 75 y el 77 % de la producción de leche: quesos, leche en polvo, yogures, dulce de leche, manteca, crema, postres. El principal destino industrial de la leche en los últimos años en Argentina lo constituye la elaboración de quesos (S.A.G.P. y A.).

Según las últimas estadísticas de la S.A.G.P. y A., en el año 2009 el 41,28 % de la producción de leche de los tambos se destinó a la actividad quesera, el 18,20 % a la elaboración de leche en polvo, el 18,05 % a leche fluida, pasteurizada y esterilizada, y el 15,03 % restante a otros subproductos.

Algunas industrias lácteas, las de mayor envergadura, han adquirido y desarrollado innovaciones tecnológicas que las posicionan, en niveles cercanos a las que poseen las mejores prácticas internacionales.

Existen fuertes disparidades técnicas, económicas, productivas y organizativas en esta industria. La elaboración de quesos está presente en mayor o en menor medida en casi todos los establecimientos industriales. Las firmas más pequeñas se dedican casi exclusivamente a la elaboración de quesos, sobre todo los de pasta blanda, debido al elevado costo financiero que implica el estacionamiento de los quesos de larga maduración. En las grandes empresas se observa una mayor diversificación de la producción, pero la elaboración de quesos mantiene una posición destacable, alcanzando aproximadamente el 30 % del total, siendo más importantes la manufactura de quesos de pasta semidura y dura.

Según los últimos datos disponibles en la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Argentina ocupó el 17° lugar del ranking mundial en la producción de leche de vaca. Pero más destacado es su rol a nivel de producto final, ocupando el 9° lugar como productor de quesos y el 11° como productor de leches en polvo (4° en leches enteras) (Schaller, 2010). Dentro del continente americano Argentina y Brasil presentan una elevada producción de quesos que ha ido en aumento durante los últimos años.

En la Fig. 1.2 se presenta la evolución de la producción de queso desde 1989 hasta 2009. Durante la década del 90 la elaboración de quesos fue aumentando paulatinamente alcanzando las 454.429 toneladas en el año 1999. Posteriormente, la manufactura fue

disminuyendo año a año durante el período 2000-2003, como consecuencia de la crisis que atravesó el sector lechero que se iniciara a fines del 1998 (CIL, 2003). Sin embargo, en los últimos seis años la producción de quesos se recuperó rápidamente alcanzando un volumen de producción de 508.069 toneladas este último año (S.A.G.P. y A.).

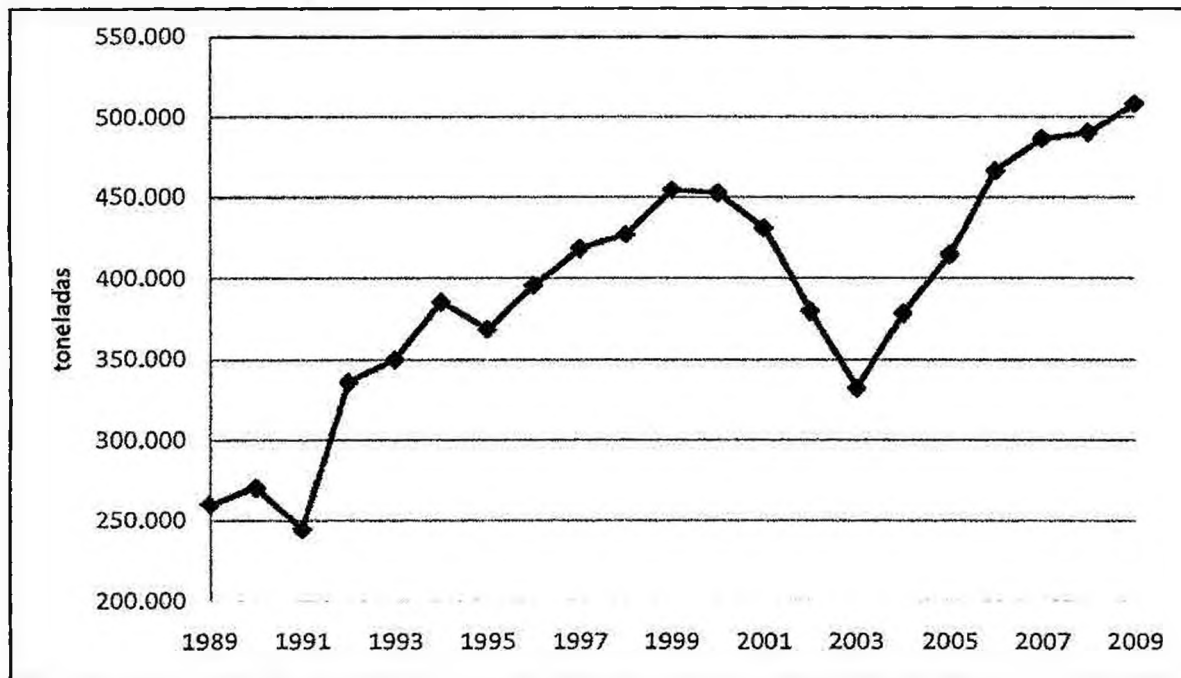


Figura 1.2 Evolución de la producción de quesos en la República Argentina

Teniendo en cuenta las distintas variedades de quesos elaborados en la Argentina (blandos, semiduros y duros), los de tipo blando tuvieron un marcado incremento (Fig.1.3) en su producción (120 %) en los últimos veinte años, a pesar de haberse visto afectada la industria lechera por la crisis económica del año 2001.

Las otras variantes de quesos, pasta semidura y dura, también presentaron incrementos en la producción aunque éstos fueron más paulatinos.

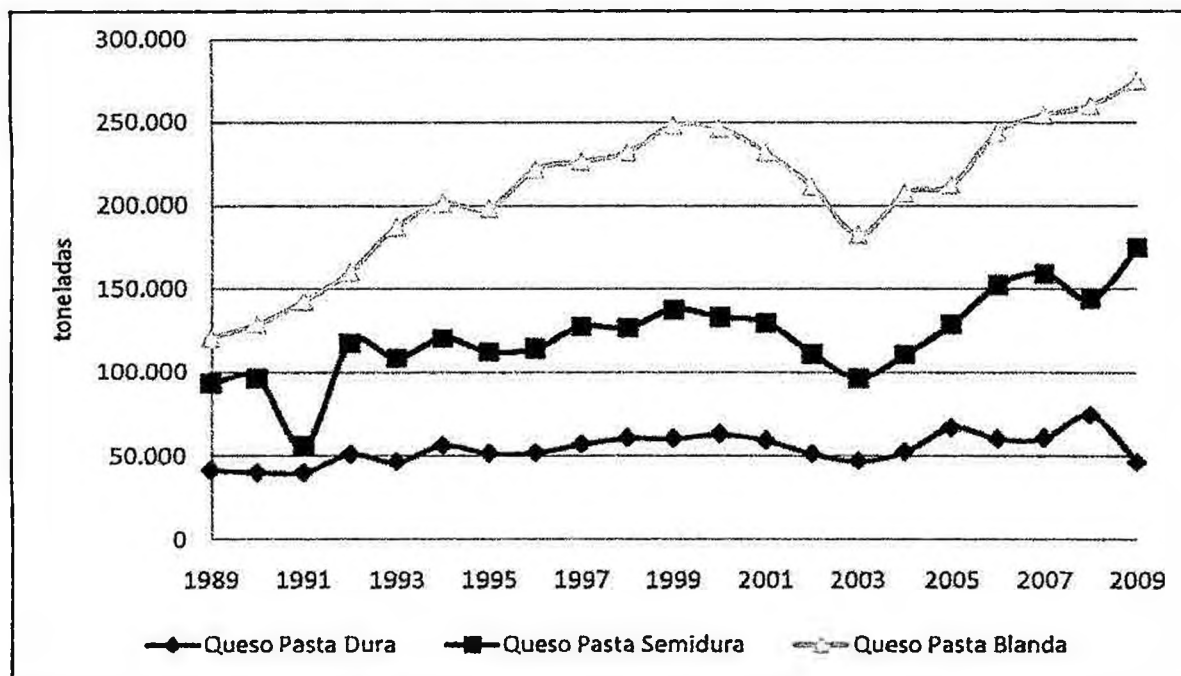


Figura 1.3 Producción de quesos en Argentina de acuerdo con su consistencia

La Argentina exhibe una alta tradición en el consumo de productos lácteos y su ingesta por habitante es comparable con la de los países desarrollados. La evolución del consumo interno por habitante, a pesar de haber sufrido depleciones debidas a las contracciones económicas entre los años 2001 y 2003, ha ido aumentando paulatinamente desde 1990 y ha evidenciado un interesante incremento en los últimos años.

Los quesos han sido uno de los productos que más prosperaron su demanda alcanzando en el año 2009 un consumo de 12,57 kg (S.A.G.P. y A.) por año y por habitante. Estos valores son comparables con el consumo en países como Estados Unidos (14,9 kg) y Australia (10,4kg) aunque inferior al consumo de países tradicionalmente queseros como Francia (23,6 kg) e Italia (24 kg).

1.3. Las exportaciones argentinas de productos lácteos

Las inversiones realizadas en las industrias lácteas están llevando a la Argentina a ocupar un lugar importante en los mercados mundiales de exportación, particularmente en el sector de las leches enteras en polvo, pero también, y cada vez en forma más pronunciada, en el fragmento quesos. Actualmente nuestro país vende al exterior

alrededor del 20 % de su producción doméstica, con volúmenes que alcanzaron en el 2009 casi las 310.000 toneladas. Entre los productos destacados, el 54 % corresponde a leche en polvo, el 15,4 % a quesos, y el 12 % a sueros y subproductos relacionados (S.A.G.P. y A.).

En el año 2007 según datos disponibles en la FAO, la Argentina fue el 4° exportador de leche entera en polvo y el 19° proveedor de quesos. El último año se colocaron productos lácteos en 108 países: Brasil, Argelia y Venezuela concentraron el 47 % del volumen total.

Entre los años 2000 y 2009 se incrementaron algunas categorías de alto valor agregado, entre ellas los quesos semiduros y se diversificaron los destinos de las exportaciones, su dimensión pasó (Schaller, 2010) de 67 en el año 2000 a 108 en la actualidad.

1.4. Quesos. Legislación. Clasificaciones

El Código Alimentario Argentino en su Artículo 605 (Res. Conj. SP y RS y SAGPA N° 33/2006 y N° 563/2006) define al queso como “el producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituída (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física, del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario; con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o especias y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes”.

Además especifica que “se entiende por Queso Fresco el que está listo para el consumo poco después de su fabricación” y “por Queso Madurado el que ha experimentado los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos de la variedad de queso”.

Las características de cada queso son definidas por su tamaño, forma, peso, color y aspecto externo; su composición intrínseca en materia grasa, sal y extracto seco; y su manufactura, que involucra distintas combinaciones de leche, agente coagulante, microorganismos y sal.

Los quesos se han clasificado de acuerdo con:

- el origen de la leche empleada (vaca, oveja, cabra, búfala),
- la forma de coagular la leche (con cuajo, sin cuajo),
- su consistencia (blandos, semiblandos, duros y extra duros),
- el proceso de manufactura o elaboración empleado y tratamiento del grano (pasta cruda y cocida),
- el tiempo de maduración (frescos, madurados),
- el tipo de microorganismos involucrados en su elaboración (sólo con bacterias, con bacterias y mohos, con mohos de crecimiento en la masa o en la superficie)
- país de origen y múltiples combinaciones de estos ítems.

El Reglamento Técnico General del Mercosur sobre Identidad y Calidad de quesos (GMC Res. Nº 79/94) y el Artículo 605 del Código Alimentario Argentino aplican a todos los quesos característicos de cada variedad, excluyendo los quesos fundidos y procesados por ultra alta temperatura, sin impedir el establecimiento de denominaciones y requisitos más específicos, la siguiente clasificación:

De acuerdo con el contenido en materia grasa del extracto seco:

- Extra graso o Doble crema: cuando contengan no menos del 60 %.
- Grasos: cuando contengan entre 45,0 y 59,9 %.
- Semigrasos: cuando contengan entre 25,0 y 44,9 %.
- Magros: cuando contengan entre 10,0 y 24,9 %.
- Descremados: cuando contengan menos de 10,0 %.

Utilizando los Métodos de toma de muestra sugeridos por FIL 50 C: 1999.

De acuerdo con el contenido de humedad, en porcentaje, en:

- Quesos de baja humedad (generalmente conocidos como de pasta dura): humedad hasta 35,9 %.
- Quesos de mediana humedad (generalmente conocidos como de pasta semidura): humedad entre 36,0 y 45,9 %.
- Quesos de alta humedad (generalmente conocidos como de pasta blanda o macíos): humedad entre 46,0 y 54,9 %.

- Quesos de muy alta humedad (generalmente conocidos como de pasta muy blanda o mole): humedad no menor a 55,0 %.
- Los quesos de muy alta humedad se clasificarán a su vez de acuerdo con: si han recibido o no, tratamiento térmico luego de la fermentación, en:
 - Quesos de muy alta humedad tratados térmicamente.
 - Quesos de muy alta humedad.

Método de toma de muestra: FIL 50 C: 1999.

1.5. La leche cruda como materia prima para la elaboración de quesos

En general los quesos se fabrican con leche de vaca, pero también existen distintas variedades que se elaboran a partir de leche proveniente de otras especies mamíferas. La leche de oveja se emplea para la elaboración de muchas variedades de quesos en Europa (Italia, Grecia, Portugal), como el queso Roquefort elaborado en Francia.

Independientemente de la variedad que se trate, la leche empleada en la elaboración debe ser de óptima calidad. En general, se entiende por calidad de la leche cruda al conjunto de características que determinan su grado de idoneidad para los fines previstos de tratamiento y empleo (Cersovsky *et al.*, 1982). Particularmente, la calidad de leche para quesería puede definirse como su aptitud para dar un buen queso en las condiciones características de trabajo y con un rendimiento satisfactorio. La misma se considera como la suma de dos atributos: el microbiológico y el químico. La calidad química implica la ausencia de sustancias extrañas o inhibitorias, la aptitud de la leche para ser coagulada y la composición (Tornadijo *et al.*, 1998). Los contaminantes químicos de importancia particular en tecnología quesera son los antibióticos y pesticidas, los primeros tienen repercusiones substanciales dado que pueden inhibir el desarrollo de los cultivos iniciadores con la consecuente alteración del producto final y pérdida de las características organolépticas satisfactorias.

Además la leche cruda debe ser de buena calidad microbiológica. Microorganismos patógenos pueden estar presentes en la leche cruda para elaboración de quesos, los mismos pueden derivarse de ubres infectadas (mastíticas), por este motivo es esencial la higiene sanitaria del rodeo para que la leche proceda de animales sanos. A lo anterior,

debe sumarse la contaminación producida durante el manejo en el ordeño, transporte de esta materia prima y elaboración de los quesos (Magariños, 2001). La contaminación de la leche puede provocar alteración del producto final, fundamentalmente debida a reacciones enzimáticas y fermentaciones indeseables pero también constituye una amenaza para la salud de los elaboradores y consumidores del queso. Por lo tanto, a fin de obtener una leche de buena calidad microbiológica se deben aplicar buenas prácticas de manufactura en todo el proceso de producción y mantener adecuada sanidad en las vacas, muy especialmente en lo que a mastitis se refiere.

Es deseable, por lo tanto, que la leche cruda destinada a quesería posea adecuada calidad biológica, para evitar reacciones indeseables, y se encuentre libre de compuestos inhibidores, tales como residuos de antibióticos que interfieran en el crecimiento de los cultivos iniciadores (Robinson, 1987).

1.6. Conservación de la leche por enfriamiento

La leche constituye un excelente medio de cultivo para determinados organismos, sobre todo para las bacterias mesófilas y, dentro de éstas, las patógenas, cuya multiplicación depende principalmente de la temperatura y presencia de otros microorganismos competitivos o de sus metabolitos (Magariños, 2001).

Las fábricas modernas de quesos operan eficazmente si cuentan con un suministro adecuado de leche cruda. La leche como materia prima no es empleada inmediatamente después de su llegada a la usina láctea, sino que, es almacenada durante varias horas o días hasta el momento de su utilización. Es conveniente que, durante este período, la leche cruda sea conservada apropiadamente. Por ello, la recolección y almacenamiento de la totalidad de la leche que ingresa a la quesería se ha convertido en una práctica habitual en muchas fábricas, lo que ha sido posible gracias al desarrollo de métodos de enfriamiento para el transporte y almacenamiento de leche. En el tambo, la leche se enfría a 4 °C, se almacena a esta temperatura en tanques refrigerados; se recoge en vehículos con cisternas refrigeradas y se transporta a la fábrica donde se almacena en silos isotérmicos hasta su uso. Muchas de las bacterias presentes en la leche cruda

pueden multiplicarse en forma apreciable, salvo que el producto se congele, pero a 4 °C e incluso a temperatura más bajas, su crecimiento continúa, aunque en forma más lenta.

En la microbiota presente en leche bajo condiciones de refrigeración, es necesario mencionar especialmente a la microbiota psicrotófica, que será la realmente responsable del deterioro de la leche durante su conservación por refrigeración. La importancia de esta flora radica en su facultad de segregar, cuando se multiplican en la leche, lipasas y proteasas termorresistentes (Magariños, 2001), en particular por especies de *Pseudomonas*. La pasteurización de la leche para la fabricación de queso (72 °C, 15 - 17 segundos) reduce drásticamente la tasa de microorganismos presentes, pero estas enzimas pueden soportar el tratamiento térmico y producir sabores no característicos en los quesos (Robinson, 1987). Las lipasas pueden causar enranciamiento en queso Cheddar, en los holandeses, suizos y en el Camembert. Las proteasas pueden degradar la caseína de la leche cruda durante el almacenamiento, liberando péptidos que se pierden con el suero y que, por lo tanto, disminuyen el rendimiento en queso (Robinson, 1987).

1.7. Elaboración de quesos. Etapas del proceso

1.7.1. Preparación de la leche

La composición de la leche es función de múltiples factores tales como tipo y raza del animal, hora de ordeño, período de lactancia, temporada del año, alimentación, que determinan importantes variaciones en el contenido graso y proteico, y consecuentemente, en el producto final. El ajuste de estos componentes es una práctica común, destinada a satisfacer los contenidos mínimos requeridos por la legislación o la demanda del mercado.

Para que el contenido de grasa en el queso sea constante en el tiempo, es necesario "normalizar" la leche, es decir, que la composición de la misma debe ajustarse con respecto a su contenido de grasa mediante la adición de crema o la eliminación de parte de la grasa, adición de leche descremada o sólidos lácteos magros (leche en polvo descremada). Algunos tipos de quesos requieren una relación grasa/caseína más equilibrada, y los cremosos se fabrican con crema o leche con un elevado contenido en grasa (Robinson, 1987).

La *homogeneización* es un proceso que consiste en bombear la leche a presión. Rompe los glóbulos grasos dispersando la grasa en el seno líquido de la leche y aumentando la viscosidad. A bajas presiones el tratamiento puede resultar beneficioso para la fabricación de quesos cremosos, blandos o azules, para los que se necesitan cuajadas uniformes y suaves. La lipólisis es mayor en los quesos fabricados con leche homogeneizada, lo que acelera la formación del sabor y aroma en ciertos quesos azules. El proceso se realiza al pasteurizarse la leche (Robinson, 1987).

El tratamiento térmico reduce la carga microbiana, principalmente patógena y permite controlar el proceso de manufactura de quesos disminuyendo apreciablemente la aparición de defectos.

Sin embargo, el calentamiento de la leche puede, afectar la actividad de algunas enzimas como la plasmina que desempeña una función importante durante la maduración (Benfeldt y Sorensen, 2001), modificar su estructura físico-química (desnaturalización de proteínas del suero, transferencia de calcio y fosfato soluble a la fase coloidal, reacción de Maillard, alteraciones en la membrana del glóbulo graso) o rendir quesos con sabor menos acusado (Dalglish, 1993; Walstra, 1993; Keating y Gaona Rodríguez, 1999; Schreiber, 2001; Singh y Waungana, 2001). Estos efectos adversos del calentamiento pueden atenuarse en la coagulación enzimática (McMahon *et al.*, 1993; Banks *et al.*, 1995; Guinee *et al.*, 1996, Lucey *et al.*, 2001; Lucey, 2002), por manipulación del pH, adición de cloruro de calcio o uso de leche ultra filtrada.

1.7.2. Adición de cultivo iniciador

La elaboración de un queso depende de la fermentación de lactosa por la acción de bacterias lácticas (BAL), para producir principalmente ácido láctico. El objetivo primordial del agregado de fermentos durante la elaboración de quesos, es que las BAL constituyan la microbiota dominante, y mediante su producción de ácido láctico se favorezcan distintas rutas metabólicas cuyos compuestos resultantes inciden en el cuerpo y textura del queso.

El ácido láctico imparte el característico sabor ácido a la cuajada, ayuda a la formación del coágulo por el cuajo y, al favorecer la contracción de la cuajada y expulsión

del suero, contribuye a que el queso adquiera la textura típica. El bajo pH de la cuajada (5,0 - 5,2) colabora en la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas y de las responsables de deterioro. Las bacterias lácticas elaboran también, en concentración de trazas, sustancias muy aromáticas; además, sus actividades proteolítica y, en menor extensión, lipolítica, participan en los fenómenos bioquímicos que tienen lugar durante la maduración del queso (Robinson, 1987).

1.7.3. Formación de la cuajada

La coagulación físicamente se traduce en la floculación de las micelas de caseína (proteína de la leche) que se reagrupan para formar un gel compacto aprisionando el líquido de dispersión que constituye el suero. En la elaboración de quesos para lograr esta coagulación se recurre a la acidificación láctica y al cuajo.

La acidificación láctica se produce a través de la formación de ácido láctico proveniente de la transformación de la lactosa de la leche por las bacterias lácticas.

La renina, una enzima digestiva procedente del estómago de terneros, corderos y cabritos lactantes, se ha utilizado durante muchos siglos para la coagulación de la leche en el proceso de fabricación de quesos. Las fórmulas comerciales se denominan habitualmente con el nombre de cuajo y se obtienen mediante extracción de la enzima del abomaso o cuarto estómago de los rumiantes, lo que se consigue por maceración durante varios días en una solución de NaCl al 10 %. El cuajo líquido comercial contiene un 18-20 % de NaCl y una pequeña cantidad de benzoato sódico como conservante. El extracto contiene principalmente dos enzimas, renina y pepsina. La renina es probablemente la más activa para la coagulación de las caseínas durante la formación de la cuajada, pero ambas participan en la proteólisis durante la maduración del queso.

Ninguno de estos dos modos de floculación se emplea absolutamente aislado. En realidad, todas las cuajadas de quesería se obtienen por acción simultánea del cuajo y del ácido láctico. No obstante, siempre existe un predominio más o menos pronunciado de uno de los dos modos de floculación mencionados en función del cual se obtienen diferentes cuajadas: ácidas, enzimáticas y mixtas (Veisseyre, 1988).

- Cuajada ácida: es firme, friable, porosa y poco contráctil. Es difícil su deshidratación y la friabilidad se opone al trabajo mecánico intenso. La coagulación ácida está regulada por dos factores principales: la temperatura y el modo de acidificación.
- Cuajada enzimática: es flexible, elástica, compacta, impermeable y contráctil. Esta última propiedad permite realizar el desuerado por intervenciones mecánicas potentes que facilitan la contracción del coágulo y la salida del suero. La coagulación enzimática está regulada por múltiples factores: la dosis de cuajo, la temperatura, el pH de la leche, la concentración de iones Ca^{2+} , concentración de fosfato cálcico coloidal, la dimensión de las micelas de caseína y el contenido de proteínas solubles en la leche.
- Cuajada mixta: es el resultado de la acción conjunta de la acidificación ácida y el cuajo. Su obtención puede realizarse según dos técnicas: la adición de cuajo a una leche ácida o la acidificación de un gel enzimático.
 - Cuajado de una leche ácida: el coágulo obtenido presenta características intermedias entre los anteriores, menor flexibilidad y contractibilidad y mayor firmeza y friabilidad que la cuajada enzimática.
 - Acidificación de un coágulo enzimático: el coágulo enzimático sufre una acidificación por la fermentación láctica. La cuajada pierde firmeza, se vuelve menos elástica y menos contráctil.

1.7.4. Desuerado

En el fenómeno denominado desuerado, el líquido de dispersión que impregna el gel se separa más o menos rápidamente y la fase sólida resultante constituye la cuajada.

La sinéresis o contracción del coágulo, involucra la pérdida de suero a partir de las partículas de cuajada. No es simplemente un fenómeno físico, la red caseínica se reacomoda para formar una estructura más compacta, considerándose (Walstra, 1993; Green y Grandison, 1993; Mietton *et al.*, 1994) que la formación de la cuajada y la

sinéresis son dos aspectos del mismo proceso básico de agregación de caseína, respondiendo en forma similar a las condiciones del medio.

En las cuajadas lácticas, el desuerado es rápido y muchas veces espontáneo, y la contracción propiamente dicha es limitada, la eliminación del suero es difícil y conduce a una cuajada muy húmeda y poco desuerada.

En las cuajadas enzimáticas o mixtas, la eliminación del suero, solo puede conseguirse mediante acciones mecánicas o térmicas. Habitualmente el proceso se inicia con el corte del coágulo en piezas, para acelerar la expulsión del suero por aumento de la superficie de exudación, acompañado generalmente de agitación suave para impedir la re-agregación. En la elaboración de algunas variedades de quesos (Cheddar, Gruyère, Gouda, pasta hilada) se realiza un escaldado de los granos inmersos en su propio suero, para favorecer la retracción del coágulo y exudación serosa o con la incorporación de agua para eliminar la lactosa y otras sustancias solubles y modificar el pH del medio.

1.7.5. Moldeo

A fin de obtener el formato y tamaño típicos de cada queso, los granos de cuajada se colocan en moldes perforados adecuados, donde las partículas de cuajada se transforman en una masa compacta sin cavidades. La forma y dimensión del queso tiene influencia marcada en el producto final, pues de estos parámetros depende la relación superficie-volumen, que condiciona la velocidad e intensidad de la salazón (cuando se realiza sobre producto terminado) y la pérdida de humedad por evaporación (Keating y Gaona Rodríguez, 1999). Esta operación se acompaña de presión, que evacúa el suero de los granos y sus condiciones (fuerza y duración) son diferentes para cada tipo de queso.

1.7.6. Salado

El salado completa la expulsión del suero al favorecer el escurrimiento por modificación en los niveles de hidratación de las proteínas, imparte cualidades de sabor, provee mayor conservación al producto, inhibiendo o retrasando el desarrollo de microorganismos indeseables, y selecciona la biota benéfica.

La concentración de sal en los quesos varía desde 0,8 - 2,0 % hasta 5,0-8,0 % en los quesos salados tipo criollos. Puede realizarse mediante la adición de NaCl a la masa antes del moldeo y prensado, o por salado en superficie del producto terminado, mediante frotación con sal seca (generalmente se aplica en fases sucesivas durante varios días) o inmersión en salmueras (solución al 10 %), permitiendo obtener una corteza fina y flexible.

La cantidad de sal que difunde al queso tratado con salmuera o por salado de su superficie en seco depende de la concentración de la misma, del contenido de humedad del queso, de la duración y temperatura del tratamiento y de la relación entre la superficie y el volumen del queso. A partir de la concentración inicial en la superficie, la sal difunde gradualmente a través de la masa y su distribución final es bastante uniforme. Cuando la sal se espolvorea en la cuajada y luego se mezclan, ésta difunde rápidamente por toda la masa del queso. La sal se disuelve en la fase acuosa formando una débil salmuera, cuya concentración ayuda a controlar la maduración y conservación del producto (Robinson, 1987).

Las bacterias lácticas mesófilas tienen una tolerancia a la sal variable. La mayoría de las cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* se inhiben en presencia de un 2 % de sal, pero *L. lactis* subsp. *lactis* tolera hasta un 4 %. El crecimiento de las bacterias no deseables se inhibe por la concentración de sal, aunque *Escherichia coli* tolera casi un 12 % e incluso su crecimiento puede estimularse en presencia de concentraciones del 3 %. La acción inhibitoria de la sal sobre bacterias proteolíticas y lipolíticas no deseables, como las bacterias ácido-butíricas, es de especial importancia en ciertas variedades tales como los quesos Edam y Gouda, en los cuales se producen bajos niveles de ácido láctico durante la formación de la cuajada (Robinson, 1987).

1.7.7. Maduración

La maduración de quesos implica una serie de cambios químicos y biológicos, que producen el desarrollo progresivo del sabor y aroma al mismo tiempo que modifican su aspecto, textura y consistencia. La forma y grado en que ocurran estas variaciones serán responsables de las características físico-químicas y organolépticas del producto final.

En la etapa final de la elaboración la cuajada fresca es firme y, en ocasiones, elástica; consistente en una matriz de paracaseinato de calcio con diferentes proporciones de lípidos y agua, dependiendo del tipo de queso, así como de pequeñas cantidades de sal, lactosa, ácido láctico, proteínas de suero y minerales. En la misma están, también presentes distintos microorganismos.

La cuajada es un producto bioquímicamente dinámico, durante su afinado se producen cambios significativos que originan compuestos característicos para cada variedad de queso. La duración de este proceso es muy variada, desde unos días hasta uno o más años, dependiendo del tipo de queso y del contenido de humedad.

En este período se desarrollan las características diferenciales y únicas de cada tipo de queso, por ello el propio proceso de maduración es característico de cada variedad casearia.

En la transformación de la cuajada en queso intervienen factores intrínsecos, (composición bioquímica y propiedades físico-químicas del coágulo, enzimas de la leche y suero-fermento, y microorganismos de la materia prima, cultivo iniciador o contaminantes y sus enzimas) y extrínsecos (condiciones ambientales de temperatura, humedad y aireación), que condicionan la actividad de los agentes de maduración para obtener las características deseables de cada queso (García Garibay *et al.*, 1993; Mietton *et al.*, 1994; Hill, 1995).

El afinado es un proceso esencialmente enzimático, por lo tanto, los agentes de maduración son las distintas enzimas que participan en la compleja secuencia de reacciones involucradas en dicho proceso. Las mismas tienen diferentes modos de acción y pueden provenir de diferentes orígenes:

- Enzimas presentes en las materias primas
 - Enzimas nativas de la leche: proteasas y lipasas
 - Enzimas del cuajo: renina o quimosina, pepsina o proteinasas
- Enzimas provenientes de los microorganismos
 - Enzimas de las bacterias lácticas
 - Enzimas de cultivos secundarios o adjuntos: bacterias propiónicas, levaduras y mohos

- Enzimas de microorganismos contaminantes: bacterias lácticas que no provienen del fermento(NSLAB)

La maduración implica fundamentalmente el desarrollo deseable de los compuestos responsables del sabor y aroma característicos por la acción de estas enzimas que degradan las proteínas, grasas e hidratos de carbono y, en ciertos casos, metabolizan el ácido láctico y el citrato.

Los principales cambios bioquímicos que tienen lugar durante la maduración comprenden:

- El metabolismo de la lactosa por las bacterias lácticas del cultivo iniciador. El mismo se inicia durante la coagulación y desuerado y se prolonga en el queso duro (30 - 40 %) hasta los primeros días posteriores a su elaboración, cuando la mayoría de la lactosa desaparece; sin embargo este período puede ser mayor en el caso de quesos blandos, con mayor contenido en humedad (50 %). El principal producto obtenido es ácido láctico, produciéndose su acumulación en las etapas iniciales. Luego, su concentración disminuye como consecuencia de su metabolismo por distintas vías, dependiendo del tipo de queso, originando compuestos importantes en el ámbito sensorial. Además del ácido láctico, se pueden producir algunos ácidos volátiles, etanol y pequeñas cantidades de otros metabolitos.

La fermentación láctica juega un papel de importancia durante la maduración, dado que impide la proliferación de microorganismos putrefactivos y participa en el desarrollo del sabor.

- La proteólisis es el evento más complejo e importante para el desarrollo del sabor aroma que tiene lugar durante la maduración. Sin embargo, no solamente interviene en el desarrollo del sabor sino que también, contribuye a los cambios texturales en la matriz del queso (Hynes *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2001). La mayor parte del material nitrogenado del queso fresco está en forma de proteínas insolubles en agua, pero al avanzar la maduración, parte o todas ellas se hidrolizan por la acción de las enzimas liberando compuestos solubles más simples.

Debido a la variedad de agentes proteolíticos y a la multiplicidad de vías metabólicas, se produce una gran diversidad de compuestos resultantes que se acumulan

en la pasta durante la maduración (proteosas, péptidos, aminoácidos, aminas, amoníaco, sulfuro de hidrógeno, ácidos volátiles, aldehídos, cetonas) y que caracterizan organolépticamente a cada tipo de queso (Robinson, 1987).

Algunos quesos blandos, como el Camembert, Brie y Limburger, sufren una proteólisis intensa, y la formación de compuestos hidrosolubles, incluyendo péptidos, aminoácidos y amoníaco, junto con el alto contenido en humedad de estas variedades, son responsables del cuerpo blando «aterciopelado» y de la textura del queso maduro. Los quesos duros, por el contrario (es el caso del Cheddar y Emmental), sufren una proteólisis mucho más débil y sólo el 25 - 35 % de las proteínas se solubilizan; en un queso correctamente madurado una gran porción de los productos de degradación se encuentran en forma de péptidos y aminoácidos (Robinson, 1987).

La renina puede degradar la caseína a compuestos hidrosolubles (principalmente proteosas y peptonas), pero las enzimas microbianas ocasionan una transformación posterior, liberando aminoácidos e incluso amoníaco. En el queso duro, los microorganismos presentes son fundamentalmente cocos y bacilos formadores de ácido láctico dispersos en toda la masa, y producen sólo pequeñas cantidades de proteasas exocelulares. Sin embargo, cuando estas células mueren y se autolizan, se liberan enzimas endocelulares y la maduración progresa uniformemente en toda la masa casearia. En quesos blandos de maduración rápida, el proceso proteolítico se debe, en su mayoría, a proteasas exocelulares liberadas por diversos microorganismos que crecen sobre la superficie. Los mohos juegan un importante papel en la proteólisis de ciertos quesos, como es el caso de los quesos azules (Stilton) y los madurados por mohos en superficie, como Brie o Camembert (Robinson, 1987).

- La hidrólisis de la grasa en el queso no es intensa, pero se produce en cierto grado durante la maduración, y los principales productos generados son ácidos grasos volátiles de cadena corta, incluyendo butírico, caproico, caprílico y cáprico. Los sistemas enzimáticos responsables de la misma, actúan siguiendo tres vías metabólicas principales. La lipólisis propiamente dicha que ocurre en grados variables, pero generalmente en forma limitada, responsable de sabores particulares en quesos Camembert, Blue, Emmental, Parmesano y Provolone (Veisseyre, 1988; Molimard y Spinnler, 1996), la

degradación oxidativa de los ácidos grasos (produciendo metilcetonas, alcoholes, lactonas y ésteres característicos a partir de ácidos β -cetónicos) y la re-esterificación de ácidos grasos libres (mediante esterasas sintetizadas por levaduras, micrococos y ciertas bacterias psicrófilas) o por lentas reacciones químicas que tienen lugar durante almacenamientos prolongados (Law, 1984).

Las enzimas lipolíticas presentes en el queso pueden proceder de la leche, de los microorganismos o de las preparaciones enzimáticas agregadas a la leche (por ejemplo, los coagulantes de origen bacteriano o fúngico). La lipasa de la leche sólo es activa en el queso elaborado con leche cruda. Ciertas cepas de lactobacilos y posiblemente de otros microorganismos liberan, por autólisis, lipasas intracelulares y se las considera responsables de gran parte de la actividad lipolítica en el queso duro (Cheddar y Emmental). Los mohos que crecen en la superficie (Camembert) o en el interior de ciertos tipos de quesos (Stilton), constituyen otra fuente de enzimas lipolíticas (Robinson, 1987).

La lipólisis es indeseable en la mayoría de las variedades de quesos de sabor suave tales como Cheddar, Gouda o quesos suizos, en donde altas concentraciones de ácidos grasos libres podrían provocar rancidez. Pero en los quesos madurados por mohos, los adicionados con lipasas, como ciertos quesos duros italianos y en quesos de cabra ocurre una lipólisis pronunciada, siendo esta reacción muy importante para el desarrollo de sabor-aroma sin ocasionar modificaciones notables en la textura. La lipólisis, a diferencia de la proteólisis, prosigue aún en los quesos fuertemente salados dado que la sal no inhibe a las lipasas (Fox *et al.*, 1993; Menéndez *et al.*, 1999; Mc Sweeney y Sousa, 2000).

1.8. Fermento o cultivo iniciador

Los “starters”, fermentos o cultivos iniciadores lácticos, son mezclas cuidadosamente seleccionadas de microorganismos, que se agregan durante diferentes procesos fermentativos para constituir la microbiota dominante y llevar a cabo las transformaciones deseadas, garantizando una estandarización rigurosa del producto.

En la manufactura de quesos, la función principal de los fermentos lácticos, es la formación de ácido láctico a partir de la lactosa. Este proceso origina cambios en las caseínas que en condiciones acídicas, coagulan. La disminución del pH contribuye a la

preservación al inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos y responsables de la alteración. Otras características adicionales e importantes de las bacterias lácticas son su capacidad de sintetizar sustancias muy aromáticas en concentración de trazas, su actividad proteolítica y, en menor extensión, lipolítica, a través de las cuales participan en los fenómenos bioquímicos que acaecen durante la maduración del queso, determinando las características organolépticas y reológicas del producto final.

Beresford *et al.* (2001), en un sentido estricto, definieron al fermento láctico como, los aislados microbianos que producen ácido láctico en cantidad suficiente para reducir el pH de la leche por debajo de 5,3 en 6 h a 30 - 37 °C. Sin embargo, sobre 4.379 bacterias aisladas a partir de 35 productos lácteos artesanales europeos, Cogan *et al.* (1997) informaron que, sólo el 8 % de los lactococos mesófilos y el 2 % de los lactobacilos mesófilos cumplían con esta definición.

De acuerdo con su constitución, los cultivos iniciadores para tecnología quesera se clasifican (Kunz, 1986; Mäyra-Mäkinen y Bigret, 1998) en simples o individuales (rara vez utilizados, a fin de salvaguardar el fermento del ataque fágico o intolerancia a la sal), múltiples definidos (constituidos por diversas cepas conocidas de una misma especie), mezclas múltiples definidas (constituidos por diferentes cepas definidas de varias especies) y mezclas múltiples indefinidas (constituidos por diferentes cepas o especies total o parcialmente desconocidas, que generalmente derivan de una práctica artesanal).

Es esencial disponer de un cultivo iniciador satisfactorio, capaz de producir la suficiente cantidad de ácido a la velocidad deseada en cada variedad de queso. De esta forma se evitan sabores y aromas no característicos, y la cuajada adquiere las características adecuadas para el desarrollo del sabor típico de cada variedad casearia (Robinson, 1987).

1.9. Efectos positivos y negativos de levaduras en productos lácteos

Tradicionalmente, y también desde el punto de vista económico, las levaduras constituyen el grupo de microorganismos más importante utilizado por el hombre. El empleo de levaduras ha ido expandiéndose a través de la historia, desde su uso ancestral para la elaboración de productos alimenticios típicos como el pan, la cerveza, el vino y

otras bebidas alcohólicas hasta la obtención en la actualidad de otros productos como etanol usado como combustible, extracto de levaduras, pigmentos, probióticos e incluso metabolitos para la industria farmacéutica.

Sin embargo, las levaduras pueden jugar un rol como microorganismos nocivos en alimentos y bebidas. Este aspecto negativo está relacionado con las características fisiológicas de levaduras, incluida su habilidad para multiplicarse a bajas temperaturas, su actividad metabólica y su resistencia al estrés físico-químico causado por los procedimientos de preservación de alimentos (Jacobsen y Narvhus, 1996).

Este rol dual se aprecia claramente en los productos lácteos. El papel de las levaduras como microorganismos perjudiciales en estos productos está relacionado con sus requerimientos nutricionales, actividad de ciertas enzimas, su habilidad para crecer a bajas temperaturas, bajos valores de pH, baja actividad de agua (a_w) y altas concentraciones de sal (Jacobsen y Narvhus, 1996). El daño en los productos lácteos, debido generalmente al crecimiento excesivo de levaduras, incluye sabores frutales, a "levadura" y otros sabores desagradables, gasificación, formación de limo, decoloración o generación de pigmentos indeseados y cambios de la textura (Viljoen y Greyling, 1995; Jacobsen y Narvhus, 1996). El problema es mayor cuando los productos son suplementados con frutas, miel, azúcar o frutas secas, los cuales pueden ser fuente de contaminación además de proveer nutrientes no sólo para el crecimiento de levaduras sino también para propiciar la fermentación.

Una gran variedad de géneros y especies de levaduras han sido aislados de leche y productos lácteos como contaminantes.

Distintas especies de los géneros *Cryptococcus*, *Candida* y *Rhodotorula* suelen ser aislamientos comunes a partir de leches crudas junto con otros representantes típicos como *Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon beigelli* y *Yarrowia lipolytica* (Viljoen y Greyling, 1995; Jacobsen y Narvhus, 1996). En un trabajo realizado (Corbo *et al.*, 2001) en leche proveniente de distintos animales: vaca, oveja, cabra y búfala de la región de Apulia (Italia) se aislaron y caracterizaron cepas de levaduras correspondientes a 36 especies, las más frecuentes fueron *Trichosporon cutaneum*, *Candida catenulata*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sake* y *Candida zeylanoides*. La leche con mayor contaminación fue la de oveja

con predominio de las especies *Y. lipolytica* y *T. cutaneum*, mientras que en la de cabra predominaron *C. catenulata* y *T. cutaneum*.

Levaduras del género *Rhodotorula* se aíslan usualmente a partir de productos lácteos grasos, como manteca y crema de leche, pero también se las puede encontrar en leche cruda y quesos. Estas levaduras están asociadas frecuentemente al daño en productos lácteos dado que forman manchas rosa sobre la superficie de la crema, manteca y queso. Estas especies son típicas levaduras tolerantes al frío, capaces de crecer a temperaturas inferiores a 0 °C y a valores de pH menores a 2,4. Además, se las describe normalmente como contaminantes aéreos, presentes en la superficie de equipos de plantas procesadoras (Viljoen y Greyling, 1995; Jacobsen y Narvhus, 1996).

En yogurt, se ha aislado como contaminantes frecuentes distintas especies pertenecientes al género *Candida*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Debaryomyces hansenii* (Jacobsen y Narvhus, 1996).

En crema y manteca, además de especies de *Rhodotorula*, también se encontraron cepas de levaduras pertenecientes a los géneros *Cryptococcus* y *Candida* junto con las especies *Trichosporum beigeli* y *Yarrowia lipolytica*, esta última con reconocida actividad enzimática (Viljoen y Greyling, 1995; Guerzoni *et al.*, 1998).

Las especies con alta tolerancia a la sal han sido aisladas de las salmueras para quesos (Seiler y Busse, 1990; van de Tempel y Jacobsen, 1998) con recuentos entre 10^4 - 10^6 UFC.ml⁻¹. Las especies halladas mayoritariamente en las salmueras para quesos Limburger, Romadour, Camembert, Tilsiter y Emmental del sur de Bavaria (Alemania), fueron *Debaryomyces hansenii*, seguido por *Trichosporum beigeli*, distintas especies de *Candida* spp., *Issatchenkia orientalis* y *Saccharomyces* spp. (Seiler y Busse, 1990). En cambio, en salmueras para queso Danablu (van de Tempel y Jacobsen, 1998), la composición de la flora levaduriforme fue diferente con predominio de la especie de *Candida famata* seguida de *Candida lipolytica*, *Candida catenulata*, *Trichosporum cutaneum*, *Zygosaccharomyces* spp. y *Cryptococcus laurentii*.

Por otro lado, la presencia de levaduras en productos lácteos, no son sólo causa de daño o deterioro en el producto, sino que también pueden ocasionar cambios bioquímicos deseables en los mismos.

Interacciones microbianas que involucren a las levaduras han sido registradas muchas variedades de quesos (Jacobsen y Narvhus, 1996), como los azules: Danablu (van de Tempel y Jacobsen, 1998), Roquefort (Besançon *et al.*, 1992), quesos blandos madurados con mohos superficiales como Camembert, (Seiler y Busse, 1990; Robinson, 1987), Brie (Viljoen *et al.*, 2003), quesos madurados por bacterias superficiales (Valdés-Stauber *et al.*, 1997): como Limburger, Port Salut, Taleggio (Rossi *et al.*, 1998) entre otros.

Sin embargo, entre los numerosos grupos microbianos que participan en la maduración de los diversos tipos de quesos, las levaduras son las menos estudiadas, ya que prácticamente toda la atención ha sido dirigida hacia las bacterias lácticas.

No obstante, se han realizado numerosas investigaciones conducentes a revertir esta situación, sobre todo en distintas variedades de quesos europeos. Las mismas se iniciaron en Francia e Italia, pero actualmente se cuenta con información procedente de los países de Sudáfrica, Australia, Dinamarca, Grecia, Polonia y Portugal. Los resultados de las mismas, permitieron establecer que las levaduras contribuyen al desarrollo de las características sávido-aromáticas y texturales durante la maduración.

1.10. Levaduras en quesos

Inicialmente, la contribución de las levaduras al sabor y aroma de los quesos se podría atribuir directamente a la capacidad de ciertas cepas para fermentar y asimilar lactosa con la consecuente producción de etanol, acetaldehído, etilacetato y etilbutirato. Sin embargo, el exceso de levaduras fermentadoras de lactosa puede producir sabor frutado en quesos, causado por altos niveles de estos compuestos (Viljoen y Greyling, 1995).

Las levaduras con actividad proteolítica o lipolítica podrían participar indirectamente en la formación de precursores del aroma, como aminoácidos, ácidos grasos y ésteres.

El efecto positivo de las levaduras en la formación del aroma y la maduración de ciertas variedades de quesos, especialmente los semiblandos madurados por bacterias (ej. Limburger, Taleggio) o mohos superficiales (Camembert, Brie) fue sugerido en las primeras investigaciones acerca del papel de las levaduras en quesos (Anderson y Day,

1966; Schmidt y Lenoir, 1978, 1980a, b; Schmidt *et al.*, 1979; Schmidt y Daudin, 1983; Rousseau, 1984; Siewert, 1986; Baroiller y Schmidt, 1990; Gripon, 1993).

De acuerdo a Sauter (1986) el desarrollo de la flora superficial en los quesos de “manchas rojas” depende enteramente del metabolismo del ácido láctico por levaduras, debido a que la microflora bacteriana tolerante a la sal, principalmente *Brevibacterium* spp., *Micrococcus* spp. y *Arthobacter* spp., no resiste bajos valores de pH. En el inicio de la maduración las levaduras metabolizan el ácido láctico producido por las bacterias lácticas, consecuentemente el pH de la superficie alcanza valores de 7 a 7,4. Además la producción de factores de crecimiento por parte de las levaduras aparentemente promueve el desarrollo de la flora bacteriana aerobia en la superficie (Valdés-Stauber *et al.*, 1997). Por ello, el recuento de bacterias aerobias en la misma no supera al recuento de levaduras hasta el sexto o noveno día, cuando la acidez ha sido suficientemente reducida por la biota levaduriforme (Seiler y Busse, 1990).

En particular en queso Camembert se encontró un número muy alto de levaduras constituyendo la flora superficial, mucho más importante que la biota del interior de los quesos (Jacobsen y Narvhus, 1996). Se estima que las levaduras, además de favorecer el crecimiento de las bacterias aerobias, son necesarias para ablandar inicialmente el queso y contribuir al sabor-aroma, dado que se ha comprobado que las esporas de *Penicillium camemberti* no crecen bien al pH y concentración de sal existentes en la superficie del queso fresco (Robinson, 1987). Los cinco géneros y especies predominantes informados fueron: *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, *Debaromyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zygochacaromyces rouxii* (Jacobsen y Narvhus, 1996).

Estudios realizados en queso Taleggio (Rossi *et al.*, 1998), elaborado en el valle Taleggio de Lombardía, hallaron también un substancial aumento en la población de levaduras en superficie a partir de los 21 días de maduración, con incrementos de 2 ciclos logarítmicos, alcanzando valores finales de 7,20 log UFC.g⁻¹. Los géneros de levaduras más frecuentemente aislados fueron: *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* y *Hansenula*. En estos quesos se encontró, que la degradación de proteínas en la cuajada no es

significativa antes de los 21 a 35 días de maduración, se cree que esta circunstancia está relacionada al rol que jugaría la flora superficial del queso (incluidos mohos y levaduras) dado que su crecimiento coincide con el incremento de la actividad proteolítica. Además, a partir de ese momento se hace más evidente el incremento del pH en la superficie debido a la asimilación del ácido láctico por parte de las levaduras. El pH influenciaría la actividad de las enzimas proteolíticas, bajos valores de pH pueden ser responsables de su baja actividad y desnaturalización de las mismas.

Un rol similar fue propuesto en quesos de vena azul, aunque la población de levaduras en el interior de algunas variedades de estos quesos fue más numerosa que la observada en los quesos madurados con mohos superficiales. Además, la composición de la flora de la superficie y el interior de los quesos azules presentaron algunas diferencias entre sí (Jacobsen y Narvhus, 1996).

Besançon *et al.* (1992) estudiaron la población superficial de levaduras en queso Roquefort en dos plantas elaboradoras, el número de levaduras varió entre 10^7 y 10^9 UFC.g⁻¹ de queso antes del salado y entre 10^4 y 10^6 UFC.g⁻¹ después del mismo. La flora levaduriforme se incrementó durante la primera fase de maduración, llamada fase aerobia, pudiéndose registrar recuentos del orden de 10^9 UFC.g⁻¹. Los principales géneros y especies aisladas fueron: *Debaryomyces hansenii* y su estado anamorfo *Candida famata*, *Kluyveromyces lactis* y su estado anamorfo *Candida esphaerica* y otra especie de *Candida*. *Debaryomyces hansenii*, inoculada en la superficie del queso antes del salado en una de las plantas elaboradoras, fue la especie más abundante durante el período de maduración pero nunca superó el 50 % del total de los aislamientos. La flora de levaduras presentó una alta resistencia al NaCl y el 80 % de los aislamientos de cada especie toleró concentraciones de sal de 15 % (p/v). En adición, la mayor parte de las especies fueron capaces de asimilar lactosa y ácido láctico. Se aislaron muy pocas cepas con actividad proteolítica, sólo 10 aislamientos de los 401 estudiados hidrolizaron gelatina. Sin embargo, la mayoría de las especies identificadas incluyeron cepas con actividad lipolítica: entre 50 y 90 % de los aislamientos de cada especie fueron capaces de hidrolizar tributirina. Los ácidos grasos liberados por acción de las lipasas de levaduras desempeñan

un rol importante en el desarrollo del aroma y la formación de la “morgue” (biofilm superficial constituido por células microbianas que recubre al queso), contribuyendo a la maduración. Finalmente, muchos de los aislamientos fueron capaces de asimilar diferentes aminas biógenas: cadaverina, histamina, putrescina y tiramina, por lo cual la biota levaduriforme cumpliría otra función importante al eliminar las aminas biológicamente activas de estos quesos.

En otro queso azul, el Danablu (van de Tempel y Jacobsen, 1998), elaborado a partir de leche de vaca tratada térmicamente, no se encontraron diferencias significativas entre los recuentos de levaduras en el interior y la superficie del queso. Después de 21 días de realizado el salado, la población de levaduras registró un máximo de $5 \cdot 10^4$ UFC.g⁻¹ y $1 \cdot 10^4$ UFC.g⁻¹ sobre la superficie y en el interior, respectivamente. Las especies predominantes fueron *Candida famata*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida catenulata*, *Trichosporum cutaneum* y *Zygosaccharomyces* spp. Todos los aislamientos seleccionados para evaluar la actividad hidrolítica sobre 0,1 % de tributirina fueron lipolíticos, *Y. lipolytica* fue la especie que presentó mayor actividad. Sobre las mismas cepas se evaluó la actividad proteolítica, pero ninguna evidenció actividad positiva sobre agar caseína. Además los aislamientos asimilaron los compuestos importantes para la elaboración casearia, como lactato, lactosa y citrato; y presentaron características tecnológicas que les permitirían crecer en las condiciones ambientales (pH, NaCl y a_w) que prevalecen en el queso Danablu.

El queso Rokpol es también un típico queso de vena azul, producido mayoritariamente con leche de vaca. La calidad de este queso se ve influenciada, entre otros factores, por el desarrollo de la microflora no constituyente del cultivo iniciador, incluidas las levaduras. Trabajos publicados sobre este tipo de queso (Wojtatowicz *et al.*, 2001) elaborado en Polonia informaron recuentos poblacionales de levaduras entre 10^5 y 10^9 UFC.g⁻¹, mayores a 10^7 UFC.g⁻¹ en la superficie y una o dos unidades logarítmica menores en el interior. Los géneros y especies más frecuentes fueron *Candida famata* y *Candida esphaerica*, seguidas por *Candida intermedia* y *Geotrichum* spp. Cuando se evaluó la actividad hidrolítica de 39 cepas de *C. famata*, todas las cepas presentaron

actividad lipolítica extra e intracelular sobre tributirina mientras que la actividad proteolítica fue muy baja (90% de las cepas).

Se han realizado también numerosos estudios en materias primas, quesos a distintos períodos de maduración y en el ambiente de las plantas elaboradoras de quesos Cheddar y Gouda en Cape Province, Sudáfrica. Inicialmente se investigaron las fuentes de contaminación de levaduras (Viljoen y Greyling, 1995), hallándose que la principal responsable era la salmuera empleada, con recuentos de 10^4 UFC.ml⁻¹. Se aislaron 90 especies diferentes pertenecientes a los géneros *Candida*, *Yarrowia*, *Torulaspota*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporum*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia* y *Debaryomyces*. Siendo las especies más frecuentes: *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus albidus* y *Trichosporum beigeli*.

Luego se caracterizó la flora de levaduras y se determinaron las variaciones poblacionales durante la elaboración y la maduración de los quesos Gouda y Cheddar (Welthagen y Viljoen, 1998, 1999), encontrándose recuentos que alcanzaron en algunos casos valores superiores a 10^7 UFC.g⁻¹ con un crecimiento continuo de la población levaduriforme hasta los estadíos finales de la maduración. Las especies predominantes en queso Cheddar fueron *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus albidus* y *Yarrowia lipolytica*; también en queso Gouda se observó un predominio de *Debaryomyces hansenii* y además se aislaron otras especies: *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus albidus* y *Candida catenulata*. Las características de las cepas de levaduras sugieren que la ocurrencia de las mismas en estos quesos es debida a su habilidad para crecer a bajas temperaturas, asimilar/fermentar lactosa, asimilar ácidos orgánicos: como succínico, láctico y cítrico, desarrollar sus actividades proteolítica y lipolítica, y resistir a altas concentraciones de sal (Jacobsen y Narvhus, 1996). Además las levaduras toleraron valores bajos de pH y a_w (Wyder y Puhán, 1999).

Posteriormente, se emplearon cepas de *Debaryomyces hansenii* y *Yarrowia lipolytica*, en forma conjuntas y aisladas, como adjuntos al cultivo iniciador en la elaboración de quesos Cheddar a escala de planta piloto (Ferreira y Viljoen, 2003). Cuando las especies fueron empleadas conjuntamente contribuyeron a acelerar el

desarrollo de un intenso sabor-aroma. Los quesos después de 9 meses presentaron un gusto agradable, ligeramente dulce y mantuvieron la intensidad de las características sapido-aromáticas, mientras los quesos madurados sin levaduras desarrollaron un sabor ligeramente amargo.

Finalmente, se estudiaron los cambios químicos producidos durante la maduración y su posible contribución al sabor-aroma del queso cuando ambas especies de levaduras, *Debaryomyces hansenii* y *Yarrowia lipolytica*, eran adicionadas al queso Cheddar (Wit *et al.*, 2005) hallándose importantes diferencias en los metabolitos finales de lipólisis y proteólisis. Con una elevada cantidad de ácidos grasos libres, especialmente ácidos propiónico, n-butírico, mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico y oleico. La proteólisis también generó diferentes péptidos y aminoácidos libres en gran cantidad, de los cuales glicina y tirosina podrían contribuir al sabor- aroma, mientras los restantes podrían clasificarse como sensorialmente neutros. Los investigadores concluyeron que las especies de levaduras *Debaryomyces hansenii* y *Yarrowia lipolytica* podrían ser usadas como adjuntos en el queso Cheddar para resaltar el sabor – aroma o para acelerar su maduración.

En quesos tradicionales de la región Mediterránea de Europa elaborados con leche cruda de oveja, cabra, vaca o búfala también se hallaron poblaciones significativas de levaduras (Lopez-Díaz *et al.*, 1995; Rossi *et al.*, 1998; Suzzi *et al.*, 1998; Romano *et al.*, 2001).

Particularmente, en quesos Mozzarella elaborados con leche de búfala de la región de Basilicata al sur de Italia, se registraron (Suzzi *et al.*, 1998; Romano *et al.*, 2001) recuentos entre 10^5 y 10^6 UFC.g⁻¹. Muchos de los aislamientos correspondieron a especies de levaduras fermentadoras de lactosa o galactosa: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y su estado anamorfo *Candida esphaerica*, *Kluyveromyces marxianus* y *Candida kéfir*. Las levaduras fueron capaces de producir metabolitos, como etanol, etilacetato, acetaldehído, que contribuyen al desarrollo de las características organolépticas del queso Mozzarella. Además la presencia de levaduras fermentadoras de lactosa y galactosa es importante para la degradación de los azúcares residuales en la

cuajada que el cultivo láctico no es capaz de asimilar. Esta característica se corresponde con un aspecto comercial muy importante en este tipo de queso debido a que en la Mozzarella, cocida a altas temperaturas durante la elaboración de pizza se genera pardeamiento por reacciones inducidas por calor entre los azúcares residuales y las proteínas del queso. Por lo tanto, las levaduras a través de la síntesis de compuestos del aroma y la fermentación de galactosa y lactosa pueden desempeñar un rol importante para el desarrollo de características funcionales y organolépticas deseables en el queso Mozzarella.

También fueron realizados numerosos estudios sobre la ocurrencia de levaduras en queso Feta. Este constituye el queso tradicional más popular de Grecia, un queso blanco blando, elaborado generalmente con leche cruda de oveja en pequeña escala y leche pasteurizada cuando se manufactura en gran escala, aunque asimismo puede emplearse una mezcla de leche de oveja y cabra o también, de vaca. Los quesos luego de ser salados en seco hasta alcanzar una concentración de sal de 3 a 4 %v (p/v), son envasados en envases metálicos y cubiertos con salmuera al 6 – 8 NaCl % (p/v), en estas condiciones los quesos son madurados durante 10 - 15 días a temperaturas de 14 – 16 °C (Fadda *et al.*, 2004). Durante este período se forma una fina cubierta superficial constituida por diferentes microorganismos, esenciales para la maduración del queso y el desarrollo de sus características organolépticas (Tzanetakis *et al.*, 1998). Posteriormente, los quesos continúan su maduración a una temperatura de 4 °C durante al menos 2 meses. Las levaduras constituyen una fracción importante de la biota superficial de este queso, sobre todo durante los primeros 20 días de maduración (Tzanetakis *et al.*, 1998).

En la superficie de quesos Feta elaborados con leche cruda de oveja se han hallado valores desde 6,7 hasta 8,5 log UFC.g⁻¹ a los cuatro días de maduración (Tzanetakis *et al.*, 1998), que disminuyeron entre 1,2 y 1,5 a los veinte días, y se mantuvieron constantes hasta finalizar la maduración. Las especies dominantes encontradas fueron *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii* y *Pichia farinosa*. La mayoría de los aislamientos desarrollaron a concentraciones de 7,5 y 10 % (p/v) NaCl. La actividad proteolítica en agar leche sólo pudo ser detectada en una cepa de *Pichia farinosa*,

mientras que a través del empleo del ensayo API-ZYM se encontraron cepas entre las especies predominantes con actividad peptidasa, esterasa y lipasa.

En el queso Feta Danish, elaborado con leche de vaca pasteurizada, se hallaron recuentos de levaduras desde 10^4 hasta 10^6 UFC.g⁻¹ (Westall y Fitenborg, 1998). Las especies más frecuentes fueron *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspota delbrueckii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida butyri* y *Candida sake*. Dado que esta variedad de quesos Feta es elaborada con leche pasteurizada, la presencia de levaduras en ellos debería originarse por re contaminación con las especies de levaduras presentes en alto número en las áreas de producción de la planta elaboradora. Recuentos elevados de especies fermentadoras, como *Torulaspota delbrueckii*, fueron causa de hinchazón de los recipientes, mientras que elevados recuentos de *Y. lipolytica* produjeron una textura indeseada debido a una excesiva degradación de la materia grasa.

Estudios más recientes en queso Feta elaborados en la región de Cerdeña, Italia a partir de leche pasteurizada de oveja (Cosentino *et al.*, 2001; Fadda *et al.*, 2001) encontraron recuentos de levaduras que variaron entre 10^2 y 10^8 UFC.g⁻¹. La especie presente en mayor número fue *Debaryomyces hansenii*, seguida por *Dekkera anomala*, *Kluyveromyces lactis* y *Geotrichum candidum*. La composición de la biota levaduriforme tanto en muestras de quesos Feta de buena calidad como en quesos defectuosos con la superficie cubierta de film, fueron muy similares, ninguno de los aislamientos pudo asociarse con la formación de films. Sin embargo, se pudo establecer una correlación entre altos recuentos de *Dekkera anomala* y la hinchazón de los recipientes. La mayoría de las especies asimilaron ácido láctico y toleraron bajas temperaturas, mientras que sólo algunas (*D. anomala*, *K. lactis*) presentaron actividad proteolítica y fueron capaces de crecer a concentraciones de NaCl del 10 % (p/v).

Asimismo, se ha evaluado el efecto de *Debaryomyces hansenii* y *Yarrowia lipolytica*, como adjuntos asociados a *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* en quesos Feta elaborados a partir de leche de vaca, sobre el desarrollo de compuestos del aroma (Bintsis y Robinson, 2004). Los autores informaron que la adición de cepas seleccionadas de lactobacilos y

levaduras dio como resultado un modelo rico en compuestos volátiles, en particular alcoholes, aldehídos y ésteres. Las más altas concentraciones de compuestos del aroma se detectaron en los quesos elaborados con *Lb. subsp. paracasei* y *D. hansenii* como adjuntos. Por otro lado, el empleo de *Y. lipolytica* originó compuestos del aroma desagradables que no son parte del perfil de compuestos volátiles en quesos Feta de alta calidad.

También se ha estudiado la flora de levaduras durante la elaboración y maduración de otras variedades de quesos procedentes de la región de Cerdeña, Italia (Cosentino *et al.*, 2001): queso Cacciota y queso Ricotta, ambos elaborados con leche pasteurizada.

En queso Cacciota de 20 días de maduración se hallaron recuentos entre 10^2 y 10^6 UFC.g⁻¹ con predominio de las especies *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens*, *Yarrowia lipolytica* y *Dekkera anómala*. Igualmente, en Ricotta se obtuvieron recuentos entre 10^2 y 10^6 UFC.g⁻¹ y también, la especie predominantemente detectada fue *Debaryomyces hansenii*, le siguieron, en orden decreciente de importancia, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia fermentans*; y otras especies como *Candida catenulata*, *Geotrichum candidum*, *Pichia membranaefaciens* y *Rhodotorula rubra*. Como ambos quesos fueron elaborados con leche pasteurizada, la fuente original de levaduras fue el ambiente del establecimiento elaborador (aire, equipos, operarios). La mayoría de las especies fermentaron glucosa, pero muy pocas fermentaron o asimilaron lactosa, sin embargo, la mayoría de ellas fue capaz de asimilar lactato. En general, muy pocas cepas presentaron actividad hidrolítica sobre caseína y gelatina, mientras que la mayor parte evidenció actividad lipolítica. Las especies *C. catenulata*, *D. hansenii*, *G. candidum* y *Y. lipolytica* fueron las más fuertemente lipolíticas. Sólo algunas cepas toleraron temperaturas inferiores a 6 °C, pero la mayoría creció a 10 °C. Muy pocas especies desarrollaron en presencia de concentraciones de 6 % (p/v) NaCl, pero *D. hansenii* y *K. lactis* no fueron inhibidas por concentraciones de 10 % (p/v) de sal.

El queso Peccorino Crotonese es un queso tradicional de la región de Calabria, al sur de Italia, elaborado con leche de oveja y madurado, al menos, durante dos meses. La microflora secundaria al cultivo láctico, principalmente constituida por enterococos,

micrococcos, NSLAB y levaduras, participa de la maduración. La población de levaduras (Gardini *et al.*, 2006) durante la elaboración del queso, presentó recuentos bajos en leche (10 UFC.ml^{-1}) mientras que en la cuajada ese valor se incrementó a 10^3 UFC.g^{-1} , debido, probablemente, a la contaminación ambiental, posteriormente, durante el salado, se observó un segundo incremento alcanzando valores de 10^5 UFC.g^{-1} que se mantuvieron durante todo el período de maduración. Mientras la especie *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae* fueron aisladas mayoritariamente durante los primeros estadios de la maduración, *Yarrowia lipolytica* y *Debaryomyces hansenii* prevalecieron en los estadios finales. Estas dos últimas especies presentaron buena tolerancia a elevadas concentraciones de cloruro de sodio, incluso *D. hansenii* conservó su habilidad para asimilar lactosa y galactosa aún frente a concentraciones de sal de 10 % (p/v) y *Y. lipolytica* para asimilar citrato y lactato a concentraciones de NaCl iguales a 7,5 % (p/v). Los aislamientos de ésta última presentaron además intensa actividad proteolítica y lipolítica. Cosentino *et al.* (2001) habían informado previamente, en queso Peccorino de la región de Cerdeña, recuentos entre 10^1 y 10^6 UFC.g^{-1} con predominio también de la especie *Debaryomyces hansenii*, seguido por *Kluyveromyces marxianus* y *Geotrichum candidum*, pero ningún representante de *Yarrowia lipolytica* fue aislado por ellos.

En queso Fiore Sardo (Fadda *et al.*, 2004), un queso artesanal de tipo duro, elaborado con leche de oveja y madurado durante un período entre 3 y 9 meses, se observaron recuentos iniciales de levaduras de $2,62 \log \text{ UFC.ml}^{-1}$ en leche, los mismos se incrementaron alrededor de una unidad logarítmica durante las primeras 48 h para luego disminuir, paulatinamente, hasta alcanzar valores de $0,65 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ hacia el final de la maduración. Las especies predominantes *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Geotrichum candidum*, *Candida zeylanoides* y *Candida lambica* fueron seleccionadas para evaluar sus propiedades tecnológicas de interés para la elaboración casearia. Todas las cepas de *D. hansenii* fermentaron glucosa y asimilaron lactato, y solamente algunas presentaron actividad lipolítica y proteolítica. Todos los aislamientos correspondientes a *Kluyveromyces lactis*, asimilaron y fermentaron lactosa, asimilaron lactato y degradaron caseína. Los representantes de *G. candidum* también metabolizaron lactato y algunos presentaron actividad proteolítica y lipolítica. *C. lambica* fermentó glucosa y asimiló

lactato; y *C. zeylanoides* tuvo actividad lipolítica. Los resultados evidenciaron que las cepas de levaduras autóctonas podrían contribuir al desarrollo del sabor y el aroma típico de este queso.

El queso Manteca es un producto tradicional en algunas regiones del sur de Italia, es un queso de pasta hilada elaborado con leche de vaca y relleno con manteca amarilla y cremosa, de sabor suave y dulce. Adquiere sus particularidades organolépticas después de 6 a 8 meses de maduración. Las levaduras también se encuentran naturalmente (Suzzi *et al.*, 2003) en él. Durante los primeros estadios de la maduración la población levaduriforme alcanza valores de 10^3 UFC.g⁻¹, al mes logran un máximo igual a 10^5 UFC.g⁻¹, luego este valor disminuye llegando a su mínimo a los 5 meses, con recuentos de 10^2 UFC.g⁻¹ en la manteca y 10^5 UFC.g⁻¹ en la pasta hilada. Las especies más frecuentes fueron *Trichosporum asahii*, *Candida parapsilopsis*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Candida inconspicua*. Algunas de estas especies presentaron actividad lipolítica y proteolítica, tolerancia a concentraciones de NaCl superiores a 10 % (p/v) y a temperaturas mayores a 45 °C.

Quesos artesanales semiduros elaborados en el sur de Portugal (Pereira-Dias *et al.*, 2000), a partir de leche cruda de oveja sin la adición de cultivo iniciador, presentaron una flora levaduriforme significativa. Aunque la biota principal estuvo constituida por bacterias lácticas, la población de levaduras presentó recuentos de 2,7 a 6,4 log UFC.g⁻¹ alcanzando los valores máximos a los 30 días de maduración. Las especies de levaduras más frecuentes en estos quesos fueron *Debaryomyces hansenii*, *Candida catenulata* y *Candida zeylanoides*, su ocurrencia aumentó con el tiempo de maduración. Otros géneros y especies (*Candida curvata* y *Rhodotorula* spp.) fueron aislados sólo de la cuajada. La actividad esterasa fue común en casi todos los aislamientos (98 %) mientras que muy pocas cepas presentaron actividad proteolítica (12 %). La proporción de cepas fermentadoras de glucosa fue incrementando desde 21 % en la cuajada hasta 75 % hacia el final de la maduración del queso.

Los pocos estudios sistemáticos realizados en Argentina, corresponden a distintas especies de levaduras presentes en leche cruda y quesos provenientes de la cuenca

lechera santafesina (Baraggio, 2000) y más recientemente se han comenzado a estudiar en leches y quesos artesanales de la Región Patagónica y Tandil, provincia de Buenos Aires (Baraggio *et al.*, 2008; Carrasco *et al.*, 2006). En Santa Fe, el 56 % de las cepas de levaduras aisladas, mayoritariamente, pertenecieron al género *Candida*, de las cuales el 58 % correspondieron a *C. famata* y el resto a *C. parapsilosis*, *C. bertae* y *C. blankii*. Asimismo, en Trelew (región Patagónica) el 57 % de las cepas aisladas se incluyeron en el género *Candida*, siendo mayoritarias, las especies *C. famata* y *C. blankii* (25 %). De la misma manera, el 31 % de los aislamientos de levaduras provenientes de leches y quesos artesanales de la zona de Tandil pertenecieron al género *Candida*, la mayoría de la especie *C. blankii*, y otro 31 % de las cepas aisladas se correspondieron con *Myxozyma monticola*.

1.10.1. Aportes de las levaduras al proceso de maduración de quesos

De lo anteriormente expuesto se puede concluir que, frecuentemente, se encuentran altas tasas de levaduras en distintas variedades de quesos y que las mismas realizan una contribución significativa al proceso de maduración.

La presencia de levaduras en quesos puede ser atribuida a diferentes características tecnológicas como, la habilidad para crecer a bajas temperaturas (Rossi *et al.*, 1998; van de Tempel y Jacobsen, 1998; Cosentino *et al.*, 2001), la resistencia a altas concentraciones de sal (Besançon *et al.*, 1992; Tzanetakis *et al.*, 1998; Welthagen y Viljoen, 1999; Cosentino *et al.*, 2001; Suzzi *et al.*, 2003; Fadda *et al.*, 2001, 2004), la asimilación/fermentación de lactosa (Besançon *et al.*, 1992; Viljoen y Greyling, 1995; van de Tempel y Jacobsen, 1998; Welthagen y Viljoen, 1999; Cosentino *et al.*, 2001; Corbo *et al.*, 2001; Fadda *et al.*, 2001; Pereira- Dias *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 2001), la resistencia a agentes sanitizantes (Jacobsen y Narvhus, 1996; Ferreira y Viljoen, 2003) y la habilidad de tolerar bajos valores de a_w y pH (Viljoen, 1998; Welthagen y Viljoen, 1999; Wyder y Puhán, 1999).

La principal contribución de las levaduras al proceso de maduración de quesos es la utilización de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, pero también ácido cítrico, acético y succínico, productos del metabolismo del cultivo iniciador (Rossi *et al.*, 1998;

van de Tempel y Jacobsen, 1998; Welthagen y Viljoen, 1999; Cosentino *et al.*, 2001; Corbo *et al.*, 2001; Romano *et al.* 2001; Fadda *et al.*, 2001, 2004) con el consecuente incremento de pH.

Mayores valores de pH favorecen el desarrollo bacteriano, este suceso ha sido bien estudiado en quesos madurados por mohos y bacterias superficiales (Valdés-Stauber *et al.*, 1997) en los cuales la flora de bacterias o mohos no desarrolla hasta que la superficie de los quesos no ha alcanzado determinados valores de pH. El incremento de pH favorece el crecimiento de especies de bacterias poco tolerantes al ácido pero fuertemente proteolíticas, como son las bacterias corineiformes (Rossi *et al.*, 1998). Pero, además influye en la actividad de las enzimas proteolíticas y lipolíticas de distintos orígenes, puesto que la actividad enzimática, en general, puede verse disminuida a valores bajos de pH, por la desnaturalización de las enzimas presentes (Rossi *et al.*, 1998). De esta manera las levaduras colaborarían indirectamente en el desarrollo de la textura y el sabor-aroma.

La actividad proteolítica y lipolítica de ciertas especies de levaduras juegan un rol importante en la formación de precursores del aroma, tales como aminoácidos, ácidos orgánicos y ésteres (Viljoen y Greyling, 1995; Rossi *et al.*, 1998; Tzanetakis *et al.*, 1998; Welthagen y Viljoen, 1999; Romano *et al.*;2001, Fadda *et al.*, 2001, 2004); y contribuyen también a cambios en la textura (Welthagen y Viljoen, 1999; Cosentino *et al.*, 2001; Wojtatowicz *et al.*, 2001).

La actividad lipolítica de la biota levaduriforme implica una contribución directa a la maduración centrípeta de quesos madurados por flora superficial (Rossi *et al.*, 1998). En la maduración de quesos de vena azul (De Wit *et al.*, 2005), como el Roquefort, libera ácidos grasos libres a la "morge" en la superficie, ayudando al desarrollo de sus propiedades particulares (Besançon *et al.*, 1992).

Otra característica de las levaduras, a través de la cual participan en la maduración de los quesos, es la fermentación de azúcares (Welthagen y Viljoen, 1999) con producción de CO₂. Esta particularidad, por ejemplo, ayuda a transformar la estructura de los quesos madurados con mohos internos, proveyendo los espacios necesarios para el desarrollo de estos microorganismos (van de Tempel y Jacobsen, 1998). La fermentación de lactosa y galactosa en Mozzarella (Romano *et al.*, 2001) contribuye a la formación de

CO₂ y al sabor-aroma, pero además, evita el pardeamiento del queso durante la cocción por eliminación de estos azúcares.

También es valorada la capacidad de las levaduras para catabolizar las aminas biógenas producidas por las BAL en quesos originadas por descarboxilación de aminoácidos (Besançon *et al.*, 1992; Baraggio, 2000; Gardini *et al.*, 2006).

Finalmente, sea por propiedades metabólicas comprobadas (fermentación de lactosa, lipólisis y proteólisis) o por mecanismos no dilucidados completamente, es un hecho que las levaduras contribuyen al desarrollo de compuestos del sabor-aroma en quesos (Fleet y Mian, 1987; Suzzi *et al.*, 1998; Welthhagen y Viljoen, 1998; Fadda *et al.*, 2004). Se ha logrado mayor riqueza y concentración de compuestos del aroma en quesos Feta elaborados con *Debaryomyces* como adjuntos, que en aquellos manufacturados sólo con BAL (Bintsis y Robinson, 2004). Asimismo, se ha logrado una calidad sensorial superior (De Wit *et al.*, 2005), con sabores y aromas más intensos, en quesos madurados con *D. hansenii* y *Y. lipolytica*.

1.10.2. Interacciones entre levaduras y bacterias lácticas en quesos

El conocimiento, con que actualmente se cuenta, en lo que respecta a las interacciones entre levaduras y bacterias lácticas en los procesos de caseificación, es aún más escaso (Ferreira y Viljoen, 2003). Las BAL y levaduras proliferan simultáneamente en forma natural (Deak y Beuchat, 1996) en muchos alimentos. Las levaduras, presumiblemente, emplean metabolitos bacterianos como fuente de energía mientras que las bacterias, requerirían de ciertos factores de crecimiento secretados por las levaduras (Riviere, 1969; Deak y Beuchat, 1996). Se cree (Viljoen y Greyling, 1995; Valdés-Stauber *et al.*, 1997), que la biota levaduriforme puede estimular el crecimiento de otros microorganismos a través de la excreción de compuestos del complejo B: ácido pantoténico, biotina, niacina y rivo flavina. Además podrían desempeñar un rol sinérgico por metabolización del ácido láctico y otros ácidos orgánicos presentes en la cuajada provocando un incremento de pH en el medio, que favorecería el desarrollo bacteriano.

Las levaduras y otros microorganismos presentes en productos lácteos pueden interactuar de diferentes maneras. Las levaduras pueden inhibir el crecimiento de

microorganismos innecesarios que provocan defectos o son potencialmente patógenos, por ejemplo, *D. hansenii* inhibe la germinación de *C. butyricum* y *C. tyrobutyricum* en salmueras de quesos (Faticenti *et al.*, 1983), posiblemente (Deiana, *et al.*, 1984), por depleción de los ácidos lácticos y acético. El “factor killer” ha sido demostrado en levaduras aisladas a partir de salmueras utilizadas en la producción de quesos (Seiler y Busse, 1991), mostrando un amplio espectro antimicrobiano, que puede afectar tanto a mohos como a bacterias, incluyendo a las del cultivo iniciador.

Por otro lado, ellas pueden inhibir al cultivo iniciador o bien contribuir positivamente a la fermentación o maduración, ayudando a la función del cultivo starter

Las interacciones positivas entre levaduras y cultivos starter están bien documentadas para quesos madurados en superficie, algunos autores afirman que (Sauter, 1986) el desarrollo final de la flora superficial depende enteramente del catabolismo del ácido láctico por parte de las levaduras. Así, en los quesos semiblandos madurados por bacterias superficiales, como Limburger o Tilsit, en cuya corteza se produce una sucesión compleja de poblaciones microbianas, las levaduras, por metabolismo del ácido láctico, incrementan el pH y excretan compuestos que promueven el crecimiento de *Brevibacterium linens*, especie esencial para la maduración de estos quesos (Narvhus y Jacobsen, 1996). En adición, también se atribuye a la biota levaduriforme superficial, a través de su actividad lipolítica y proteolítica, la formación de otras sustancias que estimularían el crecimiento de bacterias lácticas y otra flora superficial (Seiler, 1990). En los quesos madurados con mohos internos se suma la producción de gas, por parte de las especies fermentadoras, lo que contribuye a una cuajada de textura más abierta (van de Tempel y Jacobsen, 1998; Viljoen *et al.*, 2003) que provee mayor espacio para el desarrollo de *Penicillium roqueforti*.

Trabajos realizados sobre la diversidad de levaduras asociadas a quesos Cheddar y Gouda (Wheltagen y Viljoen, 1998, 1999; Laubscher y Viljoen, 1999) sugieren que la biota levaduriforme participa en la maduración los mismos, coadyuvando al desempeño del fermento láctico. La evolución poblacional de BAL en quesos de tipo Cheddar, elaborados con levaduras como adjuntos, no evidenció ninguna inhibición, y por el contrario, se observó un incremento en la viabilidad de BAL cuando se compararon con los quesos

elaborados sin la adición de levaduras (Ferreira y Viljoen, 2003). Los autores atribuyeron este fenómeno también a la asimilación de ácido láctico por la flora levaduriforme (su concentración fue más baja en los quesos elaborados con levaduras) y a la liberación, por parte de la misma, de vitaminas y aminoácidos a través de autólisis o excreción, que promovieron el crecimiento de la flora bacteriana.

Las propiedades tecnológicas de los cultivos iniciadores también podrían ser exaltadas por la acción de la biota levaduriforme.

En las leches naturalmente fermentadas, cuando las levaduras son co-cultivadas con cepas de bacterias lácticas, se incrementa la producción de diferentes compuestos, entre ellos, sustancias que contribuyen al sabor-aroma, además de afectar a las cinéticas de crecimiento, lo cual sugiere una interacción positiva entre levaduras y BAL (Gadaga *et al.*, 2001; Neviani *et al.*, 2001; Narvhus y Gadaga, 2003).

En quesos Cheddar, elaborados con la adición de levaduras, se ha observado una mayor depleción del contenido de lactosa comparado con los quesos tradicionales (Ferreira y Viljoen, 2003). Debido a que las cepas de levaduras empleadas como adjuntos no asimilaban lactosa, sólo puede atribuirse su asimilación a las BAL u otros microorganismos contaminantes. Los autores propusieron que la biota levaduriforme podría incrementar la utilización de este azúcar por parte de las bacterias lácticas debido a una estimulación en su crecimiento. Dado que los microorganismos contaminantes son capaces de desarrollarse sin necesidad de factores de crecimiento, mientras que las BAL necesitan de vitaminas y aminoácidos, éstos podrían ser proporcionados por las levaduras. Tal vez, por esta razón, el número de BAL se vería incrementado y, consecuentemente, el metabolismo de la lactosa (Ferreira y Viljoen, 2003).

También se han informado, tanto un efecto sinérgico entre *Debaryomyces hansenii* y bacterias lácticas que resultó en una proteólisis más intensa (Deiana *et al.*, 1984), como el desarrollo de sabores más intensos y agradables en quesos elaborados con la adición de levaduras (Ferreira y Viljoen, 2003).

Asimismo, en un estudio comparativo de lipólisis y proteólisis en queso Cheddar tradicional y queso Cheddar elaborado con levaduras como adjuntos, se observaron cambios químicos que explican la superior calidad sensorial de los quesos preparados con

la adición de levaduras. Estos resultados sugirieron que la velocidad hidrolítica de las enzimas de los cultivos starters puede ser incrementada por enzimas de las levaduras (De Wit *et al.*, 2005).

1.11. Quesos Artesanales de Corrientes

La elaboración de quesos artesanales conocidos como “criollos”, “caseros” o “de campo”, constituye una antigua tradición en la Provincia de Corrientes realizada como actividad complementaria en la mayor parte de los establecimientos ganaderos.

En su elaboración se emplea leche cruda con escasa maduración proveniente de vacas criollas, alimentadas generalmente con pasturas naturales, y agente coagulante artesanal, obtenido a través de la inmersión de trozos de cuajo (cuarto estomago de terneros salado y secado) en leche durante 24 h.

La cuajada obtenida es cortada manualmente en granos pequeños y el salado, mínimo, se realiza en la masa antes del moldeo. Se emplean moldes de materiales diversos desde madera, hojas de palma hasta hojalata, acero inoxidable e incluso plástico. El prensado posterior también se realiza en forma manual.

La maduración es nula o escasa, 24 - 48 h. Se obtiene un queso fresco, blanco, de textura cerrada con una consistencia blanda a firme. Cada horma, de forma cilíndrica aplanada, tiene un tamaño que oscila entre 1,5 y 2 kg aproximadamente.

La comercialización de este producto se realiza, en su mayor parte, de manera informal. En las zonas rurales se ofrecen a la vera de los caminos junto con otros productos de origen animal (miel, huevos caseros) y también frutihortícolas (maní, naranjas, plantas ornamentales). En la ciudad, se venden en los mercados de abastecimiento de carnes, frutas y verduras.

Los quesos no están sometidos a controles de calidad higiénicos-sanitarios, ni a normas de elaboración que permitan obtener un producto tipificado, tampoco está incluido en el Código Alimentario Argentino.

Sin embargo, los quesos artesanales tienen en Corrientes un volumen de producción apreciable y un requerimiento muy interesante por parte del mercado, el cual podría ser aún más promisorio en la medida en que se ofrezca al consumidor un producto

seguro, y de calidad uniforme y constante, dado que muchos de ellos se abstienen de consumirlos ante la ausencia de estas características.

Estudios anteriores realizaron un amplio relevamiento de quesos artesanales (Gauna *et al.*, 1995) en toda la provincia de Corrientes que proporcionó un diagnóstico del estado higiénico-sanitario de los mismos como potenciales transmisores de enfermedades (Vasek, 2004a).

Por otra parte, se abordó el estudio en profundidad de la flora láctica presente en la materia prima y su evolución durante el proceso de elaboración y maduración, tanto desde el punto de vista de su composición (Vasek *et al.*, 2000), como de sus propiedades funcionales (acidificación, proteólisis, producción de aromas).

Luego se alcanzó el objetivo de formular un fermento adecuado para estos quesos a partir de las bacterias lácticas autóctonas aisladas (Vasek, 2003). El mismo fue probado a escala piloto y actualmente se están realizando los trámites para la obtención de la patente correspondiente.

También se estudió en profundidad la composición microbiológica y físico-química de la leche destinada a quesería y sus variaciones estacionales. Se comenzó la caracterización del cuajo artesanal desde el punto de vista funcional y como posible contaminante, habiendo evaluado hasta el momento: a) el tipo de tratamiento empleado para el salado – secado, b) la cinética de secado y disminución de contaminantes en condiciones ambientales no estandarizadas, c) la variación en la fuerza del agente coagulante artesanal en el tiempo y su carga microbiana.

No obstante, para completar los objetivos generales planteados al proponer la elaboración de un queso que, sin perder las características que le son típicas, resulte seguro y pueda ser tipificado y comercializado, es necesario proseguir el estudio de la tecnología de la elaboración en varios aspectos.

En particular, durante el desarrollo del trabajo de tesis doctoral “Fermento autóctono para la elaboración de Queso Artesanal de Corrientes” (Vasek, 2003) se observó que durante la maduración de este queso la población levaduriforme era importante y se incrementaba con el tiempo, sin verse afectada por la adición del

fermento constituido por bacterias lácticas ni por la prolongación del período de maduración.

En base a las consideraciones mencionadas, el estudio de la microbiota levaduriforme en los Quesos Artesanales de Corrientes, se presenta como un tema original y de gran interés.

Objetivos generales

Evaluar la incidencia, la distribución taxonómica, las propiedades tecnológicas y la participación en los procesos de maduración de cepas de levaduras presentes en Quesos Artesanales de Corrientes. Estudiar además sus posibles interacciones con las bacterias lácticas del fermento.

Objetivos particulares

- Determinar la incidencia y distribución taxonómica de levaduras en leche y quesos a distintos períodos de maduración en Queso Artesanal de Corrientes.
- Caracterizar las especies dominantes en cuanto a su capacidad de desarrollo en las distintas condiciones de elaboración casearia.
- Evaluar propiedades de interés tecnológico, que permitan determinar la participación de las cepas autóctonas en las transformaciones implicadas en el proceso de maduración de los quesos.
- Estudiar las posibles interacciones entre las levaduras dominantes y las bacterias lácticas constituyentes del fermento iniciador.

Capítulo 2

Materiales y Métodos



2.1. Elaboración del Queso Artesanal de Corrientes con el agregado del fermento “Gaucho”.

El Queso Artesanal de Corrientes se elabora usando metodologías muy rudimentarias transmitidas de generación en generación, que dan lugar a productos de calidad variable desde el punto de vista higiénico-sanitario (Gauna *et al.*, 1995, Vasek *et al.*, 2004a), físico-químico y sensorial. De acuerdo con la legislación vigente (Reglamento Técnico General del Mercosur. GMC Res. N° 79/94), se lo puede clasificar como “queso graso de muy alta humedad”.

A fin de obtener un producto con características uniformes Vasek desarrolló un fermento láctico a partir de cepas de bacterias lácticas autóctonas, aisladas de los mismos quesos artesanales. Este fermento recibió el nombre de “Gaucho” y se ensayó a escala de producción piloto en la elaboración de quesos artesanales en la Provincia de Corrientes (Vasek, 2003, 2005). Actualmente se encuentra en trámite de patentamiento a favor de la UNNE, ante el Instituto Nacional de la Propiedad Industrial (Vasek *et al.*, 2004b). Su composición se detalla a continuación:

Tabla 2.1. Formulación del fermento láctico “Gaucho”

Clasificación taxonómica	Nº Cepas	Proporción (v/v)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	15 - 25 %
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	1	10 - 20 %
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	1	25 – 35 %
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	5	30 – 40 %

2.1.1. Reactivación de las cepas del fermento empleado

Las cepas de bacterias lácticas (BAL) constituyentes del fermento fueron identificadas como:

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: 35cVCOR, 138cVCOR, 140cVCOR, 199cVCOR, 207cVCOR
- *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: 166cVCOR
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*: 14cVCOR
- *Lactobacillus plantarum*: 77bVCOR

Las ocho cepas constituyentes del fermento se descongelaron y posteriormente se activaron por tres pasajes sucesivos en leche descremada deshidratada reconstituida al 10 % (p/v) estéril (LDDe, ver Anexo I: medio N°1), incubando durante 14 h a 35 °C.

2.1.2. Purificación y control de las cepas

Se realizaron pasajes sucesivos en medio LAPTg10 (Raibaud *et al.*, 1961) líquido y gelificado (ver Anexo I: medio N°2) incubando a 35 °C. Esta operación se realizó tres veces a fin de asegurar la pureza de cada cepa.

Las cepas de bacterias lácticas, previo a su utilización en los ensayos, fueron sometidas a pruebas morfológicas y fisiológicas para verificar la adecuada conservación de los cultivos disponibles.

Características micromorfológicas

Se realizó un examen microscópico de los cultivos para observar las características morfológicas con microscopio de contraste de fases.

También se observaron las características morfológicas utilizando coloración simple con cristal violeta y tinción diferencial de Gram.

Características fisiológicas

Se realizaron determinaciones de algunas características fisiológicas a fin de asegurar la adecuada conservación de los cultivos de las cepas de las BAL en estudio, tales como:

-
- *Test de catalasa*: (Harrigan y McCance, 1976). En un portaobjetos se colocaron 30 μ l de cultivo y se adicionaron 30 μ l de H₂O₂ (10 volúmenes). El desprendimiento de burbujas de gas se consideró reacción positiva.
 - *Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis*: se prepararon cultivos en estría y punción con medios adecuados para el crecimiento de las bacterias en estudio: Agar Elliker (ver Anexo I: medio N°3) para *Lactococcus* y Agar MRS (ver Anexo I: medio N°4) para *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Los cultivos en punción se sellaron con un tapón de agua agarizada [2 % (p/v)] de 2 cm de altura, a fin de asegurar las condiciones de anaerobiosis, y se incubaron a 35 °C durante 48 horas. Al cabo de este tiempo se observó el desarrollo de los microorganismos sembrados.
 - *Producción anaeróbica de CO₂ a partir de glucosa* (Gibson y Abd-El-Malek, 1945). El medio semisólido (ver Anexo I: medio N°5) inoculado y sellado con VAS-PAR estéril (Vaselina-Parafina 1:1), se incubó durante 7 días. La ruptura del medio sólido indicó la capacidad del microorganismo para utilizar glucosa con formación de CO₂ en ausencia de oxígeno.
 - *Crecimiento a 10 y 45 °C*. Los microorganismos se inocularon en caldo LAPT_{g10} y se incubaron a las temperaturas correspondientes durante 7 días. Se observó crecimiento y se midió el pH final.
 - *Crecimiento en presencia de 4,0 y 6,5 % (p/v) de NaCl* (Vasek, 2003). Los cultivos activos se inocularon en medio líquido y (ver Anexo I: medio N°6) y se incubaron durante 24 - 48 horas. El crecimiento se evidenció por el cambio en el color del indicador debido a la acidez desarrollada, registrando el pH luego de la incubación a la temperatura óptima. Ambas pruebas se realizaron sólo en las cinco cepas pertenecientes a la especie de *Lactococcus lactis*, ya que la primera concentración permite diferenciar las distintas subespecies y la segunda, separarlas de los enterococos debido a que los lactococos no desarrollan a esta concentración.
 - *Crecimiento a pH inicial 9,2 y 9,6* (Shattock y Hirsch, 1947). Los microorganismos se inocularon en medio líquido (ver Anexo I: medio N°7) y se incubaron a 35 °C durante 7 días. Se observó el crecimiento y se midió el pH final. Ambas pruebas se realizaron sólo

en las cinco cepas pertenecientes a la especie de *Lactococcus lactis* porque permiten diferenciar las distintas subespecies.

- *Tolerancia a la bilis* (Smibert y Krieg, 1981). Los cultivos se inocularon por estría en medio gelificado (ver Anexo I: medio N°8) y la tolerancia se evidenció por la capacidad del microorganismo para crecer en dicho medio respecto al resultado obtenido en ausencia de bilis (control). Esta determinación se realizó sólo en las cinco cepas de *Lactococcus*.
- *Hidrólisis de la esculina* (Raibaud et al., 1973). El microorganismo activo se inoculó en medio líquido (ver Anexo I: medio N°9) y se incubó durante 48 h. La hidrólisis de esculina a esculetina se evidenció por la formación de un complejo entre ésta y los iones Fe^{3+} agregados [$FeCl_3$, 1,2 % (p/v); HCl, 2 % (p/v)], de color verde oliváceo-negro. Esta prueba se realizó únicamente sobre la cepa de *Lactobacillus plantarum* 77VCOR.
- *Producción de NH_3 a partir de arginina*. Se utilizó el medio (ver Anexo I: medio N°10) descrito por Raibaud et al. (1973). La producción de NH_3 a partir de arginina se evidenció por la aparición de coloración rojo ladrillo luego de la adición del reactivo de Nessler (ver Anexo I: reactivo N°1).
- *Utilización de citrato en agar leche semisólido de Crawford* (Harrigan y McCance, 1976). La utilización de citrato por los microorganismos inoculados, se evidenció por la formación de burbujas de gas acompañada a veces por ruptura del medio (ver Anexo I: medio N°11), resultante del crecimiento bacteriano. Se realizó también sobre las cinco cepas pertenecientes a la especie *Lactococcus lactis* puesto que permite identificar a la subespecie *diacetylactis*.
- *Crecimiento en leche adicionada de azul de metileno al 0,1 y 0,3 % (p/v)* (Larparent y Larparent-Gourgaud, 1975). El crecimiento de los microorganismos inoculados (ver Anexo I: medio N°12) se evidenció por la formación de ácido que favorece la coagulación de la leche, y la capacidad del microorganismo para reducir el azul de metileno como resultado de una modificación en el potencial de óxido-reducción. Ambas pruebas se realizaron sólo en las cinco cepas pertenecientes a la especie de *Lactococcus lactis* porque permiten diferenciar las distintas subespecies.

2.1.3. Conservación de las cepas del fermento

A fin de garantizar el mantenimiento eficaz de un stock de cultivos bacterianos sin riesgos de alteración en sus características bioquímicas y fisiológicas, se ensayaron métodos de conservación que, además de mantener viables y cultivables a los organismos, aseguran la ausencia de variaciones fisiológicas y genéticas.

Las cepas de bacterias lácticas fueron conservadas en medio LAPT (ver Anexo I: medio N°13). Esta técnica de conservación responde al criterio de reducción del metabolismo y consiste en el empleo de un medio sin fuente hidrocarbonada (Raibaud *et al.*, 1961).

Se partió de cepas del fermento conservadas a -20 °C. Una vez reactivados los cultivos, las cepas activadas por repiques sucesivos y en fase exponencial (las cepas se dejaron desarrollar durante una noche en caldo LAPT_{g10}), se centrifugaron durante 15 minutos a 3500 *g*, descartando el sobrenadante, en condiciones de esterilidad. Luego, se adicionó al sedimento el mismo volumen de solución fisiológica (0,85 % (p/v) NaCl) estéril. Se repitieron nuevamente las dos operaciones mencionadas, y finalmente el centrifugado celular de cada cepa se inoculó por duplicado en caldo LAPT y se conservó bajo refrigeración: 6 – 8 °C sin crecimiento (conservación a corto plazo).

Además, cada cepa fue resuspendida en medio LELg (leche descremada con el agregado de extracto de levadura y glucosa, ver Anexo I: medio N°14) con el agregado de glicerol 10 % (v/v) utilizado como agente crioprotector y congelada a -20 °C (conservación a largo plazo). De este modo se pudo disponer de estos cultivos conservados durante la totalidad del período de estudio (Vasek, 2003)

2.1.4. Pruebas de escalamiento y estandarización del fermento para la elaboración a escala de producción

Al inicio de cada estación anual evaluada, las cepas de bacterias lácticas conservadas a -20 °C fueron descongeladas y activadas como se indicó en el ítem 2.1.1. El escalamiento se realizó en caldo LAPT_{g10} llevándose a un volumen final de 30 ml. El primer pasaje se realizó desde un volumen original de 5 ml a 15 ml con 2 % (v/v) de

inoculo e incubado a 35 °C durante 14 h; el segundo pasaje se efectuó a partir de 15 ml a 30 ml con igual proporción de inoculo y en las mismas condiciones.

2.1.5. Preparación del fermento

Los microorganismos activos en LAPT_{g10} y escalados a un volumen final de 30 ml, fueron centrifugados (5000 g, 15 minutos), lavados con 0,85 % (p/v) de NaCl y resuspendidos en LDDe a igual volumen (30 ml) para ser usados en la elaboración del fermento. Estas suspensiones celulares fueron mezcladas en proporciones adecuadas, de acuerdo con el detalle de la Tabla 2.1.

El cultivo iniciador se preparó previamente a la elaboración de los quesos.

2.1.6. Elaboración de quesos

Se elaboraron un total de ocho quesos artesanales producidos en un Establecimiento Rural perteneciente a la Provincia de Corrientes, durante el período de un año (marzo 2004 - marzo 2005) y en las diferentes estaciones climáticas: otoño, invierno, primavera y verano. Las producciones se realizaron en el establecimiento de la familia Goiriz, ubicado en la localidad de Ramada Paso, provincia de Corrientes.

Los quesos fueron elaborados por el productor siguiendo la metodología tradicional con el agregado del fermento "Gaucho" en una concentración del 2 % (v/v).

A quince litros de leche recién ordeñada y calentada a 32 °C se le adicionaron 300ml del fermento [2 % (v/v)]. Luego de una ligera maduración de la misma (30 minutos), se agregaron 180 ml del agente coagulante artesanal. El mismo, es el suero obtenido de leche cruda coagulada por acción de las enzimas del cuajo (cuarto estómago de ternero secado y salado en una proporción de sal 1:3).

La leche con adición de fermento y agente coagulante comenzó a coagular aproximadamente a los 55 minutos. Cuando la cuajada adquirió las características deseables, se procedió al corte, realizado en forma manual hasta lograr granos del tamaño de un maní. El suero exudado se eliminó manualmente. Se procedió al salado [1,85 % (p/v)] de la cuajada semi-seca y luego se colocó en moldes plásticos perforados,

realizando un ligero prensado en forma manual, permitiendo así, la eliminación del suero residual en un tiempo estimado de 4 - 6 horas.

Los quesos se maduraron en refrigerador doméstico (5 – 8 °C) en el lugar de origen, rotándolos diariamente, y durante un período de 30 días.

Cada queso tuvo un tamaño promedio de 1 kg.

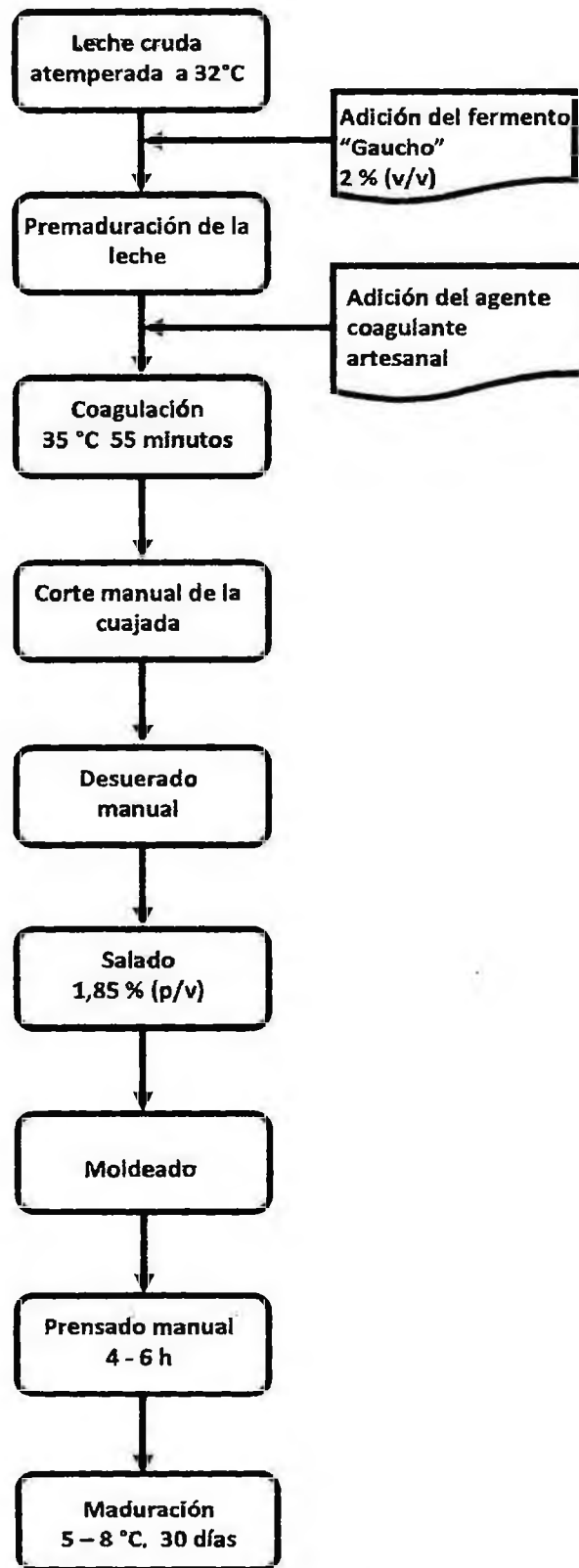


Figura 2.1. Flujograma de la elaboración del Queso Artesanal de Corrientes

2.2. Recuento y aislamiento de levaduras a partir de materia prima y producto final a distintos períodos de maduración

Las cepas de levaduras se aislaron de leche cruda, agente coagulante, cuajada y quesos producidos en distintos períodos de maduración (1, 6, 15 y 30 días) en las diferentes estaciones climáticas: otoño, invierno, primavera y verano.

2.2.1. Muestreo y preparación de las muestras

Las muestras de leche, agente coagulante y cuajada se recolectaron según International Standard FIL-IDF 50C:1995. Las de queso se extrajeron usando un sacabocados, desde la superficie al centro del mismo, descartando la parte externa (aproximadamente 2 cm). Los orificios se sellaron con VAS-PAR estéril (Vaselina-Parafina 1:1), a fin de evitar posibles cambios generados por las condiciones ambientales.

Se transportaron al laboratorio, mantenidas a temperatura de refrigeración (4–6°C), y se analizaron dentro de las 24 h de su extracción.

Las muestras se analizaron de acuerdo a lo descrito en International Standard FIL-IDF 122C:1996, para lo cual 10 ml de leche o agente coagulante se diluyeron con 90 ml de agua de peptona al 0,1 % (p/v). Para cuajada o quesos, se pesaron 10 g y se añadieron a 90 ml de solución de citrato de sodio 2 % (p/v), precalentando a 45 °C. Luego se prepararon diluciones decimales sucesivas en tubos con agua de peptona al 0,1 % (p/v).

2.2.2. Recuento total de levaduras

Diluciones apropiadas de las muestras, se sembraron en profundidad y por duplicado en cajas de Petri utilizando el medio de cultivo YGCB (Blok, ver Anexo I: medio N°15). Luego de incubar a 30 °C durante 4 días, se efectuó el recuento total de levaduras. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitros o gramo de muestra (UFC ml⁻¹ ó g⁻¹). (Seiler y Busse, 1990).

2.2.3. Aislamiento y purificación de levaduras

Se seleccionaron al menos tres colonias de cada caja de Petri. Se sembraron alternativamente, por pasajes sucesivos y al menos tres veces, en medio YM (líquido y

agarizado, ver Anexo I: medio N°16), con la adición de 10 % (v/v) de una solución de cloranfenicol (Seiler y Busse, 1990; ver Anexo I: reactivo N°2). Las cepas se incubaron a 30 °C durante 4 días como máximo, dependiendo de la velocidad de crecimiento, verificando su pureza por microscopía directa.

2.2.4. Conservación

Cada cepa pura se activó por dos pasajes sucesivos en caldo YM a 30 °C durante 24 h.

Luego se conservaron, a corto y largo plazo, por los procedimientos descritos en el ítem 2.1.3 para bacterias empleando el medio YM.

A corto plazo, se sembraron estrías de Agar YM con cultivos puros activos. Se los incubó a 30 °C durante 48 - 72 h y luego se almacenaron bajo condiciones de refrigeración (4 - 5 °C). (Seiler y Busse, 1990)

De esta manera se pudo disponer de las cepas de levaduras conservadas durante la totalidad del período de estudio sin riesgos de alteración en sus características bioquímicas y fisiológicas.

2.3. Caracterización taxonómica de las cepas aisladas

Las levaduras aisladas se identificaron de acuerdo con la clasificación y técnicas propuestas por Kreger-van Rij (1984) y Barnett (2000). También se confirmaron mediante el uso de Sistemas APY (Bio-Merieux).

Las cepas conservadas [YM con glicerol al 15 % (p/v)], fueron sometidas a un descongelamiento rápido a 40 °C y activadas por dos siembras sucesivas en caldo YM, incubándose a 30 °C durante 24 h.

2.3.1. Características morfológicas

Reproducción vegetativa

Para el examen microscópico se empleó caldo YM. Los cultivos fueron incubados 48 h a 30 °C.

Para el examen de las levaduras al microscopio se realizó un preparado entre porta y cubreobjeto. Se observaron, con objetivo de 40 X, los siguientes caracteres: forma, tamaño, formación de pseudohifas, tipo de reproducción agámica y posición de los brotes.

Reproducción sexual

La formación de ascosporos es inducida por condiciones que restringen la reproducción vegetativa, el microorganismo se desarrolla en un medio pobre en nutrientes. El medio de esporulación empleado fue agar Gorodkova modificado (Lodder and Kreger-van Rij, 1952; ver Anexo I: medio N°17). Se sembró por estría en superficie, incubando a 30 °C por tres días antes de ser examinados microscópicamente. En los casos negativos se continuó la incubación hasta cuatro semanas a temperatura ambiente.

Para la observación de los ascosporos se realizaron preparados o frotis, se tiñeron con una solución de verde de malaquita 5 % (p/v) durante 20 minutos, y finalmente 30 segundos con safranina. Las observaciones se realizaron con objetivo de inmersión de 100X.

El verde de malaquita tiñe los esporos que, como tienen pared gruesa e impermeable, requieren 20 minutos de contacto con el colorante. La safranina es un colorante de contraste, que tiñe la envoltura celular.

2.3.2. Características fisiológicas y bioquímicas

Cada cultivo activo se centrifugó durante 15 minutos a 3000 g, se lavó con solución fisiológica [0,85 % (p/v) NaCl] estéril y se centrifugó nuevamente en iguales condiciones. El pellet celular resultante se resuspendió en 3 ml de solución fisiológica estéril. Con fines de estandarización, se sembró un inóculo al 10 % (300 µl) de las cepas lavadas en cada una de las pruebas.

Asimilación de compuestos carbonados: azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos

Se empleo un medio líquido cuya composición se describe en el anexo I, medio N°18, (Barnett *et al.*, 2000) distribuido en alícuotas de 5 ml. Las soluciones de los compuestos carbonados se le adicionaron al 20 % (v/v), junto con 150 µl de una solución

stock de vitaminas (Barnett *et al.*, 2000; ver el Anexo I: reactivo N°3) bajo condiciones asépticas.

Los compuestos ensayados en esta prueba fueron:

- Hexosas: glucosa, galactosa.
- Disacáridos: sacarosa, maltosa, lactosa, melibiosa.
- Trisacárido: rafinosa.
- Pentosas: arabinosa.
- Alcoholes: inositol, eritritol, manitol, etanol, metanol, 2,3-butanodiol, galactitol.
- Ácidos orgánicos: ácido galacturónico, ácido cítrico, ácido glucurónico.

Se prepararon soluciones acuosas al 6 % (p/v) de los compuestos carbonados a estudiar, excepto para rafinosa que se preparó al 12 % (p/v), y se esterilizaron por vapor fluente durante 30 minutos.

Las cepas inoculadas para cada una de las pruebas mencionadas se incubaron 3 días a 30 °C. La presencia de turbidez fue interpretada como resultado positivo de la prueba.

Fermentación de carbohidratos

Para evidenciar la habilidad de fermentar un determinado carbohidrato se emplean pruebas que manifiestan la producción de dióxido de carbono bajo condiciones favorables para el metabolismo fermentativo de las diversas especies de levaduras estudiadas. Se empleó el medio basal para fermentación de carbohidratos descrito en el Anexo I (medio N°19), se distribuyó en alícuotas de 5 ml en tubos de ensayo con campanas de Durham.

Los carbohidratos ensayados fueron: glucosa, lactosa, galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa.

Las soluciones de los mismos se prepararon tal como se detalló para las pruebas de asimilación. A cada tubo de ensayo se adicionó 1 ml de las soluciones de los compuestos carbonados.

Las cepas se inocularon e incubaron a 30 °C, observándose la producción de gas en las campanas a los 3, 7 y 14 días.

Asimilación de compuestos nitrogenados

Las levaduras son capaces de utilizar una gran variedad de fuentes de nitrógeno, entre ellas: nitrato, cadaverina, glucosamina, lisina, etc. La habilidad de reducir los nitratos es un criterio diagnóstico de gran importancia para la clasificación taxonómica.

Para evaluar la capacidad de emplear una determinada fuente de nitrógeno, se prepara un medio base YNB (Barnett *et al.*, 2000; ver Anexo I: medio N°20) al que se le adiciona el compuesto nitrogenado en solución, en cantidad tal que alcance una concentración final de 2 - 5 mM y tres gotas de la solución stock de vitaminas empleada en la asimilación de compuestos carbonados.

Los compuestos ensayados en esta prueba fueron: nitrato de potasio, glucosamina, triptofano y cadaverina.

Para el caso particular del nitrato de potasio, este compuesto se agrega en una cantidad de 7,8 g/litro al medio base antes de ser esterilizado por calor.

Las restantes fuentes nitrogenadas ensayadas se prepararon en soluciones acuosas y se esterilizaron por vapor fluente durante 30 minutos. Se adicionan al medio base antes de su uso.

Tras la inoculación se incubó a 30 °C durante 7 días. La presencia de turbidez fue tomada como resultado positivo, excepto para el caso de nitratos.

Si las cepas en estudio asimilan nitratos dan reacción positiva de nitrito. Se emplean dos reactivos para la reacción de color: el reactivo A (ácido sulfanílico en ácido acético, ver Anexo I, reactivo N°4) y el reactivo B (α -naftilamina en ácido acético, ver Anexo I, reactivo N°4).

Se colocan unas gotas de reactivo A y B en partes iguales en cultivos para asimilación de nitrato. Los tubos se agitan y se observa la aparición de color rojo o rosado al cabo de 10 minutos. El desarrollo de color indica la presencia de nitritos en el medio y por consiguiente la asimilación del nitrato por parte de la levadura.

En los casos de ausencia de color, se agregan unas granallas de Zn, para detectar si el nitrógeno permanece en forma de nitrato o se redujo a nitrógeno molecular y se desprendió en forma de gas. Si el Zn reduce el nitrato a nitrito se observa la aparición de

un color rosado, comprobando de esta forma que el nitrato no fue asimilado por la levadura.

Crecimiento en medio libre de vitaminas

Se evalúa la capacidad de la levadura para sintetizar las vitaminas necesarias para su desarrollo y por lo tanto de crecer en ausencia de las mismas.

El medio de cultivo usado es el mismo que para el estudio de la asimilación de compuestos carbonados (Barnett *et al.*, 2000) con el agregado de glucosa en una cantidad de 10 g.litro⁻¹ y sin la adición de vitaminas.

Las células activas se inocularon e incubaron a 30 °C durante 7 días.

La presencia de turbidez se consideró como resultado positivo.

Crecimiento en cultivos con 5 % (p/v) de glucosa

Se preparó un caldo YM modificado: aumentándose la concentración de glucosa a 5 % (p/v).

Se incubó a 30 °C durante 15 días y se observó la presencia de turbidez.

Hidrólisis de urea

Se empleó el Medio Base de Christensen (Britania) (Christensen, 1946; ver composición en el Anexo I, medio N°21). Se le adicionó una solución de urea al 40 % (p/v) al medio basal estéril atemperado a 50 °C. (5 ml de solución de urea en 95 ml del medio base).

Se sembró por estría en superficie y se examinó el cambio de color en los tubos luego de 24 h de incubación a 37 °C.

Resistencia a cicloheximide 0,1 y 0,01 % (p/v)

Para la realización de este ensayo se utilizó el mismo medio basal con adición de vitaminas que para la utilización aeróbica de glucosa pero con el agregado de una solución estéril de cicloheximide (ver Anexo I: reactivo N°6) en proporción tal de alcanzar una concentración final de 0,1 ó 0,01 % (p/v) en el medio de cultivo.

Se incubó 3 días a 30 °C, tras lo cual se observó la presencia de turbidez.

Confirmación con Sistema API

Para confirmar los resultados obtenidos con las pruebas de identificación se utilizó el Sistema API 20 C AUX y API Candida (API 20C AUX®, BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Se dispuso la galería de acuerdo a las indicaciones consignadas por el kit comercial. El inóculo se preparó a partir de una suspensión de levaduras de turbidez igual a 2 correspondiente a la escala Mc Farland, 150 µl de esta suspensión se transfirieron a una ampolla de "C Médium", homogeneizando y evitando la formación de burbujas. Las cúpulas se llenaron con la suspensión obtenida y cuidando de crear un nivel horizontal o ligeramente convexo, pero jamás cóncavo.

Luego se cerró la cámara de incubación y se incubó a 30 °C durante 48 - 72 horas. Después de la incubación se observó el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula 0, testigo negativo. Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva.

En la hoja de resultados, los tests se separan en grupos de tres y se indica un valor de 1, 2 ó 4. Sumando al interior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtienen 7 cifras que constituyen el perfil numérico. La presencia de pseudohifas constituyó el test n° 21, y se le asignó un valor 4 cuando resultó positivo.

La identificación se realizó mediante un programa de identificación, introduciendo el perfil numérico de 7 cifras obtenido.

2.4. Caracterización tecnológica de las cepas aisladas

Cada cultivo activo (5 ml en caldo YM) se centrifugó durante 15 minutos a 3000 g, se lavó con solución fisiológica [0,85 % (p/v) NaCl] estéril y se centrifugó nuevamente en iguales condiciones. Se descartó el sobrenadante y el sedimento resultante se suspendió en 3 ml de solución fisiológica estéril. Con fines de estandarización, se sembró un inóculo al 10 % (300 µl) en cada una de las pruebas que se realizaron por duplicado.

2.4.1. Respuesta a distintos valores de pH (Vivier et al., 1994)

A fin de evaluar la capacidad de las levaduras de desarrollar en determinados rangos de pH se preparó un medio líquido (descrito en el Anexo I, medio N°22) cuyo pH se ajustó con ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio. Luego de su esterilización por calor se le adicionó tres gotas de la solución stock de vitamina estéril empleada también en la asimilación de compuestos carbonados.

Los valores de pH estudiados fueron: 4,7; 5,15 y 5,5.

Cada tubo de prueba se inoculó con la cepa en estudio y se incubó durante tres semanas a 30 °C. El test fue juzgado positivo cuando se observó la presencia de turbidez.

Con estos valores se pretende observar el crecimiento de las levaduras aisladas dentro de la variación de pH ocurrida en la elaboración de distintos tipos de quesos, abarcando todas las etapas de dicho proceso hasta la obtención del producto terminado.

2.4.2. Respuesta a distintas temperaturas (Vivier et al., 1994)

El medio de cultivo empleado fue el mismo medio que se empleó en el ítem 2.4.1, se lo distribuyó en alícuotas de 5 ml y luego de su esterilización por calor se le adicionó aseptícamente tres gotas de una solución stock de vitaminas (ver composición en Anexo I, reactivo N°3).

Se inocularon cuatro tubos con la cepa en estudio y se incubaron en las diferentes temperaturas a ensayar, 5, 18, 25 y 37 °C durante tres semanas.

Se observó la presencia de turbidez a los 7, 15 y 21 días de incubación a la temperatura estudiada.

Los valores se eligieron teniendo en cuenta las temperaturas durante la elaboración y la maduración de esta variedad casearia. La leche cruda empleada se almacena refrigerada aproximadamente durante 24 horas, sin embargo el agente coagulante y los quesos se preparan a temperatura ambiente y se maduran y conservan a 5 - 8 °C durante 30 días (refrigerador doméstico).

2.4.3. Respuesta a distintas concentraciones de ácido láctico (Besançon et al., 1992)

Al medio base líquido estéril (ver composición en el Anexo I, medio N°23) se le agregó en forma aséptica tres gotas de la solución stock de vitaminas (ver Anexo I: reactivo N°3) y ácido láctico en buffer tartrato 0,1 M - pH 4 (ver Anexo I: reactivo N°7), en cantidad tal de alcanzar los porcentajes a evaluar: 1, 2 y 3 % (p/v).

Se inoculó con la cepa en estudio y se incubó durante tres semanas a 30 °C. Se observó la presencia de turbidez a los 7, 14 y 21 días de incubación.

Con estos valores se pretende cubrir, aún en casos extremos, la variación de ácido láctico ocurrida en las distintas etapas de elaboración de quesos, desde las iniciales hasta la obtención del producto terminado. Además, se trata de determinar el comportamiento de las cepas de levaduras en lo que se refiere a su capacidad de desarrollo, aún en condiciones de elevada acidez.

2.4.4. Respuesta a distintas concentraciones de lactosa (Besançon et al., 1992)

El medio base líquido (ver Anexo I: medio N°24) se distribuyó en alícuotas de 3 ml y luego de su esterilización se le adicionó asépticamente tres gotas de una solución stock de vitaminas (ver Anexo I: reactivo N°3) y lactosa en buffer fosfato 0,2 M - pH 7 (ver Anexo I: reactivo N°8), en cantidad tal de alcanzar los porcentajes evaluados:

1, 2 y 3 % (p/v).

Se inoculó con la cepa en estudio y se incubó durante tres semanas a 30 °C. Se evaluó la presencia de turbidez a los 7, 15 y 21 días de incubación.

Los valores de lactosa se eligieron a partir de la distinta velocidad de degradación que tiene este azúcar en el queso. En quesos tipo cremoso la concentración de lactosa es alta, mientras que en quesos duros, la lactosa desaparece a las 12 horas.

2.4.5. Respuesta a distintas concentraciones de cloruro de sodio (Besançon et al., 1992; Vivier et al., 1994)

Se empleó el medio líquido usado en el ítem 2.4.1, al cual se le agregó NaCl en los porcentajes a evaluar: 2,5; 5; 10; 15 y 20 % (p/v). Se distribuyó en alícuotas de 5 ml y

luego de su esterilización por calor se le adicionó asépticamente tres gotas de la solución stock de vitaminas estéril empleada anteriormente.

Se inoculó con la cepa en estudio y se incubó durante tres semanas a 30 °C.

Se observó la presencia de turbidez a los 7, 15 y 21 días de incubación.

Los valores de las distintas concentraciones fueron elegidos debido a que en la etapa de salado del queso la proporción varía de acuerdo al queso elaborado. Los valores bajos [2,5 y 5 % (p/v)] corresponden a quesos blandos, y especialmente a las zonas profundas de variados tipos de masas casearias. El Queso Artesanal de Corrientes alcanza porcentajes de sal que no superan el 8 % (p/p). Sin embargo, el agente coagulante empleado en la elaboración de este queso es el suero obtenido de leche coagulada por acción del cuajo, el cual no es más que el cuarto estómago de ternero secado y salado en una proporción de sal-cuajo 1 : 3, por lo tanto estamos frente a concentraciones de sal elevadas.

2.5. Propiedades tecnológicas de las cepas aisladas

2.5.1. Actividad proteolítica (Marshall, 1992)

Se evaluó cualitativamente la actividad proteolítica exocelular en placa de Petri, mediante dos métodos:

a. Agar leche (Harrigan, 1976): cada 9 ml de medio base agarizado (ver composición en el Anexo I, medio N°25) atemperado a 80 °C se le adicionó 1 ml de LDDe. El medio de cultivo se distribuyó en placa y se inoculó con la cepa a estudiar.

Se incubó durante tres semanas a 30 °C. A los 3, 7, 14 y 21 días, se observó el desarrollo de halo transparente alrededor de las colonias.

b. Cz-Broth caseína (Kronborg Hansen y Jakobsen, 1998): se distribuyó el medio agarizado (ver Anexo I: medio N°26) en placas y se inoculó la cepa a estudiar. Se incubó durante 7 días a 30 °C. Se observó la actividad proteolítica por el agregado de una solución reveladora de cloruro de mercurio (ver Anexo I, reactivo N°9).

2.5.2. Actividad lipolítica (Vanderzant y Splittstoesser, 1992)

Se adicionó 1 g de tributirina por cada 100 ml de medio base (ver composición en Anexo I, medio N°27) atemperado a 80 °C. Se distribuyó en placas y se inoculó con la cepa a estudiar. Se incubó durante 3 semanas a 30 °C.

Se observó la formación de halo transparente alrededor de la colonia a los 7, 14 y 21 días de incubación.

2.5.3. Degradación de aminoácidos a amoníaco (Kreger-van Rij, 1984).

Los aminoácidos evaluados fueron lisina, ornitina, tirosina y fenilalanina. Se empleó un medio base (ver composición en el Anexo I, medio N°28) al que se le adicionó el aminoácido a estudiar y se ajustó el pH a 6,8.

Las cepas de levaduras se inocularon por estría en superficie y se incubaron a 30 °C.

Los cultivos se observaron diariamente hasta los 5 días. La reacción se consideró positiva cuando apareció un color rosado intenso, debido a la capacidad de hidrolizar altas concentraciones del aminoácido en estudio a amonio en un medio completo, conteniendo una fuente nitrogenada orgánica como peptona.

2.5.4. Metabolización de aminas biógenas (Besançon et al., 1992)

Cada cultivo activo de levadura (5 ml en caldo YM) se centrifugó durante 15 minutos a 3000 g, se lavó con solución fisiológica [0,85 % (p/v) NaCl] estéril y se centrifugó nuevamente en iguales condiciones. Se descartó el sobrenadante y el sedimento resultante se suspendió en 3 ml de solución fisiológica estéril. Con fines de estandarización, se sembró un inóculo al 10 % (300 µl).

Se empleó un medio líquido (ver anexo, medio N°29) al que se le adicionó las diferentes aminas evaluadas. Se distribuyó en alícuotas de 5 ml y esterilizó. Luego se le adicionó asépticamente tres gotas de una solución stock de vitaminas estéril (ver Anexo I: reactivo N° 3). Las aminas biógenas evaluadas fueron: histamina (Sigma), tiramina (Sigma) y triptamina (Sigma).

Cada tubo se inoculó con la cepa en estudio y se incubó a 30 °C durante 7 días.

Se evaluó a la asimilación de la amina por el desarrollo de turbidez.

2.6. Interacciones con las bacterias lácticas del fermento

2.6.1. Determinación de la actividad antagónica

2.6.1. a Método de estrías cruzadas (Madigan et al., 1998)

Se realizaron placas con medio de cultivo Elliker (Biokar) agarizado, para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* y MRS (Merck) agarizado, para *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* y *Lactobacillus plantarum*. Las mismas se sembraron con cultivos activos de las respectivas especies bacterianas y se incubaron a 35 °C, 24 h. Luego se sembraron con estrías cruzadas las levaduras en estudio y se incubaron 48 horas a 30 °C. Se observó si hubo inhibición del crecimiento de las levaduras por efecto de las bacterias lácticas.

2.6.1. b Método de difusión en agar (Benkerroum et al., 1993; Tagg y Mc Given, 1971)

Este método consiste en colocar 30 µl del sobrenadante libre de células a ensayar en cada uno de los orificios de 5 mm de diámetro practicados en la placa de YM Agar ya inoculada con la cepa de levadura cuya sensibilidad se pretende determinar. Las placas se incubaron durante 24 h a 30 °C, procediendo luego a medir el diámetro de los halos de inhibición.

- **Obtención de los sobrenadantes libres de células (Carrasco et al., 1997; Simonetta et al., 1998)**

Las cepas de *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 14cVCOR, pertenecientes al fermento "Gaucho", se activaron por 3 siembras sucesivas en Caldo MRS (Merck), incubándose a 35 °C durante 24 h. Los cultivos finales se obtuvieron sembrando 1,2 ml del último precultivo en 30 ml de caldo MRS (Merck), incubándose durante 16 - 20 h a 35 °C. Los sobrenadantes libres de células se obtuvieron centrifugando los cultivos finales a 3000 g durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido, identificado como 77bVCOR, se concentró diez veces por evaporación a 70 °C, en evaporador rotativo (Fbr), y se esterilizó posteriormente por filtración a través de membranas de 0,45 µm de diámetro de poro (Renner GMBH).

La cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 35cVCOR, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 166cVCOR, también constituyentes del fermento "Gaucha" se reactivaron en 50 ml de Caldo Elliker (Biokar), a 35 °C durante 16 h antes de su uso para obtener sobrenadantes libres de células. El mismo se obtuvo mediante centrifugación de los cultivos a 3000 g, por 30 minutos. El sobrenadante libre de células se concentró por evaporación a 70 °C (Fbr) y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro (Renner GMBH).

2.6.2. Estimulación o inhibición del crecimiento de levaduras por bacterias lácticas (Carrasco et al., 1997; Simonetta et al., 1998)

Los ensayos se efectuaron en cultivos proliferantes en leche, y se estudió el efecto de las bacterias lácticas del fermento "Gaucha" sobre el crecimiento de distintas cepas de levaduras.

Las cepas de levaduras utilizadas en el ensayo fueron:

- *Candida blankii* (2 cepas): 2L1P, 2Q1/10P
- *Debaryomyces polymorphus*: 5Q1/26O
- *Debaryomyces vanriijiae*: 6Q1/11P

Se utilizó una mezcla de cultivos activos de las ocho cepas de bacterias lácticas constituyentes del fermento "Gaucha", las proporciones relativas de cada cepa en la mezcla fueron iguales a las empleadas para formular el fermento (ver Tabla 2.1).

Se ensayando las siguientes combinaciones:

1. Cultivo de levaduras + mezcla de cultivos activos de bacterias lácticas del fermento: se agregaron 2 ml de cultivo activo de levadura y 2 ml de mezcla de bacterias lácticas del fermento a 100 ml de LDDe.
2. Cultivo puro de cada cepa de levadura: se adicionaron 2 ml de cultivos activos de cada cepa de levadura a estudiar a 100 ml de LDDe.
3. Mezcla de cultivos activos de bacterias lácticas del fermento: se agregaron 2 ml de esta mezcla de bacterias lácticas del fermento a 100 ml de LDDe.

Se incubaron a 35 °C y se determinó el número de células viables de levaduras y el número de células viables de bacterias lácticas en las distintas combinaciones, a

intervalos apropiados (0 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas), utilizando el método de diluciones sucesivas. Para el recuento de bacterias lácticas se empleó Agar Elliker, incubando 48 h a 35 °C. Para el recuento de levaduras se empleó Agar YM, incubando a 30 °C durante 48 h.

2.7. Estimulación de propiedades tecnológicas deseadas

2.7.1. Estimulación de actividad proteolítica y lipolítica por métodos cualitativos

Se estudió la estimulación de lipólisis y proteólisis en cultivos conjuntos de levaduras y una mezcla de bacterias lácticas constituyentes del fermento.

Se seleccionaron cuatro cepas de levaduras que presentaban propiedades tecnológicas interesantes para la elaboración de quesos.

Las cepas de levaduras estudiadas fueron las siguientes:

- dos cepas de *Candida blankii* (2L1P, 2Q1/10P)
- una cepa de *Debaryomyces vanriijiae* (6Q1/11P)
- una cepa de *Debaryomyces polymorphus* (5Q1/26O)

Los medios de cultivos y metodologías utilizados para estas pruebas son los descritos en las secciones correspondientes a los ítems 2.5.1 y 2.5.2: actividad proteolítica y actividad lipolítica.

Las pruebas fueron inoculadas con cultivos activos conjuntos de:

- cada cepa de levadura
- y
- una mezcla (en las proporciones relativas indicadas en la Tabla 2.1) de las ocho cepas de bacterias lácticas del fermento.

En trabajos anteriores, Vasek (2003) evaluó la actividad proteolítica de las ocho cepas del fermento y encontró que sólo la cepa *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR presentaba actividad proteolítica. Por consiguiente, a fin de descartar que los posibles incrementos no se debieran sólo a la actividad propia de esta bacteria láctica, se evaluó simultáneamente y en iguales condiciones la actividad proteolítica de esta cepa pura.

2.7.2. Estimulación de actividad proteolítica por métodos cuantitativos

Se evaluó la actividad proteolítica por un método cuantitativo de cultivos conjuntos de la única cepa proteolítica del fermento, *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR (Vasek, 2003) y las mismas cepas de levaduras usadas en el ítem anterior.

Test del aldehído ftálico (OPA) (Church *et al.*, 1983): este método mide la absorbancia del producto formado entre los grupos α -amino (con excepción de cisteína que presenta reacción débil y prolina que no reacciona) liberados por hidrólisis enzimática, con el reactivo aldehído ftálico (OPA) y β -mercaptoetanol.

Se realizaron dos repiques sucesivos en LDe al 2 % (100 μ l/5ml LDe), de cada cepa de levaduras a estudiar y de la cepa *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR, todas por separado. Los tiempos y temperaturas de incubación de cada repique fueron: 48 h a una temperatura de 30 °C para las cepas de levaduras y 24 h a 35 °C para el *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR.

El tercer pasaje de cada cepa se realizó con dos concentraciones diferentes de inóculo: al 2 % y al 4 % en LDe, incubando a las temperaturas y los períodos anteriormente mencionados. De esta manera, luego del período de incubación respectivo, se contaba con dos cultivos en LDe de cada cepa, a los que llamamos:

- cultivo simple concentración: correspondiente al inóculo del 2 %
- cultivo doble concentración: correspondiente al inóculo del 4 %

El cuarto pasaje a LDe se realizó ensayando las siguientes combinaciones:

1. Cultivo de levaduras + cultivo de *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR: se agregaron 50 μ l de cultivo doble concentración de levadura y 50 μ l de cultivo doble concentración del *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR a 5 ml de LDe.
2. Cultivo puro de cada cepa de levadura: se adicionaron 100 μ l de cultivo simple concentración de cada cepa de levadura a estudiar a 5 ml de LDe.
3. Cultivo puro de *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR: se agregaron 100 μ l de cultivo simple concentración del *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR a 5 ml de LDe.

De esta manera se evitó la dilución del inóculo en los cultivos conjuntos, manteniendo en el cuarto pasaje la relación del 2 % entre el cultivo y el medio de cultivo: 100 μ l de cultivo en 5 ml de medio.

El cuarto pasaje se incubó durante 16 h a una temperatura de 30 °C.

A una alícuota de 2,5 ml del cultivo se le agregaron 0,5 ml de agua destilada y se trató con 5 ml de solución de ácido tricloroacético (TCA) 0,75 N. Luego de 10 minutos se centrifugó (5000 g, 15 minutos), y una alícuota (50 µl) del sobrenadante, se agregó a 1 ml de reactivo OPA (ver Anexo I, reactivo N° 10). Luego de 15 minutos de reacción, se midió la absorbancia a 340 nm ($A_{340 \text{ nm}}$), empleando como blanco LDDe sin inocular. Los resultados se expresaron en valores de absorción.

2.8. Elaboración de quesos a escala de laboratorio usando el fermento “Gaicho” con la adición de levaduras como adjunto. Análisis sensorial

2.8.1. Microorganismos y condiciones de cultivo.

Bacterias lácticas

Las cepas *L. lactis* subsp. *lactis* (35cVCOR, 138cVCOR, 140cVCOR, 199cVCOR, 207cVCOR), *L. lactis* subsp. *diacetylactis* (166cVCOR), *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (14cVCOR) y *L. plantarum* (77bVCOR), fueron activadas en caldo LAPTg₁₀ durante 14 h a 35 °C.

Los cultivos fueron centrifugados (5000 g, 15 minutos), lavados tres veces con solución de NaCl 0,85 % (p/v) y resuspendidos en medio LDDe al volumen original. Estas suspensiones celulares fueron usadas para preparar el fermento en las proporciones indicadas en las Tabla 2.1.

Levaduras

Se seleccionaron 5 cepas de levaduras entre las especies más frecuentemente encontradas con características y propiedades tecnológicas interesantes.

Las cepas *Debaryomyces vanriijiae* (6Q1/11P), *Candida blankii* (2L1P, 2Q1/10P), *Candida santjacobensis* (4Q1/25O) y *Debaryomyces polymorphus* (5Q1/26O) fueron activadas en caldo YM durante 24 h a 30 °C.

Los cultivos fueron centrifugados (5000 g, 15 minutos), lavados con solución de NaCl 0,85 % (p/v) y en resuspendidos en medio LDDe al volumen original. Estas

suspensiones celulares fueron usadas como adjunto al fermento "Gaucho" en una proporción de 5 % (v/v).

2.8.2. Elaboración de quesos

Cinco lotes de 5 litros de leche cruda termizada (20 minutos, 35 °C), fueron inoculados al 2 % (v/v) con el fermento "Gaucho" con levaduras como adjunto (5 mezclas) de modo que la concentración final del cultivo iniciador fuese de 10^9 UFC. ml⁻¹ aproximadamente. Luego de 30 minutos de maduración con agitación suave, se agregó 1 ml de solución de agente coagulante estándar: 0,02 % (v/v) (NATUREM, 1/150.000). Al cabo de 2 h, la cuajada se cortó en cubos de 1,5 cm y el suero se eliminó parcialmente. La cuajada se colocó sobre lienzo, se saló [NaCl 1,85 % (p/v)] y moldeó en recipientes circulares (alto: 11,5cm, Ø = 10,5 cm). Luego del desuerado a temperatura ambiente durante 24 h, los quesos se desmoldaron y dejaron madurar bajo refrigeración durante 15 días, volteándolos diariamente. Quesos elaborados sólo con la adición del fermento "Gaucho" sin levaduras fueron usados como control.

2.8.3. Análisis sensorial de los quesos [Meilgaard *et al.*, 1991; Poste *et al.*, 1991; Stone y Sidel, 1985; Departamento de Evaluación Sensorial de Alimentos (DESA), Instituto Superior Experimental de Tecnología Alimentaria (ISETA), Curso-Taller, 2004; Curia *et al.*, 2005).

Se midió la **Aceptabilidad Sensorial** de cinco quesos artesanales de Corrientes elaborados con el agregado de diferentes cepas de levaduras (mencionadas en el ítem 2.8.1) como adjunto y 1 queso sin la adición de levaduras, usado como control.

Se emplearon dos métodos:

- *Ordenamiento de preferencias*: se usa este método cuando el objetivo es comparar la preferencia de más de dos muestras
- *Escala hedónica*: usado cuando se quiere saber cuál es el grado de aceptabilidad del producto. Se usan escalas hedónicas como la indicada en la Figura 2.2. La frase marcada por el consumidor se transforma en puntaje para el análisis de resultados. A partir de los puntajes obtenidos por las distintas muestras, se puede inferir cual es la más preferida.

Diseño de la prueba

Se empleó una población de 30 consumidores no entrenados (Sancho *et al.*, 2002) compuesta por personas de edades entre 18 y 65 años de ambos sexos.

Las pruebas se realizaron en una habitación sin ruidos, con paredes pintadas de color claro y luz natural, a los 15 días de elaboración del producto.

Cada consumidor recibió una bandeja con 6 trozos triangulares de queso, seccionados a partir del corazón de la horma y codificados con 3 números elegidos y ubicados al azar. Como medio de neutralización entre muestras individuales, cada consumidor debió consumir una galletita de agua y un vaso pequeño de agua.

El análisis de aceptabilidad sensorial se realizó mediante dos pruebas, efectuadas en distintos momentos de un mismo día:

1. *Ordenamiento de preferencia*: se le solicitó al consumidor que ordene las muestras de quesos según el orden de preferencia escribiendo el número de la muestra que más le gustaba a la izquierda siguiendo hacia la derecha con las que menos le gusten. Además se le requirió que en relación a la muestra que más le gustó indicara por qué.

2. *Ensayo de aceptabilidad utilizando escala hedónica*: los consumidores indicaron su grado de aceptabilidad de distintos atributos para cada queso utilizando la escala hedónica de la Figura 2.2. Se evaluaron los atributos textura, sabor-aroma y preferencia global.

Las Figs. 2.2 y 2.3 muestran las planillas empleadas en la prueba.

Ensayo de aceptabilidad de Queso Artesanal de Corrientes									
Nombre _____									1
Consumidor N° _____					Fecha _____				
Ud. recibirá seis muestras de quesos, ordenadas al azar, codificadas con números de tres dígitos. Primero deberá evaluarlas en los atributos: preferencia global, sabor-aroma y textura. Luego realice el ranking de preferencia según se indica en la hoja 3.									
Muestra N° _____									
PREFERENCIA GLOBAL									
Me disgusta mucho			Me es indiferente				Me gusta mucho		
↓ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	↓ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	↓ <input type="checkbox"/>
TEXTURA									
Me disgusta mucho			Me es indiferente				Me gusta mucho		
↓ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	↓ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	↓ <input type="checkbox"/>
SABOR-AROMA									
Me disgusta mucho			Me es indiferente				Me gusta mucho		
↓ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	↓ <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	↓ <input type="checkbox"/>

Figura 2.2. Planilla utilizada para el ensayo de aceptabilidad empleando una escala hedónica.

Prueba de ranking de preferencia	
<p style="text-align: right; margin: 0;">3</p> <p>Por favor ordene las muestras de quesos según el orden de preferencia escribiendo el número de la muestra que más le gusta a la izquierda siguiendo hacia la derecha con las que gustan menos.</p>	
<p>TEXTURA</p> <p style="text-align: center;"> _____ _____ _____ _____ _____ _____ </p> <p style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> gusta más gusta menos </p> <p>En relación a la que le gusta más diga por qué: _____</p>	
<p>SABOR-AROMA</p> <p style="text-align: center;"> _____ _____ _____ _____ _____ _____ </p> <p style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> gusta más gusta menos </p> <p>En relación a la que le gusta más diga por qué: _____</p>	
<p>PREFERENCIA GLOBAL</p> <p style="text-align: center;"> _____ _____ _____ _____ _____ _____ </p> <p style="display: flex; justify-content: space-between; width: 100%;"> gusta más gusta menos </p> <p>En relación a la que le gusta más diga por qué: _____</p>	

Figura 2.3. Planilla utilizada para el ordenamiento de preferencia.

2.8.4. Análisis estadístico. Se realizó el análisis multivariado con un grado de confianza de 95 % para el ensayo de aceptabilidad con una escala hedónica y el análisis de varianza no paramétrica empleando el test de Friedman con un grado de confianza de 95 % para el ranking de preferencia. Para ambos análisis se empleo el Software Infostat (2002), v.1.1.

Capítulo 3

Resultados y Discusión



3.1. Elaboración del Queso Artesanal de Corrientes con el agregado del fermento "Gaucho"

3.1.1. Control de cepas del fermento. Características fisiológicas y micro-morfológicas de las cepas de bacterias lácticas

- *Test de la catalasa:* No se observó desprendimiento de oxígeno en ninguna de las cepas de bacterias lácticas (BAL) ensayadas. Al confirmar el carácter catalasa negativo en estos cultivos en estudio, se confirma inicialmente la ausencia de bacterias contaminantes catalasa positivas.
- *Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis:* las cepas de BAL desarrollaron tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis o micro-aerofilia.
- *Producción anaeróbica de CO₂ a partir de glucosa:* sólo la cepa *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 14cVCOR liberó CO₂ en ausencia de oxígeno. No se observó desprendimiento de gas en ninguna de las otras cepas, como debería de esperarse, dado que todas éstas pertenecen a especies homofermentativas.
- *Crecimiento a 10 y 45 °C:* todas las cepas (35cVCOR, 138cVCOR, 140cVCOR, 199cVCOR, 207cVCOR) pertenecientes a la especie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR no crecieron a 10 °C, mientras que la cepa *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 14cVCOR fue la única capaz de crecer a esa temperatura. Sólo *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR desarrolló a 45 °C, las demás cepas, como es característico de sus géneros, no crecieron a la temperatura mencionada.
- *Crecimiento en presencia de 4,0 y 6,5 % (p/v) de NaCl:* ninguna cepa de la especie *Lactococcus lactis* desarrolló a la más alta concentración de sal, confirmándose la ausencia de cocos contaminantes. Por otra parte, todas crecieron a la concentración de 4,0 % (p/v) como es típico para la subespecies *lactis* y *diacetylactis*.
- *Crecimiento a pH inicial 9,2 y 9,6:* todas las cepas de *Lactococcus* crecieron en medios de cultivo a los pH ensayados; con estos resultados se ratificó la identidad de ambas subespecies.
- *Tolerancia a la bilis:* todas las cepas de *Lactococcus* fueron capaces de crecer en el medio específico, como es característico de las subespecies *lactis* y *diacetylactis*.

- *Hidrólisis de la esculina: Lactobacillus plantarum 77bVCOR* hidrolizó la esculina, lo que permitió confirmar, junto con otras pruebas, su pureza.
- *Producción de NH₃ a partir de arginina: como es propio de Lactococcus lactis subsp. lactis y L. lactis subsp. diacetylactis, las cepas 35cVCOR, 138cVCOR, 140cVCOR, 199cVCOR, 207cVCOR y 166cVCOR, hidrolizaron arginina. Lactobacillus plantarum 77bVCOR y Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum 14cVCOR fueron negativas para esta prueba, como es propio de estas especies.*
- *Utilización de citrato en agar leche semisólido de Crawford: la cepa de Lactococcus lactis subsp. diacetylactis 166cVCOR, fue la única positiva. Se confirmó con esta prueba la pureza de las demás cepas de Lactococcus y la identidad de la cepa 166cVCOR.*
- *Crecimiento en leche adicionada de azul de metileno al 0,1 y 0,3 % (p/v): todas las cepas de Lactococcus redujeron el azul de metileno, con estos resultados se ratificaron ambas subespecies.*

Las características generales observadas para las ocho cepas de bacterias lácticas constituyentes del fermento "Gaicho" luego de la realización de los ensayos anteriores, resultaron coincidentes con las que les son propias a cada una de estas especies autóctonas.

Estos resultados permitieron corroborar la preservación de las propiedades bioquímicas y fisiológicas, originalmente evaluadas, en los cultivos bacterianos salvajes a utilizar y la ausencia de contaminantes.

3.2. Recuento y aislamiento de levaduras

Se evaluó la cinética de crecimiento en la población de levaduras presentes en leche, agente coagulante y quesos a distintos períodos de maduración y en las distintas estaciones del año. Para ello se llevó a cabo la producción de quesos artesanales de Corrientes (QAC) en un establecimiento rural situado en la localidad de Ramada Paso (50 km de la capital de la provincia de Corrientes) con la adición del fermento "Gaicho". El producto se mantuvo en el lugar de origen, y las muestras (leche, agente coagulante,

cuajada, y quesos de 1, 6, 15 y 30 días de maduración) conservadas a bajas temperaturas, fueron transportadas al laboratorio y analizadas en el día. A lo largo de un año se elaboraron un total de ocho quesos, dos por cada estación climática.

De esta manera se obtuvieron los perfiles de crecimiento de las levaduras durante la elaboración y maduración del QAC en las cuatro estaciones climáticas. Cada uno de ellos corresponde al valor medio de dos elaboraciones realizadas en cada estación. La estadística descriptiva de los recuentos, expresados como log UFC ml⁻¹ ó g⁻¹, se presentan en las Tablas 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4.

Tabla 3.1. Recuentos de levaduras durante la elaboración y maduración de Queso Artesanal de Corrientes en la estación otoño

Muestra	Log UFC.ml ⁻¹	Log UFC.g ⁻¹	DE	CV	Min	Max
leche	4,12		0,50	12,05	3,00	4,5
agente coagulante	3,74		0,23	6,25	3,47	4,08
cuajada		5,06	0,36	7,13	4,60	5,66
queso 1 ^a		4,58	0,70	15,33	3,80	5,34
queso 6 ^a		4,77	0,41	8,63	4,23	5,43
queso 15 ^a		5,38	0,16	2,99	5,22	5,65
queso 30 ^a		5,81	0,75	12,86	5,09	6,67

a: días de maduración
 DE: desviación estándar
 CV: coeficiente de variación

Min: mínimo
 Max: máximo

Tabla 3.2. Recuentos de levaduras durante la elaboración y maduración de Queso Artesanal de Corrientes en la estación invierno

Muestra	Log UFC.ml ⁻¹	Log UFC.g ⁻¹	DE	CV	Min	Max
leche	2,99		0,69	23,00	2,00	3,90
agente coagulante	5,04		0,44	8,75	4,60	5,60
cuajada		5,00	0,39	7,71	4,60	5,38
queso 1 ^a		4,02	1,07	26,77	3,00	5,05
queso 6 ^a		4,01	0,99	25,31	3,00	5,04
queso 15 ^a		5,57	0,26	4,71	5,24	5,87
queso 30 ^a		6,08	0,75	12,38	5,24	7,04

a: días de maduración
 DE: desviación estándar
 CV: coeficiente de variación

Min: mínimo
 Max: máximo

Tabla 3.3. Recuentos de levaduras durante la elaboración y maduración de Queso Artesanal de Corrientes en la estación primavera

Muestra	Log UFC.ml ⁻¹	Log UFC.g ⁻¹	DE	CV	Min	Max
leche	4,38		0,40	9,08	3,95	4,95
agente coagulante	5,75		0,91	15,82	4,78	6,65
cuajada		4,63	1,09	23,58	3,30	5,77
queso 1 ^a		4,89	1,51	30,89	3,00	6,46
queso 6 ^a		5,28	1,46	27,66	3,65	6,70
queso 15 ^a		6,38	0,44	6,93	5,86	6,95
queso 30 ^a		6,82	0,94	13,76	6,00	8,70

a: días de maduración

DE: desviación estándar

CV: coeficiente de variación

Min: mínimo

Max: máximo

Tabla 3.4. Recuentos de levaduras durante la elaboración y maduración de Queso Artesanal de Corrientes en la estación verano

Muestra	Log UFC.ml ⁻¹	Log UFC.g ⁻¹	DE	CV	Min	Max
leche	3,57		0,40	11,09	3,00	4,00
agente coagulante	3,70		0,88	23,90	2,60	4,85
cuajada		3,80	0,31	8,23	3,38	4,30
queso 1 ^a		3,68	0,31	8,40	3,36	4,30
queso 6 ^a		4,49	0,81	18,11	3,52	5,38
queso 15 ^a		6,44	0,33	5,10	6,08	6,95
queso 30 ^a		7,09	0,10	1,47	6,08	6,95

a: días de maduración

DE: desviación estándar

CV: coeficiente de variación

Min: mínimo

Max: máximo

Las diferentes muestras analizadas a lo largo de un año presentaron una población de levaduras en el orden de $10^3 - 10^7$ UFC ml⁻¹ ó g⁻¹.

Los valores promedios de los recuentos de levaduras en leche cruda oscilaron entre 2,99 log UFC. ml⁻¹ y 4,38 UFC . ml⁻¹. Éstos, resultaron ser similares (Vasek, 2003; Fadda *et al.*, 2004) a los informados para leche cruda empleada para la elaboración de quesos artesanal. Con excepción de la estación otoño, el agente coagulante aporta la mayor contaminación a la cuajada y consecuentemente a los quesos en todas las estaciones.

Estos resultados también son coincidentes con los informados por otros autores (Besancon *et al.*, 1992; López-Díaz *et al.*, 1995; van de Tempel y Jacobsen, 1998; Pereira-Dias *et al.*, 2000) en otras variedades de quesos.

Los perfiles de crecimiento de cada estación se muestran en las Figs. 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4. La Fig. 3.5 permite comparar los perfiles correspondientes a cada estación.

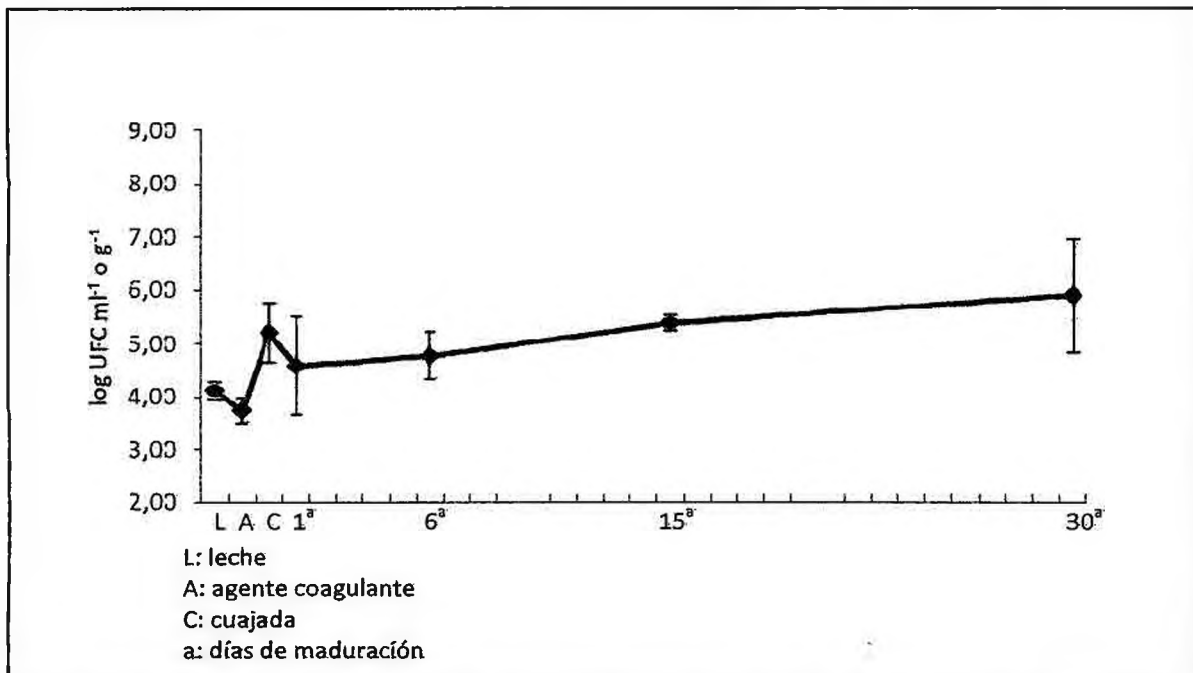


Figura 3.1. Cinética de crecimiento de levaduras durante la elaboración y maduración de Queso Artesanal de Corrientes en la estación otoño

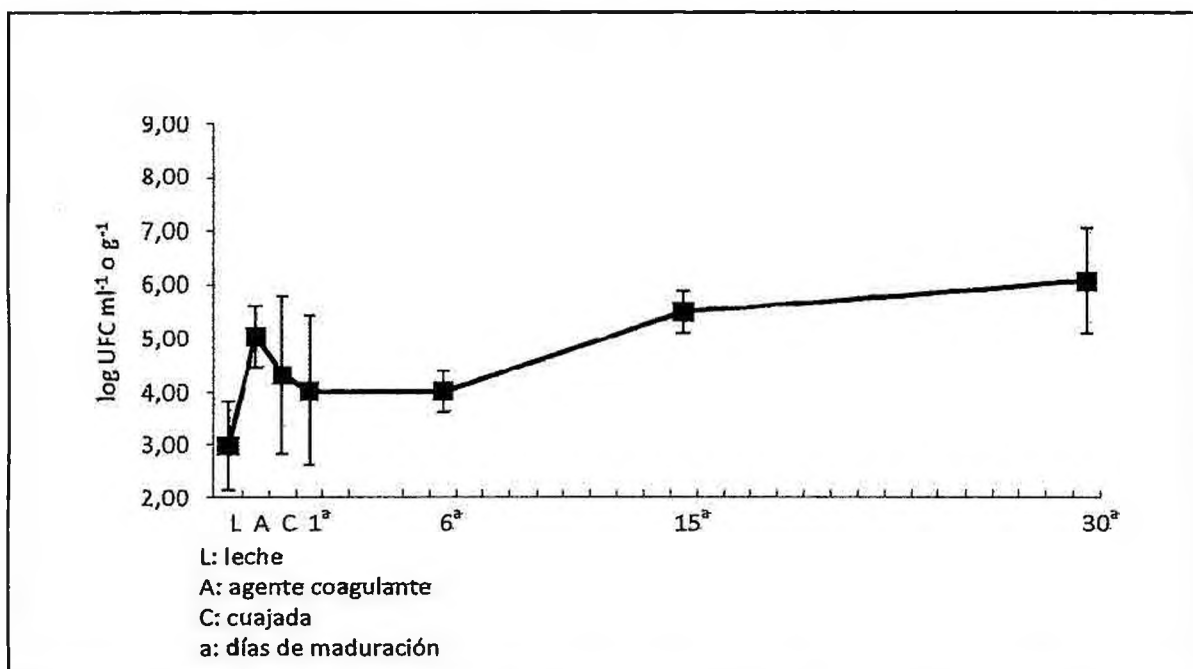


Figura 3.2. Cinética de crecimiento de levaduras durante la elaboración y maduración de Queso Artesanal de Corrientes en la estación invierno

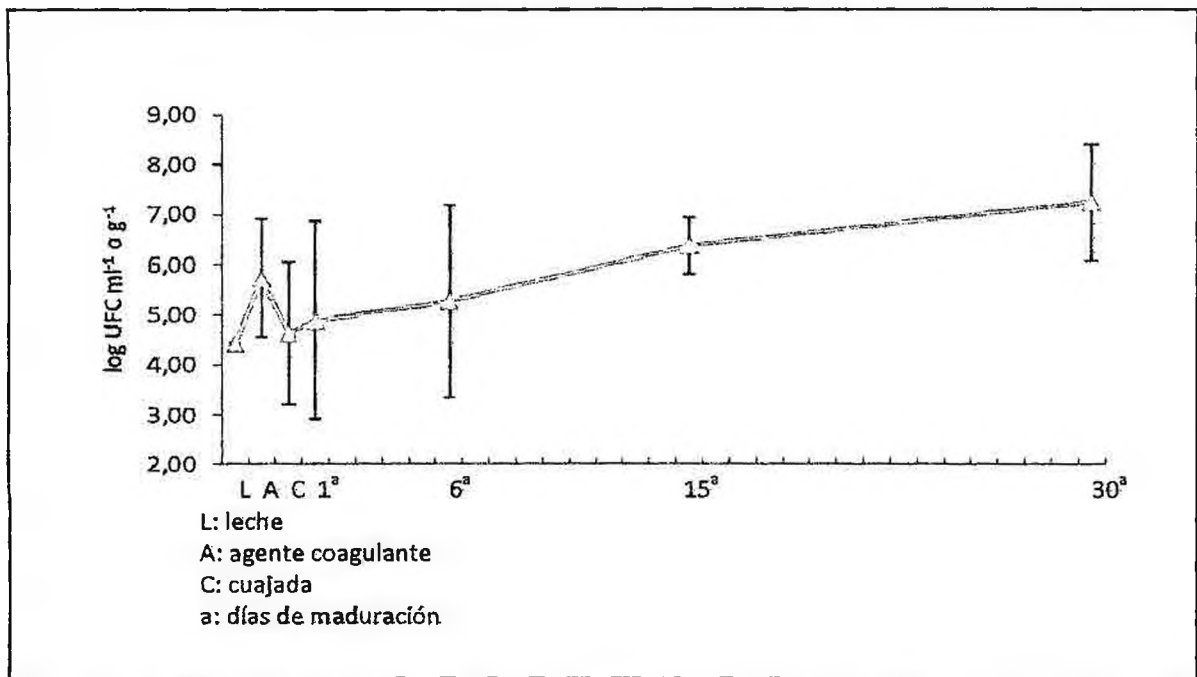


Figura 3.3. Cinética de crecimiento de levaduras durante la elaboración y maduración de Queso Artesanal de Corrientes en la estación primavera

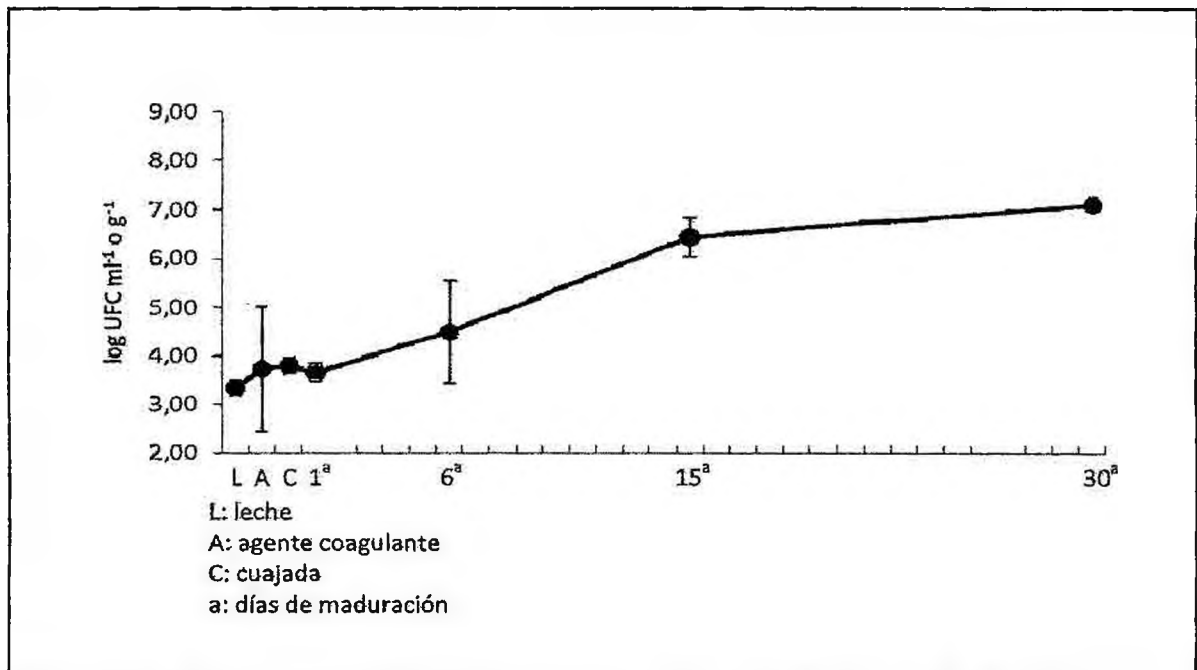


Figura 3.4. Cinética de crecimiento de levaduras durante la elaboración y maduración de Queso Artesanal de Corrientes en la estación verano

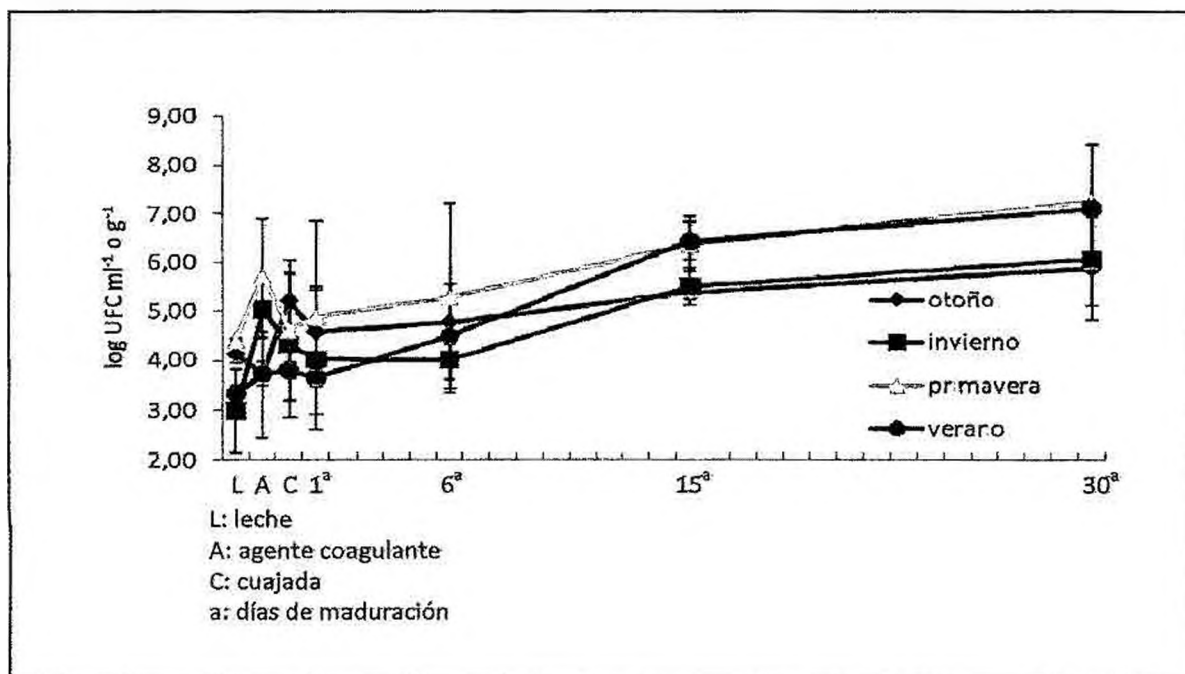


Figura 3.5 Cinética de crecimiento de levaduras durante la elaboración y maduración de Queso Artesanal de Corrientes

Cada perfil de evolución fue similar al comunicado por Vasek (2003), quién además detectó poblaciones superiores a la halladas en las elaboraciones correspondientes a las épocas más frías pero similares a las de las estaciones cálidas.

La microflora del queso constituye una comunidad compleja, característica acentuada cuando se trata de productos elaborados con leche cruda y agente coagulante artesanal, no comerciales. Las levaduras y mohos, usualmente empleados como indicadores higiénico-sanitarios, resultaron ser los grupos contaminantes mayoritarios encontrados en los estudios previos realizados por Vasek (2003) durante la elaboración de estos quesos. Las condiciones de anaerobiosis que se desarrollan en el interior del queso con el avance de la maduración probablemente permitieron la proliferación continua de la biota levaduriforme, la misma no se vio inhibida por los metabolitos producidos tanto por las bacterias lácticas propias de la leche cruda así como las del cultivo starter adicionado.

Al analizar los perfiles de crecimiento durante la maduración, se distinguen tres períodos en referencia a la velocidad de crecimiento:

a- *Primeros 6 días de maduración.* Las estaciones otoño, invierno y primavera muestran perfiles sustancialmente planos sin diferencias significativas entre los recuentos en quesos sin maduración y en los de 6 días. En cambio, en el verano la diferencia entre ellos es casi de un ciclo logarítmico, lo que evidencia un aumento marcado desde el primer día.

Los recuentos hallados en las materias primas durante la estación verano son inferiores en uno y dos ciclos logarítmicos respecto a los de las demás estaciones, con excepción del recuento hallado en la leche correspondiente a la estación invierno.

- *Del 6° al 15° día de maduración.* La velocidad correspondiente a las estaciones primavera, verano e invierno es francamente positiva con diferencias en ciclos logarítmicos que van desde 1 en primavera hasta 2 en verano, mientras que la de otoño es mucho menor.

c- *Desde el 15° hasta el 30° día de maduración.* Las curvas de las estaciones otoño e invierno se solapan al igual que las de primavera y verano. Ambas duplas, a su vez, presentan pendientes similares (Fig. 3.5).

La ocurrencia de levaduras en el transcurso de la elaboración y durante los primeros 15 días de maduración fue significativamente diferente ($P > 0,05$) en las distintas estaciones (ver anexo III).

Las mayores diferencias se observaron en las materias primas ($P > 0,05$). La carga microbiana presente en leche y agente coagulante correspondiente a las estaciones cálidas fue superior ($P > 0,05$) a la de las temporadas más frías, siendo la población del agente coagulante la que mostró mayor gradiente estacional.

Al comparar los recuentos en cada estación (ver anexo III) durante la maduración, se observó que:

Los recuentos correspondientes a los días 1 y 6 son diferentes ($P > 0,05$) para las cuatro estaciones.

A partir del 15° día de maduración, no existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre otoño e invierno, al igual que entre primavera y verano. Los recuentos de las estaciones cálidas superan en 1 ciclo logarítmico a los registrados en las épocas de menores temperaturas.

En la provincia de Corrientes no se diferencian marcadamente las cuatro estaciones climáticas, sino que podemos agrupar o diferenciar dos estaciones: una seca y fría, y otra húmeda de elevadas temperaturas. Esto explicaría la similitud de los perfiles en las dos estaciones frías y en las dos cálidas y húmedas, observada a partir de 15° día de maduración de los quesos.

Se aislaron 90 cepas de levaduras a partir de leche cruda, agente coagulante artesanal, cuajada y quesos de 1, 6, 15 y 30 días de maduración elaborados en las diferentes estaciones de otoño, invierno, primavera y verano.

De ellas, 9 provenían de muestras de leche y 28 de agente coagulante artesanal, 10 de cuajada y 43 de quesos a distintos períodos de maduración.

Los aislamientos obtenidos a partir de las diferentes muestras fueron codificados de la siguiente forma:

- Leche

Candida berta: 1L1I

Candida blankii: 2L1P

Candida santjacobensis (2 cepas): 3L2P, 4L3P

Candida shehatae: 5L1V

Candida tenuis: 6L2V

Cryptococcus albidus: 7L2I

Pichia spp.: 8L4P

Rhodotorula acuta: 9L3I

- Agente coagulante

Candida aaseri: 1A1O

Candida blankii (5 cepas): 2A2O, 3A3O, 4A4O, 5A5O, 6A6O

Candida silvicultrix o *shehatae*: 7A7O

Candida shehatae (3 cepas): 8A8O, 9A3V, 10A4V

Candida santjacobensis (6 cepas): 11A9O, 12A10O, 13A11O, 14A12O, 15A4P, 16A4I

Debaryomyces polymorphus (2 cepas): 17A13O, 18A6P

Debaryomyces vanrijiae (2 cepas): 19A14O, 20A15O

Myxozyma monticola (7 cepas): 21A16O, 22A17O, 23A18O, 24A19O, 25A20O, 26A21O, 27A7P

Pichia spp. (2 cepas): 28A5V, 29A5I

- Cuajada

Candida blankii: 1C6I

Candida santjacobensis: 2C7I

Cryptococcus albidus: 3C8P

Debaryomyces polymorphus (2 cepas): 4C21O, 5C6V

Debaryomyces vanrijiae: 6C7V

Myxozyma monticola: 7C8I

Pichia spp. (2 cepas): 8C9P, 9C8V

Stephanoascus ciferrii: 10C22O

- Queso de un día de maduración

Candida blankii (3 cepas): 1Q1/24O, 2Q1/10P, 3Q1/9V

Candida santjacobensis: 4Q1/25O

Debaryomyces polymorphus: 5Q1/26O

Debaryomyces vanrijiae (3 cepas): 6Q1/11P, 7Q1/10V, 8Q1/11V

Myxozyma monticola (2 cepas): 9Q1/9I, 10Q1/10I

Stephanoascus smithiae: 11Q1/11I

- Queso de seis días de maduración

Candida bertae: 1Q6/12P

Candida blankii (2 cepas): 2Q6/13P, 3Q6/12V

Candida shehatae (2 cepas): 4Q6/13V, 5Q6/14V

Cryptococcus albidus: 6Q6/12I

Debaryomyces polymorphus (2 cepas): 7Q6/27O, 8Q6/15V

Myxozyma monticola (3 cepas): 10Q6/28O, 11Q6/13I, 12Q6/14I

Pichia farinosa: 13Q6/16V

Stephanoascus smithiae: 14Q6/15P

- *Queso de quince días de maduración*
Candida blankii (5 cepas): 1Q15/29O, 2Q15/15I, 3Q15/20V, 4Q15/21V, 5Q15/22V
Candida shehatae (2 cepas): 6Q15/16P, 7Q15/23V
Cryptococcus albidus: 8Q15/17P
Myxozyma monticola: 9Q15/16I
Pichia spp.: 10Q15/17I
- *Queso de treinta días de maduración*
Candida blankii (2 cepas): 1Q30/18I, 2Q30/19P
Candida santjacobensis (2 cepas): 3Q30/20P, 4Q30/24V
Candida shehatae: 5Q30/25V
Debaryomyces polymorphus: 6Q30/19I
Myxozyma monticola (2 cepas): 7Q30/20I, 8Q30/21P
Pichia spp.: 9Q30/26V

3.3. Caracterización taxonómica de las cepas aisladas

3.3.1. Características morfológicas

Los géneros hallados mostraron un alto índice de coincidencia con las características morfológicas definitorias de su ubicación taxonómica (Kreger-van Rij, 1984; Barnett, 2000) descritas en el Anexo II.

3.3.2. Características fisiológicas

Las Tablas 3.5, 3.6 y 3.7 presentan los resultados obtenidos de diversas pruebas bioquímicas realizadas en cepas de levaduras aisladas durante la estación otoño.

Tabla 3.5. Asimilación y fermentación de compuestos carbonados en levaduras de la estación otoño

Especie	Cepa	Glucosa		Sacarosa		Galactosa		Lactosa		Maltosa		Rafinosa	
		A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
<i>Candida aaseri</i>	1A10	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Candida blankii</i>	2A20	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
	3A30	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
	4A40	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
	5A50	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
	6A60	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
	1Q1/240	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	1Q15/290	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Candida santjacobensis</i>	11A90	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
	12A100	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
	13A110	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
	14A120	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
	4Q1/250	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Candida shehatae</i>	8A80	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
<i>Candida spp.</i>	7A70	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	17A130	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	ND
	4C210	+	+	+	+	+	ND	+	ND	+	ND	+	ND
	5Q1/260	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
	7Q6/270	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	-	+	ND
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	19A140	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
	20A150	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	ND
<i>Myxozyma monticola</i>	21A160	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	ND
	22A170	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	ND
	23A180	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	ND
	24A190	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	25A200	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	10Q6/280	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	10C220	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

A: asimilación

F: fermentación

ND: no determinado

Tabla 3.6. Asimilación de compuestos carbonados en levaduras de la estación otoño

Especie	Cepa	Melibiosa	Arabinosa	Inositol	Eritritol	Ácido galacturónico
<i>Candida aaseri</i>	1A10	+	+	+	+	+
<i>Candida blankii</i>	2A20	+	+	+	+	+
	3A30	+	+	+	+	+
	4A40	+	+	+	+	+
	5A50	+	+	+	+	+
	6A60	+	+	+	+	+
	1Q1/24O	+	+	+	+	+
	1Q15/29O	+	+	+	+	+
	<i>Candida santjacobensis</i>	11A90	+	+	+	+
12A100		+	+	+	+	+
13A110		+	+	+	+	+
14A120		+	+	+	+	+
4Q1/25O		+	+	+	+	+
<i>Candida shehatae</i>	8A80	-	+	+	+	+
<i>Candida spp.</i>	7A70	+	+	+	+	+
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	17A130	+	+	+	+	+
	4C210	+	+	+	+	+
	5Q1/26O	-	-	-	-	-
	7Q6/27O	+	+	+	+	+
<i>Debaryomyces vanrijiae</i>	19A140	+	+	+	+	+
	20A150	+	+	+	+	+
<i>Myxozyma monticola</i>	21A160	+	+	+	+	+
	22A170	+	-	+	+	+
	23A180	+	-	+	+	+
	24A190	-	-	+	+	+
	25A200	+	-	+	+	+
	10Q6/28O	+	+	+	+	+
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	10C220	+	+	-	+	+

Tabla 3.7. Caracterización taxonómica en levaduras de la estación otoño

Especie	Cepa	Resistencia a cicloheximide 0,1 % (p/v)	Nitrato	Hidrólisis de urea	Medio libre de vitaminas	Manitol	Citrato
<i>Candida aaseri</i>	1A10	-	-	-	+	ND	+
<i>Candida blankii</i>	2A20	+	-	-	+	ND	ND
	3A30	+	-	-	+	ND	ND
	4A40	+	-	-	+	ND	ND
	5A50	+	-	-	+	ND	ND
	6A60	+	-	-	+	ND	ND
	1Q1/240	+	-	-	+	+	+
	1Q15/290	+	-	-	+	+	+
<i>Candida santjacobensis</i>	11A90	+	-	-	+	ND	ND
	12A100	+	-	-	+	ND	ND
	13A110	+	-	-	+	ND	ND
	14A120	+	-	-	+	ND	ND
	4Q1/250	-	-	-	-	-	-
<i>Candida shehatae</i>	8A80	+	-	-	+	+	-
<i>Candida spp.</i>	7A70	+	-	-	+	+	ND
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	17A130	+	-	-	+	+	ND
	4C210	+	-	-	+	+	-
	5Q1/260	+	-	-	+	+	-
	7Q6/270	+	-	-	+	+	-
<i>Debaryomyces vanriijae</i>	19A140	+	-	-	+	+	ND
	20A150	+	-	-	+	+	ND
<i>Myxozyma monticola</i>	21A160	-	-	-	+	ND	-
	22A170	-	-	-	+	ND	-
	23A180	-	-	-	+	ND	-
	24A190	-	-	-	+	ND	-
	25A200	-	-	-	+	ND	-
	10Q6/280	+	-	-	+	ND	-
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	10C220	-	-	-	+	+	-

ND: no determinado

Las diferentes cepas procedentes de la estación otoño mostraron, en general, una buena coincidencia con las características fisiológicas definitorias de su ubicación taxonómica. Sin embargo, se aprecia cierto grado de diversidad fenotípica entre cepas de una misma especie aisladas tanto del agente coagulante, como de la cuajada y los quesos, lo que era esperable dado que se trata de cepas salvajes. Las variaciones observadas en las características fisiológicas comprenden: asimilación y fermentación de compuestos carbonados en *Candida santjacobensis*, *Myxozyma monticola*, *Debaryomyces polymorphus* y *Debaryomyces vanriijiae*; resistencia a cicloheximide al 0,1 % (p/v) por cepas de los géneros *Candida* y *Myxozyma* (Tabla 3.7).

Las Tablas 3.8, 3.9 y 3.10 presentan los resultados de las pruebas correspondientes a las cepas de levaduras aisladas durante la estación invierno.

Tabla 3.8. Asimilación y fermentación de compuestos carbonados en levaduras de la estación invierno

Especie	Cepa	Glucosa		Sacarosa		Galactosa		Lactosa		Maltosa		Rafinosa	
		A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
<i>Candida bertae</i>	1L1I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Candida blankii</i>	1C6I	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	ND
	2Q15/15I	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>Candida santjacobensis</i>	16A4I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	2C7I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
<i>Candida shehatae</i>	5Q30/18I	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	7L2I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	6Q6/12I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Myxozyma monticola</i>	7C8I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	9Q1/9I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10Q1/10I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	11Q6/13I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
	12Q6/14I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	9Q15/16I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	7Q30/19I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	ND
	8Q30/20I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Pichia spp.</i>	28A5I	+	+	+	+	+	-	+	ND	+	+	+	+
	10Q15/17I	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Rhodotorula acuta</i>	9L3I	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stephanoascus smithiae</i>	11Q1/11I	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

A: asimilación

F: fermentación

ND: no determinado

Tabla 3.9. Asimilación de compuestos carbonados en levaduras de la estación invierno

Especie	Cepa	Melibiosa	Arabinosa	Inositol	Eritritol	Ácido galacturónico
<i>Candida bertae</i>	1L1I	+	+	+	+	+
<i>Candida blankii</i>	1C6I	+	+	+	+	+
	2Q15/15I	+	+	+	+	+
<i>Candida santjacobensis</i>	16A4I	+	+	+	+	+
	2C7I	-	+	+	+	+
<i>Candida shehatae</i>	5Q30/18I	+	+	+	+	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	7L2I	+	+	+	+	+
	6Q6/12I	+	+	+	+	+
<i>Myxozyma monticola</i>	7C8I	+	+	+	+	+
	9Q1/9I	+	+	+	+	+
	10Q1/10I	+	+	+	+	+
	11Q6/13I	+	+	+	+	+
	12Q6/14I	+	+	+	+	+
	9Q15/16I	+	+	+	+	+
	7Q30/19I	+	+	+	+	+
	8Q30/20I	+	+	+	+	+
<i>Pichia</i> spp.	28A5I	+	+	+	+	+
	10Q15/17I	+	+	+	+	+
<i>Rhodotorula acuta</i>	9L3I	+	-	-	+	-
<i>Stephanoascus smithiae</i>	11Q1/11I	+	+	+	+	+

Tabla 3.10. Caracterización taxonómica en levaduras de la estación invierno

Especie	Cepa	Resistencia a cicloheximide 0,1 % (p/v)	Nitrato	Hidrólisis de urea	Medio libre de vitaminas	Manitol	Citrato
<i>Candida bertae</i>	1L1I	+	+	-	+	+	+
<i>Candida blankii</i>	1C6I	+	-	-	+	ND	-
	2Q15/15I	+	-	-	+	+	-
<i>Candida santjacobensis</i>	16A4I	+	-	-	+	+	-
	2C7I	-	-	-	+	ND	-
<i>Candida shehatae</i>	5Q30/18I	+	-	-	+	+	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	7L2I	-	+	-	+	+	-
	6Q6/12I	-	+	-	+	+	-
<i>Myxozyma monticola</i>	7C8I	-	+	-	+	ND	-
	9Q1/9I	-	+	-	+	ND	-
	10Q1/10I	-	+	-	+	ND	-
	11Q6/13I	+	+	-	+	ND	-
	12Q6/14I	-	+	-	+	ND	-
	9Q15/16I	-	+	-	+	ND	-
	7Q30/19I	-	+	-	+	ND	-
	8Q30/20I	-	+	-	+	ND	-
<i>Pichia spp.</i>	28A5I	+	+	-	+	+	-
	10Q15/17I	+	+	-	+	+	-
<i>Rhodotorula acuta</i>	9L3I	-	-	+	-	+	-
<i>Stephanoascus smithiae</i>	11Q1/11I	+	+	-	+	+	-

ND: no determinado

Los aislamientos correspondientes a la estación invierno también evidenciaron un alto índice de coincidencia con las características fisiológicas definitorias de su ubicación taxonómica. Se apreciaron asimismo variaciones en algunas características fisiológicas en cepas aisladas de agente coagulante, cuajada y quesos: asimilación y fermentación de compuestos carbonados por cepas pertenecientes a los géneros *Candida* y *Pichia*; resistencia a cicloheximide a 0,1 % (p/v) en cepas de *Candida santjacobensis* y *Myxozyma monticola* (Tabla 3.10).

Las Tablas 3.11, 3.12 y 3.13 presentan los resultados de las pruebas de identificación efectuadas en las cepas de levaduras aisladas durante la estación primavera.

Tabla 3.11. Asimilación y fermentación de compuestos carbonados en levaduras de la estación primavera

Especie	Cepa	Glucosa		Sacarosa		Galactosa		Lactosa		Maltosa		Rafinosa	
		A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
<i>Candida bertae</i>	1Q6/12P	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Candida blankii</i>	2L1P	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	2Q1/10P	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	2Q6/13P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	1Q30/19P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida santjacobensis</i>	3L2P	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	4L3P	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	15A5P	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	3Q30/20P	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Candida shehatae</i>	6Q15/16P	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	3C8P	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	8Q15/17P	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	18A6P	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Debaryomyces vanrijliae</i>	6Q1/11P	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-
<i>Myxozyma monticola</i>	26A7P	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Pichia</i> spp.	8L4P	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
	8C9P	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
	9Q30/21P	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Stephanoascus smithiae</i>	14Q6/15P	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

A: asimilación

F: fermentación

Tabla 3.12. Asimilación de compuestos carbonados en levaduras de la estación primavera

Especie	Cepa	Melibiosa	Arabinosa	Inositol	Eritritol	Ácido galacturónico
<i>Candida bertae</i>	1Q6/12P	+	+	+	+	+
<i>Candida blankii</i>	2L1P	+	+	+	+	+
	2Q1/10P	+	+	+	+	+
	2Q6/13P	-	+	+	+	-
	1Q30/19P	-	+	+	+	-
<i>Candida santjacobensis</i>	3L2P	-	+	+	+	+
	4L3P	+	+	+	+	+
	15A5P	+	+	+	+	-
	3Q30/20P	+	+	+	+	-
<i>Candida shehatae</i>	6Q15/16P	-	+	-	+	+
<i>Cryptococcus albidus</i>	3C8P	+	+	+	+	+
	8Q15/17P	+	+	+	+	+
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	18A6P	+	+	+	+	-
<i>Debaryomyces vanrijsiae</i>	6Q1/11P	+	+	+	+	-
<i>Myxozyma monticola</i>	26A7P	+	+	+	+	+
<i>Pichia</i> spp.	8L4P	+	+	+	+	+
	8C9P	+	+	+	+	+
	9Q30/21P	+	+	+	+	+
<i>Stephanoascus smithiae</i>	14Q6/15P	+	+	+	-	+

Tabla 3.13. Caracterización taxonómica en levaduras de la estación primavera

Especie	Cepa	Resistencia a cicloheximide 0,1 % (p/v)	Nitrato	Hidrólisis de urea	Medio libre de vitaminas	Manitol	Citrato
<i>Candida bertae</i>	1Q6/12P	+	+	-	+	+	-
<i>Candida blankii</i>	2L1P	+	-	-	+	+	-
	2Q1/10P	+	-	-	+	+	-
	2Q6/13P	+	-	-	+	+	-
	1Q30/19P	+	-	-	+	+	-
<i>Candida santjacobensis</i>	3L2P	+	-	-	+	+	-
	4L3P	+	-	-	+	+	-
	15A5P	+	-	-	+	+	-
	3Q30/20P	+	-	-	+	+	-
<i>Candida shehatae</i>	6Q15/16P	+	-	-	+	-	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	3C8P	+	+	-	+	+	-
	8Q15/17P	-	+	-	+	+	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	18A6P	+	-	-	+	+	-
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	6Q1/11P	+	-	-	+	+	-
<i>Myxozyma monticola</i>	26A7P	-	-	-	+	+	-
<i>Pichia</i> spp.	8L4P	+	+	-	+	+	-
	8C9P	+	+	-	+	+	-
	9Q30/21P	+	-	-	+	+	-
<i>Stephanoascus smithiae</i>	14Q6/15P	+	+	-	+	+	-

ND: no determinado

Las Tablas 3.14, 3.15 y 3.16 presentan los resultados de las pruebas de identificación en cepas de levaduras aisladas durante la estación verano.

Tabla 3.14. Asimilación y fermentación de compuestos carbonados en levaduras de la estación verano

Especie	Cepa	Glucosa		Sacarosa		Galactosa		Lactosa		Maltosa		Rafinosa	
		A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F
<i>Candida blankii</i>	3Q1/9V	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
	3Q6/12V	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
	3Q15/20V	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
	4Q15/21V	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
	5Q15/22V	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	2Q30/24V	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>Candida santjacobensis</i>	4Q30/25V	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Candida shehatae</i>	5L1V	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	9A3V	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10A4V	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
	4Q6/13V	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
	5Q6/14V	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
	7Q15/23V	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Candida tenuis</i>	6L2V	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	5C6V	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	8Q6/15V	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	6Q30/26V	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	6C7V	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
	7Q1/10V	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
	8Q1/11V	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Pichia farinosa</i>	13Q6/16V	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Pichia spp.</i>	27A5V	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	9C8V	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

A: asimilación
F: fermentación

Tabla 3.15. Asimilación de compuestos carbonados en levaduras de la estación verano

Especie	Cepa	Melibiosa	Arabinosa	Inositol	Eritritol	Ácido galacturónico
<i>Candida blankii</i>	3Q1/9V	+	+	+	+	+
	3Q6/12V	+	+	+	+	+
	3Q15/20V	+	+	+	+	+
	4Q15/21V	-	-	+	+	+
	5Q15/22V	+	+	+	+	+
	2Q30/24V	+	+	+	+	+
<i>Candida santjacobensis</i>	4Q30/25V	+	+	+	+	+
<i>Candida shehatae</i>	5L1V	+	+	+	+	-
	9A3V	+	+	+	+	-
	10A4V	+	+	+	+	+
	4Q6/13V	+	+	+	+	-
	5Q6/14V	+	+	-	+	-
	7Q15/23V	+	+	+	+	-
<i>Candida tenuis</i>	6L2V	+	+	-	-	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	5C6V	+	+	+	+	+
	8Q6/15V	+	+	+	+	-
	6Q30/26V	+	+	+	+	-
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	6C7V	+	+	+	+	-
	7Q1/10V	+	+	+	+	+
	8Q1/11V	+	+	+	+	+
<i>Pichia farinosa</i>	13Q6/16V	-	-	+	+	+
<i>Pichia</i> spp.	27A5V	+	+	+	+	-
	9C8V	+	+	+	+	+

por cepas de *Candida shehatae*, *Debaryomyces vanriijae* y *Cryptococcus albidus* (Tablas 3.13 y 3.16).

Con excepción de dos cepas de *Candida bertae* (1L11, 1Q6/12P), todas las demás cepas pertenecientes al género *Candida* fueron nitrato negativas, estos resultados son concordantes con las características bioquímicas definitorias de su especie y coinciden con los hallados por Pereira-Días *et al.* (2000) en quesos tradicionales semiduros elaborados con leche cruda. Sin embargo, Besañon *et al.* (1992) encontraron que la asimilación de nitrato era una característica preponderante en levaduras también aisladas de quesos, pertenecientes en su mayoría al género *Candida*, aunque esta característica dificultara la definición de especie.

En las Figs. 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9 se observa la distribución porcentual de los distintos géneros aislados a partir de leche, agente coagulante, cuajadas y quesos artesanales.

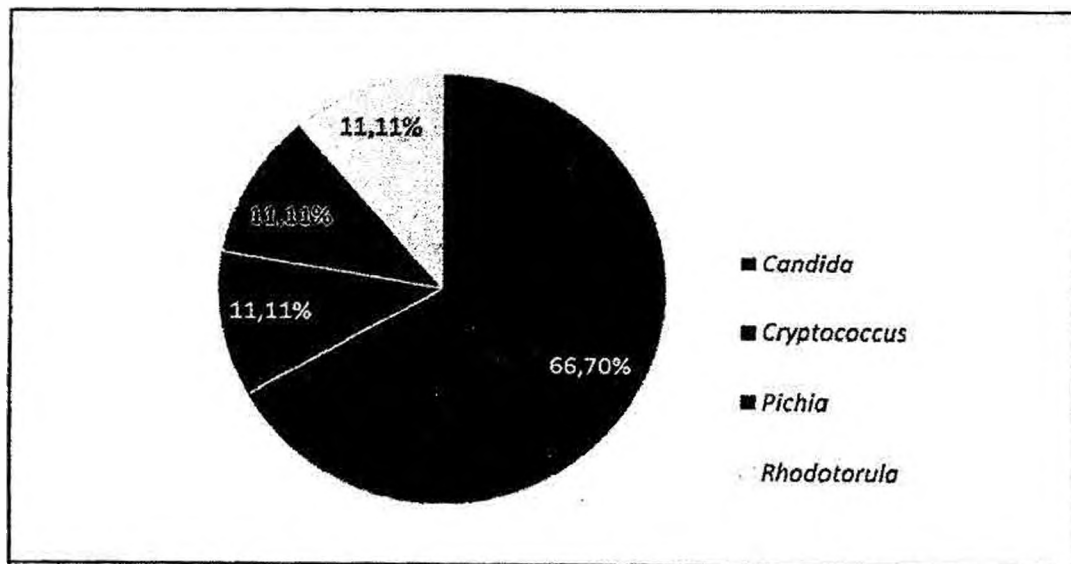


Figura 3.6. Géneros de levaduras aislados de muestras de leche

En las cepas aisladas de leche predominó el género *Cándida* (66,7 %). Se aislaron también levaduras pertenecientes a los géneros *Pichia*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula* en menor proporción.

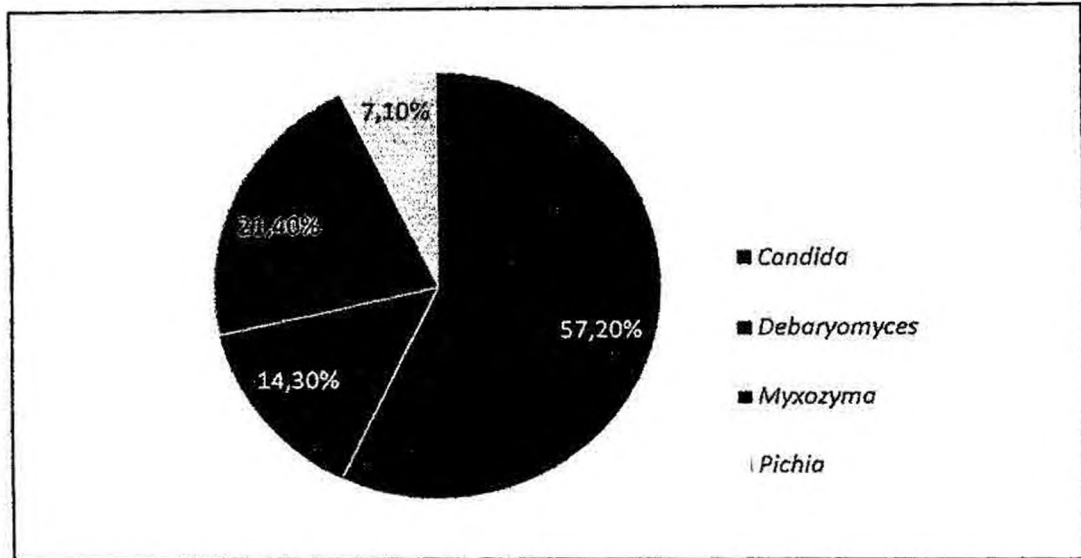


Figura 3.7. Géneros de levaduras aislados de agente coagulante

En el agente coagulante el género *Candida* (57,20 %) también constituyó el grupo dominante. Se destaca en segundo orden el género *Myxozyma* (21,4 %) y también cepas de levaduras pertenecientes al género *Debaryomyces* en proporciones significativas (14,3 %).

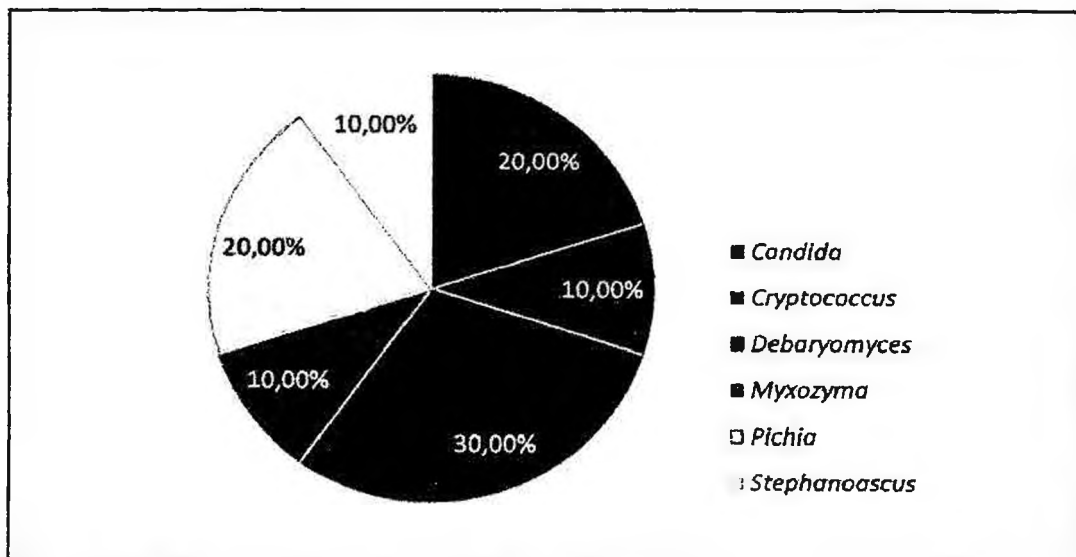


Figura 3.8. Géneros de levaduras aislados de cuajada

A diferencia de las materias primas, en la cuajada se observó una prevalencia del género *Debaryomyces*. En segundo lugar se ubicaron *Candida* y *Pichia*. Además, en estas muestras se aislaron cepas del género *Stephanoascus*, no hallado en las materias primas,

en igual proporción que otros dos géneros aislados en estas muestras, *Cryptococcus* y *Myxozyma*.

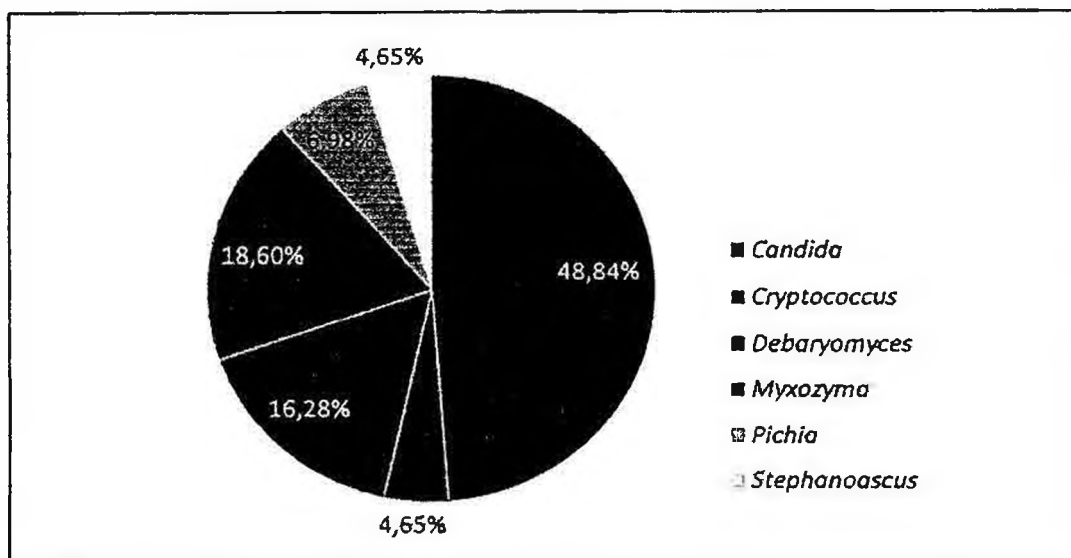


Figura 3.9. Géneros de levaduras aislados en queso

En los quesos a distintos períodos de maduración se ubicaron los mismos géneros hallados en leche, agente coagulante y cuajada, con excepción del género *Rhodotorula* que solo se encontró en muestras de leche. Se observa también un alto porcentaje del género *Candida* (48,8 %), seguido en orden de importancia por *Myxozyma* (18,6 %) y *Debaryomyces* (16,3 %), presentando el mismo orden decreciente de frecuencias que el agente coagulante con porcentajes muy similares.

En la Tabla 3.17 se observa la distribución de las diferentes especies de levaduras aisladas de las materias primas, cuajadas y quesos a distintos períodos de maduración.

Tabla 3.17. Origen de las especies de levaduras aisladas durante la elaboración y maduración de QAC

Especie Identificada	Origen de las especies (%)							Total (n=90)
	leche (n = 9)	agente coagulante (n = 28)	Cuajada (n = 10)	queso1 ^a (n=11)	queso6 ^a (n=13)	queso15 ^a (n=10)	queso30 ^a (n=9)	
<i>Candida aaseri</i>	0	3,6	0	0	0	0	0	1,1
<i>Candida bertae</i>	11,1	0	0	0	7,7	0	0	2,2
<i>Candida blankii</i>	11,1	17,9	10,0	27,3	15,4	50,0	22,2	21,1
<i>Candida santjacobensis</i>	22,2	21,4	10,0	9,1	0	0	22,2	12,2
<i>Candida shehatae</i>	11,1	10,7	0	0	15,4	20,0	11,1	10,0
<i>Candida tenuis</i>	11,1	0	0	0	0	0	0	1,1
<i>Candida spp.</i>	0	3,6	0	0	0	0	0	1,1
<i>Cryptococcus albidus</i>	11,1	0	10,0	0	7,7	10,0	0	4,4
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	0	7,1	20,0	9,09	15,4	0	11,1	8,9
<i>Debaryomyces vanrijsiae</i>	0	7,1	10,0	27,3	0	0	0	6,7
<i>Myxozyma monticola</i>	0	21,4	10,0	18,2	23,1	10,0	22,2	17,8
<i>Pichia farinosa</i>	0	0	0	0	7,7	0	0	1,1
<i>Pichia spp.</i>	11,1	7,1	20,0	0	0	10,0	11,1	7,8
<i>Stephanoascus ciferrli</i>	0	0	10,0	0	0	0	0	1,1
<i>Stephanoascus smithiae</i>	0	0	0	9,09	7,69	0	0	2,2
<i>Rhodotorula acuta</i>	11,1	0	0	0	0	0	0	1,1
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

a días de maduración

Las especies más abundantes en las muestras de materias primas y quesos a distintos períodos de maduración fueron: *Candida blankii* (21,1 %), *Myxozyma monticola* (17,8 %), *Candida santjacobensis* (12,2 %) y *Candida shehatae* (10,0 %). Otras cepas de levaduras menos frecuentemente encontradas pertenecen a *Cryptococcus albidus* y diferentes especies de los géneros *Pichia* y *Debaryomyces* (4,4 – 8,9 %).

Sin embargo, la distribución de especies de levaduras a largo de la maduración de los quesos no fue constante. *Candida blankii* fue la única presente en ambas materias primas y en todas las muestras de quesos a distintos períodos de maduración, presentando un incremento en la frecuencia de aislamiento con el tiempo de maduración. La cual osciló entre 10,0 % en cuajada y 50,0 % en muestras de quesos de 15 días de maduración. Esta especie de levadura fue aislada por Welthagen y Viljoen (1999) en la superficie de equipos empleados para la manufactura de queso Cheddar elaborado en la región de Cape Province en Sudáfrica.

Candida santjacobensis tiene su origen en la leche y el agente coagulante, hallándose presente en la cuajada y en quesos de un día de maduración. En quesos de 6 días ya no está presente, pero se logró aislarla a partir de quesos con 30 días de maduración, lo que implica que las condiciones presentes en el interior de los mismos propician su crecimiento. *Candida shehatae* también se aisló de leche y agente coagulante, a diferencia de la especie anterior no se encontró en cuajada ni en muestras de quesos de un día, sin embargo, también se detectó su presencia a partir de los seis días de estacionamiento de los quesos. *Myxozyma monticola* estuvo presente tanto en la cuajada como en las muestras de quesos a lo largo de toda la maduración, con frecuencias de aislamientos relativamente constantes, entre 10,0 y 23,1 %. Esta especie no se la aisló de leche pero fue una de las más frecuentes en el agente coagulante (21,4 %), por lo tanto sería éste el origen de la misma.

La especie *Debaryomyces vanriijiae* aislada durante la elaboración casearia, no fue hallada al avanzar el tiempo de maduración. En cambio, *Debaryomyces polymorphus* se mantuvo con frecuencias variables hasta el final de la misma. Asimismo, el aislamiento de escasos representantes de la especie *Debaryomyces vanriijiae* de la superficie del

equipamiento empleado en la elaboración de quesos fueron también informados por otros autores (Viljoen y Greyling, 1995).

Cryptococcus albidus es una especie hallada, desde hace tiempo, en productos lácteos como cremas (Fleet *et al.*, 1987; Garrison, 1959) y leches provenientes de vacas afectadas por mastitis (Machota *et al.*, 1987). Más recientemente otros autores (Viljoen y Greyling, 1995) la encontraron entre las especies más frecuentes en quesos Cheddar y Gouda. Sin embargo, en los QAC no evidenció porcentajes de aislamiento superiores al 11,1 % con una permanencia discontinua hasta los 15 días de maduración.

De la misma manera, cepas de levaduras pertenecientes al género *Pichia* fueron aisladas del agente coagulante, la leche empleada en la elaboración, la cuajada y quesos en los diferentes períodos de maduración pero con frecuencias inferiores a los géneros antes mencionados. Entre las siete cepas halladas de levaduras, pertenecientes al género *Pichia*, sólo fue posible clasificar una cepa a nivel de especie: *Pichia farinosa*, aislada de quesos de seis días de maduración.

Por otra parte, *Candida tenuis* y *Rhodotorula acuta* sólo se aislaron en leche, estando ausente en los quesos. Igual comportamiento se detectó con la especie *Candida aaseri*, sólo aislada del agente coagulante. En referencia a los representantes del género *Rhodotorula*, normalmente son recuperados en bajos números (López-Díaz *et al.*, 1995). Su origen está relacionado a la contaminación aérea (Tudor y Board, 1993) y su ausencia en los quesos madurados es probablemente debida a su baja resistencia a la disminución de la actividad de agua (a_w) y a su metabolismo estrictamente aerobio. Pereira-Dias *et al.* (2000), en otro tipo de quesos hallaron resultados similares, aislando cepas de este género sólo de la cuajada.

Las especies *Stephanoascus ciferrii* y *Stephanoascus smithiae*, a pesar de no estar presentes en las materias primas, fueron aisladas a partir de la cuajada y de muestras de quesos de uno y seis días de maduración, aunque con frecuencias inferiores (7,7 – 10,0 %) a las demás especies halladas. El origen de estas especies podría ser la contaminación aérea del establecimiento elaborador dada su ausencia en la leche y el agente coagulante.

De lo expuesto se deducen los géneros y las especies presentes en las materias primas y a lo largo de la maduración del Queso Artesanal de Corrientes. Los predominios

observados en los quesos coinciden con los hallados en las materias primas, siendo el género *Candida* el más frecuente, seguido en orden de importancia por *Myxozyma* y *Debaryomyces*. Otros géneros como *Cryptococcus*, *Pichia* y *Stephanoascus* resultaron poco significativos.

Se infiere que el origen de casi todos los géneros hallados serían las materias primas empleadas:

- la leche cruda de vaca recién ordeñada o almacenada bajo refrigeración durante un tiempo máximo de 24 h.
- el agente coagulante artesanal, suero obtenido de leche cruda coagulada por acción del cuajo: cuarto estómago de ternero salado, en una proporción de una parte de sal cada dos partes de tejido, y secado a temperatura ambiente.

La leche cruda y el agente coagulante difieren en su ecología, la flora de levaduras típica de cada uno de ellos constituiría un rasgo característico de los mismos.

Podríamos afirmar que cada materia prima aporta a los quesos una microbiota específica de levaduras adaptada al nicho ecológico de la región y a las condiciones del medio particular de cada una.

Al comparar los géneros y las especies halladas en el Queso Artesanal de Corrientes con los informados para leches y productos lácteos elaborados en otras regiones del país se aprecian ciertas similitudes, particularmente en lo que se refiere a la elevada incidencia de los géneros *Debaryomyces* y *Candida* y a sus especies dominantes. También se observan semejanzas en cuanto a la presencia, menos significativa, de otros dos géneros: *Cryptococcus* y *Pichia*.

Las especies predominantes o únicas halladas en Corrientes resultaron similares a las encontradas en Tandil: *Candida blankii* y *Myxozyma monticola*. En cambio, en Trelew, la presencia de *C. blankii* coincide como una de las especies dominantes, pero acompañada en iguales proporciones por *C. famata* (Carrasco *et al.*, 2006; Baraggio *et al.*, 2008).

Por otra parte, se observan diferencias notables, tales como la presencia destacada de representantes del género *Brettanomyces* en leche y productos lácteos elaborados en la cuenca lechera santafesina (Carrasco *et al.*, 2006; Baraggio *et al.*, 2008), mientras que

no se halló ningún representante de este género durante la elaboración y maduración del QAC.

Al realizar igual comparación con los resultados publicados para distintas variedades de quesos elaborados en Europa, se aprecia también una coincidencia respecto de la presencia significativa de los géneros *Candida* y *Debaryomyces* junto con la menor frecuencia de los géneros *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Pichia* (Besançon *et al.*, 1992; Pereira-Dias *et al.*, 2000; Corbo *et al.*, 2001). Sin embargo, la ausencia total de representantes de los géneros *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, de alta prevalencia en los quesos europeos (Seiler y Busse, 1990; Valdés-Stauber *et al.*, 1997; Romano *et al.*, 2001), marca también notables diferencias con el QAC. La presencia de otros géneros, *Strophanoascus* y *Myxozyma* no informados por estos autores (Seiler y Busse, 1990; Besançon *et al.*, 1992; Valdés-Stauber *et al.*, 1997; Pereira-Dias *et al.*, 2000; Corbo *et al.*, 2001; Romano *et al.*, 2001) acentúa las disimilitudes.

Este hecho sugiere que la composición de la flora de levaduras presente en quesos difiere de acuerdo con el país y la región de producción.

3.4. Caracterización tecnológica de las cepas aisladas

3.4.1. Respuesta a distintos valores de pH y temperatura

En la Tabla 3.18 se presentan los resultados obtenidos expresados como porcentaje de los aislamientos que mostraron desarrollo positivo en cada uno de los géneros encontrados a distintos valores de pH y temperatura.

Tabla 3.18. Respuesta a los distintos valores de pH y Temperatura (expresado como porcentaje del total de los aislamientos en cada uno de los géneros)

Género	pH			Temperatura		
	4,7	5,2	5,5	5 °C	18 °C	37 °C
LECHE						
<i>Candida</i> (6)	100	100	100	50	100	83
<i>Cryptococcus</i> (1)	100	100	100	ND	ND	100
<i>Pichia</i> (1)	100	100	100	ND	ND	100
<i>Rhodotorula</i> (1)	100	100	100	ND	ND	100
AGENTE COAGULANTE						
<i>Candida</i> (15)	100	100	100	93	93	93
<i>Debaryomyces</i> (4)	100	100	100	100	100	100
<i>Myxozyma</i> (7)	100	100	100	100	100	100
<i>Pichia</i> (2)	100	100	100	100	100	100
CUAJADA						
<i>Candida</i> (2)	100	100	100	100	100	0
<i>Cryptococcus</i> (1)	100	100	100	100	100	100
<i>Debaryomyces</i> (3)	100	100	100	100	100	100
<i>Myxozyma</i> (1)	100	100	100	100	100	100
<i>Pichia</i> (2)	100	100	100	100	100	100
<i>Stephanoascus</i> (1)	100	100	100	100	100	100
QUESOS						
<i>Candida</i> (21)	100	100	100	71	95	86
<i>Cryptococcus</i> (2)	100	100	100	50	100	0
<i>Debaryomyces</i> (7)	100	100	100	85	100	100
<i>Myxozyma</i> (8)	100	100	100	100	100	100
<i>Pichia</i> (3)	100	100	100	100	100	100
<i>Stephanoascus</i> (2)	100	100	100	100	100	100

{): número de cepas

ND: no determinado

Todas las cepas de levaduras aisladas fueron capaces de desarrollar en el rango de pH (4,7 – 5,5) ensayado. Estos resultados coinciden con los informados por otros autores en quesos Danablu de origen europeo (van de Tempel y Jacobsen, 1998) y en distintas variedades de quesos de la provincia de Santa Fe (Baraggio, 2000).

Una de las propiedades que suelen presentar las levaduras aisladas de productos lácteos es su tolerancia a la acidez (Viljoen, 1998; Gardini *et al.*, 2006) siendo ésta una de las características que permiten su crecimiento en las condiciones de elaboración casearia (Rossi *et al.*, 1998).

Debido a que el clima de la provincia de Corrientes, en la época de mayor producción quesera, se caracteriza por ser cálido con temperaturas muy elevadas, al momento de elegir la temperatura de incubación tanto para el aislamiento como para las demás pruebas se seleccionó la de 30 °C y no una más baja, previendo que las cepas de levaduras autóctonas estarían más bien adaptadas a climas cálidos. Además se realizaron aislamientos en las diferentes estaciones climáticas a fin de estudiar las posibles variaciones estacionales.

La mayoría de las cepas de levaduras estudiadas fueron capaces de desarrollar a las diferentes temperaturas ensayadas. Todas las cepas crecieron a 18 °C, con excepción de dos cepas aisladas en la estación otoño, *Candida santjacobensis* (11A90) aislada de agente coagulante y *Candida shehatae* (5Q30/18I) aislada de queso con 30 días de maduración.

A la temperatura de 37 °C no crecieron 9 cepas pertenecientes a los géneros *Candida* y *Cryptococcus*: una cepa *Candida tenuis* (6L2V) aislada de leche; tres cepas (3A30, 1C6I, 4Q15/21V) de *Candida blankii* aisladas de agente coagulante, cuajada y quesos; una cepa (1C6I) de *Candida santjacobensis* aislada de cuajada; dos cepas de *Candida shehatae* (5Q30/18I, 6Q15/16P) y dos cepas de *Cryptococcus albidus* (8Q15/17P, 6Q6/12I) aisladas de quesos. Los porcentajes encontrados fueron similares (Cosentino *et al.*, 2001) e incluso superiores (Suzzi *et al.*, 2003) a los informados por otros autores para levaduras aisladas de diferentes variedades de quesos europeos.

Se evaluó también, el crecimiento de levaduras a 5 °C. Se eligió este valor debido a que muchos quesos son madurados a bajas temperaturas, incluido el QAC, y es conocido (Devoyod, 1990; Fleet, 1990; Fleet, 1992; Jacobsen y Narvhus, 1996, Welthagen y Viljoen, 1999; Rossi *et al.*, 1998; Gardini *et al.*, 2006) el hecho de que una de las propiedades que les permitiría a las levaduras desarrollar en quesos a lo largo de la maduración es su resistencia a bajas temperaturas.

Al ensayar esta temperatura se observó que sólo 12 cepas pertenecientes a los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Debaryomyces* no fueron capaces de desarrollar a 5 °C: cuatro cepas de *Candida blankii* (2Q1/10P, 3Q1/9V, 5Q15/22V, 1Q30/19P) aisladas de quesos elaborados en estaciones cálidas; tres de *Candida shehatae* (5L1V, 5Q6/14V,

6Q15/16P) , dos cepas (3L2P, 4L3P) de *Candida santjacobensis* y una de *Cryptococcus albidus* (8Q15/17P), aisladas de muestras de leches y quesos durante el período primavera-verano; una cepa de *Debaryomyces polymorphus* (5Q1/26O) y una cepa (7A7O) de *Candida* spp., ambas aisladas de queso y agente coagulante en el otoño.

Estos resultados evidenciaron que:

- de la tres temperaturas de crecimiento estudiadas, 5 °C fue la que presentó el menor porcentaje de crecimiento comparado con los observados para las otras temperaturas, lo que era previsible dadas las características climáticas de la provincia de Corrientes. Sin embargo, estos porcentajes no resultaron ser bajos y muy por el contrario son comparables con los hallados por otros autores en levaduras aisladas de otras variedades de quesos del país y de Europa (van de Tempel y Jacobsen, 1998; Baraggio, 2000; Cosentino *et al.*, 2001; Corbo *et al.*, 2001).
- de las 12 cepas de levaduras que no desarrollaron a 5 °C, 10 fueron aisladas en las estaciones de primavera y verano, lo que confirmaría la presunción de que las características de las cepas estaría influenciada o determinada por el medio externo o por las condiciones ambientales donde ellas habitan. Además, al comparar los porcentajes entre los diferentes orígenes de las cepas, fueron los cultivos aislados de leche los que presentaron los porcentajes más bajos, lo que resulta lógico dado que muchas elaboraciones se realizan con leche recién ordeñada sin exponerse a temperaturas de refrigeración.
- las distintas respuestas a las variaciones de temperatura entre cepas de una misma especie demuestran claramente que existen diferencias significativas a nivel de cepa. Resultados similares han sido informados por otros autores (van de Tempel y Jacobsen, 1998).

Los resultados expuestos en este punto, evidencian la capacidad de las cepas de levaduras estudiadas para crecer y desarrollarse en las condiciones de pH y temperatura reinantes durante la elaboración y maduración del Quesos Artesanal de Corrientes.

Asimismo, demuestran el efecto de selección de las condiciones climáticas sobre las propiedades tecnológicas propias de las cepas.

3.4.2. Respuesta a distintos valores de concentración de ácido láctico y lactosa

En las Tablas 3.19, 3.20, 3.21 y 3.22 se presentan los resultados de la capacidad de asimilación de diferentes concentraciones de ácido láctico y lactosa en cepas de levaduras aisladas de leche, cuajada, agente coagulante y quesos respectivamente.

Tabla 3.19. Asimilación de ácido láctico y lactosa en cepas de levaduras aisladas de leche cruda empleada en la elaboración de QAC

Género y especie	Cepa	Ácido láctico			Lactosa		
		1%	2%	3%	1%	2%	3%
<i>Candida bertae</i>	1L1I	+	+	+	+	+	+
<i>Candida blankii</i>	2L1P	+	+	+	+	+	+
<i>Candida santjacobensis</i>	3L2P	+	+	+	+	+	+
	4L3P	+	+	+	+	+	+
<i>Candida shehatae</i>	5L1V	-	-	-	+	+	+
<i>Candida tenuis</i>	6L2V	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus albidus</i>	7L2I	-	-	-	+	+	+
<i>Pichia spp.</i>	8L4P	+	+	+	+	+	+
<i>Rhodotorula acuta</i>	9L3I	-	-	-	ND	ND	ND

ND: no determinado

Tabla 3.20. Asimilación de ácido láctico y lactosa en cepas de levaduras aisladas de cuajada

Género y especie	Cepa	Ácido láctico			Lactosa		
		1%	2%	3%	1%	2%	3%
<i>Candida blankii</i>	1C6I	+	+	+	+	+	+
<i>Candida santjacobensis</i>	2C7I	+	+	+	+	-	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	3C8P	+	+	+	+	+	+
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	4C21O	+	+	+	+	+	+
	5C6V	+	+	+	+	+	+
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	6C7V	+	+	-	+	+	+
<i>Myxozyma monticola</i>	7C8I	+	+	+	+	+	+
<i>Pichia spp.</i>	8C9P	+	+	+	+	+	+
	9C8V	+	-	-	+	+	+
<i>Stephanoascus ciferri</i>	10C22O	+	+	+	+	+	+

Tabla 3.21. Asimilación de ácido láctico y lactosa en cepas de levaduras aisladas de agente coagulante

Género y especie	Cepa	Ácido láctico			Lactosa		
		1%	2%	3%	1%	2%	3%
<i>Candida aaseri</i>	1A1O	+	+	+	+	+	+
<i>Candida blankii</i>	2A2O	+	+	+	+	+	+
	3A3O	+	+	+	+	+	+
	4A4O	+	+	+	+	+	+
	5A5O	+	+	+	+	+	+
	6A6O	+	+	+	+	+	+
<i>Candida santjacobensis</i>	11A9O	+	+	+	+	+	+
	12A10O	+	+	+	+	+	+
	13A11O	+	+	+	+	+	+
	14A12O	+	+	+	+	+	+
	16A4I	+	+	+	+	+	+
	15A5P	+	+	+	+	+	+
<i>Candida shehatae</i>	9A3V	+	+	+	+	+	+
	10A4V	+	+	-	+	+	+
	8A8O	+	+	+	+	+	+
<i>Candida spp.</i>	7A7O	+	-	-	+	+	+
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	19A14O	+	+	+	+	+	+
	20A15O	+	+	+	+	+	+
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	17A13O	+	+	+	+	+	+
	18A6P	+	-	-	+	+	+
<i>Myxozyma moticola</i>	21A16O	+	+	+	+	+	+
	22A17O	+	+	+	+	+	+
	23A18O	+	+	+	+	+	+
	24A19O	+	+	+	+	+	+
	25A20O	+	+	+	+	+	+
	26A7P	+	+	+	+	+	+
<i>Pichia spp.</i>	28A5I	+	+	+	+	+	+
	27A5V	+	+	+	+	+	+

Tabla 3.22. Asimilación de ácido láctico y lactosa en cepas de levaduras aisladas de QAC

Género y especie	Cepa	Ácido láctico			Lactosa		
		1%	2%	3%	1%	2%	3%
<i>Candida bertae</i>	1Q6/12P	+	+	+	+	+	+
<i>Candida blankii</i>	1Q1/24O	+	+	+	+	+	+
	2Q1/10P	+	+	+	+	+	+
	3Q1/9V	+	+	-	+	+	+
	2Q6/13P	-	-	-	+	+	+
	3Q6/12V	+	+	+	+	+	+
	1Q15/29O	+	+	+	+	+	+
	2Q15/15I	+	+	+	+	+	+
	3Q15/20V	+	+	+	+	+	+
	4Q15/21V	+	+	+	+	+	+
	5Q15/22V	+	+	-	+	+	+
	1Q30/19P	+	+	+	+	+	+
	2Q30/24V	+	+	+	+	+	+
	<i>Candida santjacobensis</i>	4Q1/25O	-	-	-	+	+
3Q30/20P		+	+	+	+	+	+
4Q30/25V		+	+	+	+	+	+
<i>Candida shehatae</i>	4Q6/13V	+	+	+	+	+	+
	5Q6/14V	+	+	+	+	+	+
	6Q15/16P	+	+	+	+	+	+
	7Q15/23V	+	+	+	+	+	+
	5Q30/18I	+	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus albidus</i>	6Q6/12I	+	+	+	+	+	+
	8Q15/17P	+	+	+	+	+	+
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	5Q1/26O	+	+	+	+	+	+
	7Q6/27O	+	+	+	+	+	+
	8Q6/15V	+	+	+	+	+	+
	6Q30/26V	+	+	-	+	+	+
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	6Q1/11P	+	+	+	+	+	+
	7Q1/10V	+	+	+	+	+	+
	8Q1/11V	+	-	-	+	+	+
<i>Myxozyma monticola</i>	9Q1/9I	+	+	+	+	+	+
	10Q1/10I	+	+	+	+	+	+
	10Q6/28O	+	+	+	+	+	+
	11Q6/13I	+	+	+	+	+	+
	12Q6/14I	+	+	+	+	+	+
	9Q15/16I	+	+	+	+	+	+
	7Q30/19I	+	+	+	+	+	+
	8Q30/20I	+	+	+	+	+	+
<i>Pichia farinosa</i>	13Q6/16V	+	+	+	+	+	+
<i>Pichia</i> spp.	10Q15/17I	+	+	+	+	+	+
	9Q30/21P	+	+	+	+	+	+
<i>Stephanoascus smithiae</i>	11Q1/11I	+	+	+	+	+	+
	14Q6/15P	+	+	+	+	+	+

En lo que respecta a la capacidad de desarrollo en presencia de distintas concentraciones de ácido láctico, se aprecia una importante variabilidad entre los distintos géneros y especies, y aún entre cepas pertenecientes a una misma especie.

La mayoría de las cepas fueron capaces de desarrollar frente a concentraciones de ácido láctico del 1 % (p/v). Sólo cinco cepas de levaduras no crecieron, tres de ellas correspondieron a levaduras aisladas de leche cruda: una cepa de *Candida shehatae* (7L2I), una cepa de *Cryptococcus albidus* (7L2I) y la única cepa de *Rhodotorula acuta* (9L3I). Las restantes pertenecen al género *Candida*: *C. santjacobensis* (4Q1/25O) y *C. blankii* (2Q6/13P) aisladas de quesos de uno y seis días de maduración.

Frente a concentraciones de ácido láctico del 2 % (p/v) no desarrollaron otras cuatro cepas: dos aisladas del agente coagulante, una representante del género *Candida* (7A7O) y la otra de la especie *Debaryomyces polymorphus* (18A6P); una cepa perteneciente al género *Pichia* (9C8V) aislada de cuajada y una cepa de *Debaryomyces vanriijiae* (8Q1/11V) aislada de quesos también de un día de maduración.

Cuando la concentración de ácido láctico fue del 3 % (p/v) cinco cepas no presentaron desarrollo: una cepa de *Debaryomyces vanriijiae* (6C7V) aislada de cuajada, una cepa de *Candida shehatae* (10A4V) aislada de agente coagulante, dos cepas de *Candida blankii* (3Q1/9V, 5Q15/22V) y una de *Debaryomyces polymorphus* (6Q30/26V) aisladas de quesos.

Estos resultados son coincidentes con los informados por otros autores en distintas variedades de quesos (Besançon *et al.*, 1992; van de Tempel y Jacobsen, 1998; Pereira-Dias *et al.*, 2000; Corbo *et al.*, 2001; Romano *et al.*, 2001).

Entre los principales mecanismos mediante los cuales se cree (Welthagen y Viljoen, 1999; Corbo *et al.*, 2001; Romano *et al.*, 2001; Fadda *et al.*, 2001; Cosentino *et al.*, 2001) que las levaduras participarían en la maduración de quesos se encuentra la asimilación de ácido láctico. El metabolismo de este ácido provocaría el aumento de pH hacia el final de la maduración (Besançon *et al.*, 1992; Rossi *et al.*, 1998; Pereira-Dias *et al.*, 2000; Fadda *et al.*, 2004). Estos aumentos favorecen el crecimiento de la microbiota bacteriana y son particularmente importantes para el desarrollo de la flora superficial en quesos madurados por bacterias o mohos superficiales (Robinson, 1987; Seiler y Busse, 1990;

Valdés-Stauber *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 1998). Además, estos incrementos de pH estimularían la actividad proteolítica de bacterias aerobias superficiales (Valdés-Stauber *et al.*, 1997; Rossi *et al.*, 1998) y de bacterias lácticas (Pereira-Dias *et al.*, 2000), dado que valores bajos de pH en la superficie y el interior de los quesos pueden provocar menor actividad de las enzimas proteolíticas debido a una desnaturalización de las mismas (Rossi *et al.*, 1998).

En los QAC se produce un incremento del pH (Vasek, 2003) a partir del 5° día de maduración, alcanzando los valores mayores a los 30 días (pH 5,80). Esta variación coincide con el aumento marcado y constante de la población de levaduras a partir del 6° día durante la maduración de estos quesos.

El hecho de que la mayoría de las cepas de levaduras aisladas fueron capaces de asimilar ácido láctico explicaría el aumento de pH observado y reforzaría la presunción de que la biota levaduriforme juega un rol importante en la maduración de los QAC.

Al realizar la caracterización taxonómica de las cepas de levaduras (ítem 3.3.2), ya se evaluó la capacidad de asimilar y fermentar distintos azúcares, entre ellas lactosa (Tablas 3.5, 3.8, 3.11 y 3.14). La concentración de este azúcar en esas pruebas fue igual a 1,2 % (p/v). Casi todas las cepas de levaduras ensayadas fueron capaces de asimilar lactosa a esta concentración, sólo la cepa de *Rhodotorula acuta* 9L31, aislada de leche en la estación invierno, resultó lactosa negativa (Tabla 3.8), por esta razón no se evaluó su capacidad de asimilar lactosa a mayores concentraciones cuando se realizó la caracterización tecnológica de las cepas (Tabla 3.19).

Todas las demás cepas ensayadas tuvieron respuesta positiva frente a las concentraciones de lactosa estudiadas [1 %, 2 % y 3 % (p/v)], con excepción de una cepa de *Candida santjacobensis* 2C71 que no toleró concentraciones del 2 y 3 % (p/v) (Tabla 3.20).

Son numerosos los trabajos que también informaron altos porcentajes de especies de levaduras aisladas de productos lácteos capaces de asimilar lactosa (Seiler y Busse, 1990; Besançon *et al.*, 1992; Valdés-Stauber *et al.*, 1997; Suzzi *et al.*, 1998; van de Tempel y Jacobsen, 1998; Pereira-Dias *et al.*, 2000; Cosentino *et al.*, 2001; Romano *et al.*, 2001; Fadda *et al.*, 2004).

La propiedad de las cepas de levaduras para metabolizar lactosa, el azúcar más abundante en los quesos y otros productos lácteos, es una de las características claves (Viljoen y Greyling, 1995; Pereira- Dias *et al.*, 2000; Cosentino *et al.*, 2001; Fadda *et al.*, 2001; Gardini *et al.*, 2006) para su desarrollo en los mismos. De acuerdo con Besançon *et al.* (1992), Suzzi *et al.* (1998), van de Tempel y Jacobsen (1998) Welthagen y Viljoen (1999), Romano *et al.* (2001) y Corbo *et al.* (2001) la biota levaduriforme participaría en la maduración de los quesos por asimilación de la lactosa remanente.

3.4.3. Respuesta a distintos valores de concentración de cloruro de sodio

En las Tablas 3.23, 3.24, 3.25 y 3.26 se presentan los resultados de la respuesta a diferentes concentraciones de cloruro de sodio en cepas de levaduras aisladas de leche, cuajada, agente coagulante y quesos, respectivamente.

Tabla 3.23. Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl en cepas de levaduras aisladas de leche

Género y especie	Cepa	NaCl		
		10%	15%	20%
<i>Candida bertae</i>	1L1I	+	-	-
<i>Candida blankii</i>	2L1P	+	+	+
<i>Candida santjacobensis</i>	3L2P	+	-	-
	4L3P	+	-	-
<i>Candida shehatae</i>	5L1V	+	+	+
<i>Candida tenuis</i>	6L2V	+	+	+
<i>Cryptococcus albidus</i>	7L2I	+	+	+
<i>Pichia spp.</i>	8L4P	+	+	+
<i>Rhodotorula acuta</i>	9L3I	-	-	-

Tabla 3.24. Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl en cepas de levaduras aisladas de cuajada

Género y especie	Cepa	NaCl		
		10%	15%	20%
<i>Candida blankii</i>	1C6I	+	+	+
<i>Candida santjacobensis</i>	2C7I	+	-	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	3C8P	+	-	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	4C21O	+	-	-
	5C6V	+	-	-
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	6C7V	+	+	+
<i>Myxozyma monticola</i>	7C8I	+	+	+
<i>Pichia spp.</i>	8C9P	+	+	+
	9C8V	+	+	-
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	10C22O	+	-	-

Tabla 3.25. Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl en cepas de levaduras aisladas de agente coagulante

Género y especie	Cepa	NaCl		
		10%	15%	20%
<i>Candida aaseri</i>	1A1O	+	-	-
<i>Candida blankii</i>	4A4O	+	+	+
	5A5O	+	-	-
	6A6O	+	-	-
	2A2O	+	-	-
	3A3O	+	-	-
<i>Candida santjacobensis</i>	11A9O	+	-	-
	12A10O	+	+	+
	13A11O	+	+	+
	14A12O	+	-	-
	16A4I	+	-	-
	15A5P	+	-	-
<i>Candida shehatae</i>	9A3V	+	+	-
	10A4V	+	+	-
	8A8O	+	-	-
<i>Candida spp.</i>	7A7O	+	+	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	17A13O	+	+	+
	18A6P	+	+	+
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	19A14O	+	-	-
	20A15O	+	+	+
<i>Myxozyma monticola</i>	21A16O	+	-	-
	22A17O	+	-	-
	23A18O	+	-	-
	24A19O	+	-	-
	25A20O	+	-	-
	26A7P	+	+	+
<i>Pichia spp.</i>	28A5I	+	+	+
	27A5V	+	+	+

Tabla 3.26. Respuesta a diferentes concentraciones de NaCl en cepas de levaduras aisladas de quesos

Género y especie	Cepa	NaCl		
		10%	15%	20%
<i>Candida bertae</i>	1Q6/12P	+	-	-
<i>Candida blankii</i>	1Q1/24O	+	+	-
	2Q1/10P	+	+	-
	3Q1/9V	+	+	+
	2Q6/13P	+	+	-
	3Q6/12V	+	+	-
	1Q15/29O	+	+	+
	2Q15/15I	+	-	-
	3Q15/20V	+	+	+
	4Q15/21V	+	+	-
	5Q15/22V	+	+	+
	1Q30/19P	+	-	-
	2Q30/24V	+	+	-
<i>Candida santjacobensis</i>	4Q1/25O	+	+	+
	3Q30/20P	+	+	-
	4Q30/25V	+	+	+
<i>Candida shehatae</i>	4Q6/13V	+	+	-
	5Q6/14V	+	+	+
	6Q15/16P	+	+	+
	7Q15/23V	+	+	+
	5Q30/18I	+	+	+
<i>Cryptococcus albidus</i>	6Q6/12I	+	+	+
	8Q15/17P	+	+	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	5Q1/26O	+	-	-
	7Q6/27O	+	-	-
	8Q6/15V	+	+	-
	6Q30/26V	+	+	+
<i>Debaryomyces vanrijae</i>	6Q1/11P	+	-	-
	7Q1/10V	+	+	+
	8Q1/11V	+	+	-
<i>Myxozyma monticola</i>	9Q1/9I	+	+	+
	10Q1/10I	+	-	-
	10Q5/28O	+	-	-
	11Q6/13I	+	-	-
	12Q6/14I	+	-	-
	9Q15/16I	+	-	-
	7Q30/19I	+	-	-
	8Q30/20I	+	+	+
<i>Pichia farinosa</i>	13Q6/16V	+	+	-
<i>Pichia spp.</i>	10Q15/17I	+	+	-
	9Q30/21P	+	-	-
<i>Stephanoascus smithiae</i>	11Q1/11I	+	-	-
	14Q6/15P	+	-	-

Del análisis de las Tablas anteriores se deduce que, prácticamente, todos los aislamientos efectuados presentaron capacidad de desarrollo en presencia de NaCl en concentraciones del 10 % (p/v). Por el contrario, se ha podido determinar una menor tolerancia de crecimiento en concentraciones del 15 % y 20 % (p/v) NaCl.

En general, las levaduras pertenecientes al género *Rhodotorula* presentan una menor resistencia a baja actividad de agua (Pereira-Días *et al.*, 2001), esta característica explicaría el hecho de que la única cepa de levadura que no toleró concentraciones de 10 % (p/v) de NaCl fue una cepa (9L3I) de *Rhodotorula acuta* aislada de leche. Todas las demás, fueron capaces de crecer frente a esta concentración salina. Autores de nuestro país (Baraggio, 2000) como de Europa (Besançon *et al.*, 1992) hallaron resultados similares en cepas de levaduras aisladas de quesos, pertenecientes a los géneros *Candida* y *Debaryomyces*. Por el contrario, otros autores informaron menor tolerancia a esta concentración de sal en aislamientos correspondientes al género *Candida* (Cosentino *et al.*, 2001; Suzzi *et al.*, 2003) aislados de diferentes quesos europeos.

En la Tabla 3.27 se presentan los porcentajes de cepas de cada género de levaduras capaces de crecer frente a distintas concentraciones de NaCl.

Tabla 3.27. Respuesta a las distintas concentraciones de NaCl (expresado como porcentaje del total de los aislamientos para cada uno de los géneros)

Género	NaCl		
	10 %	15 %	20 %
<i>Candida</i> (44)	100	62	38
<i>Cryptococcus</i> (4)	100	75	50
<i>Debaryomyces</i> (14)	100	57	43
<i>Myxozyma</i> (16)	100	27	27
<i>Pichia</i> (8)	100	88	50
<i>Stephanoascus</i> (3)	100	0	0

Se observaron altos porcentajes de resistencia (Tabla 3.27) frente a concentraciones de 15 % (p/v) de NaCl entre los géneros más frecuentemente aislados. El 62 % de las cepas pertenecientes al género *Candida* crecieron a esta concentración, siendo *Candida blankii* y *Candida shehatae* las especies que presentaron la mayor resistencia. Los aislamientos incluidos en los géneros *Debaryomyces*, *Cryptococcus* y *Pichia* crecieron con porcentajes de 57, 75 y 88 %, respectivamente. Por el contrario, las cepas de *Myxozyma*

monticola presentaron baja tolerancia (27 %). Estos resultados son coincidentes con los hallados por Besançon *et al.* (1992) en quesos azules, sin embargo, los porcentajes de cepas resistentes hallados en este trabajo, son mayores a los publicados por otros autores en quesos de otras regiones de Europa (Suzzi *et al.*, 2003) y también en quesos elaborados en nuestro país (Baraggio, 2000).

Los porcentajes de cepas resistentes a concentraciones del 20 % (p/v) de sal oscilaron entre 27 y 50 %. Entre los géneros más frecuentemente aislados (*Candida*, *Debaryomyces* y *Myxozyma*), *Debaryomyces* fue el que mostró la mayor frecuencia. Hasta un 50 % de las cepas de otros géneros aislados en menor número (*Cryptococcus* y *Pichia*) toleraron concentraciones del 20 % (p/v). Son escasas las publicaciones que presentan porcentajes tan elevados de resistencia a esta concentración salina (Besançon *et al.*, 1992), generalmente se corresponden con aislamientos a partir de quesos duros o salmueras utilizadas en el salado de quesos (Seiler y Busse, 1990). La mayoría de los autores, tanto europeos como de nuestro país observaron porcentajes inferiores (Baraggio, 2000) o nulos (Suzzi *et al.*, 2003).

En general, la mayoría de las levaduras son menos sensibles a bajas a_w que las bacterias y pueden crecer en rangos de a_w desde 0,95 hasta 0,90 (Viljoen, 1998; Welthagen y Viljoen, 1999; Wyder y Puhán, 1999; Gardini *et al.*, 2006). Un grupo particular de levaduras son capaces de crecer a valores muchos más bajos de a_w (0,65-0,80) en presencia de elevadas concentraciones de azúcar o sal. Son las llamadas levaduras osmófilas. Las mismas suelen estar asociadas a ciertos alimentos, entre ellos los productos lácteos, con concentraciones de azúcar cercanas al 65 % (Jay, 1992), como leche condensada (54 - 65 %), o de sal entre 15 y 25 % [la concentración de NaCl en las salmueras queseras varía entre 18 y 27 %, y en los distintos tipos de quesos (Scott, 1981) entre 0,6 y 8,3 %]. Entre los diferentes géneros y especies de levaduras que poseen esta característica de encuentran: *Cryptococcus albidus* y distintas especies de los género *Candida* y *Debaryomyces* (Tilbury, 1980; Tokouka, 1993; van Eck *et al.*, 1993). Éstas, fueron halladas, frecuentemente, en diferentes quesos o salmueras de salado (Viljoen y Greyling, 1995). Los mismos también fueron aislados durante la elaboración y maduración

de los Quesos Artesanales de Corrientes y evidenciaron elevada resistencia a las distintas concentraciones de sal.

Estos resultados demuestran que, la mayoría de las cepas de levaduras aisladas durante la elaboración y maduración del QAC evidencian una excelente aptitud para desarrollar frente a concentraciones de sal elevadas, explican su importancia en los quesos y sugieren que las mismas participarían en su maduración.

La tolerancia a la sal es una característica de importancia destacada para la selección de cultivos iniciadores en la elaboración de quesos (Besançon *et al.*, 1992). Por lo tanto, las levaduras salvajes presentes en los QAC podrían ser empleadas como adjuntos a los fermentos de bacterias lácticas usados en la elaboración casearia.

3.5. Propiedades tecnológicas de las cepas de levaduras

3.5.1. Actividad proteolítica

La Fig. 3.10 indica el porcentaje de cepas de levaduras aisladas durante la elaboración y maduración del QAC que presentaron actividad proteolítica.

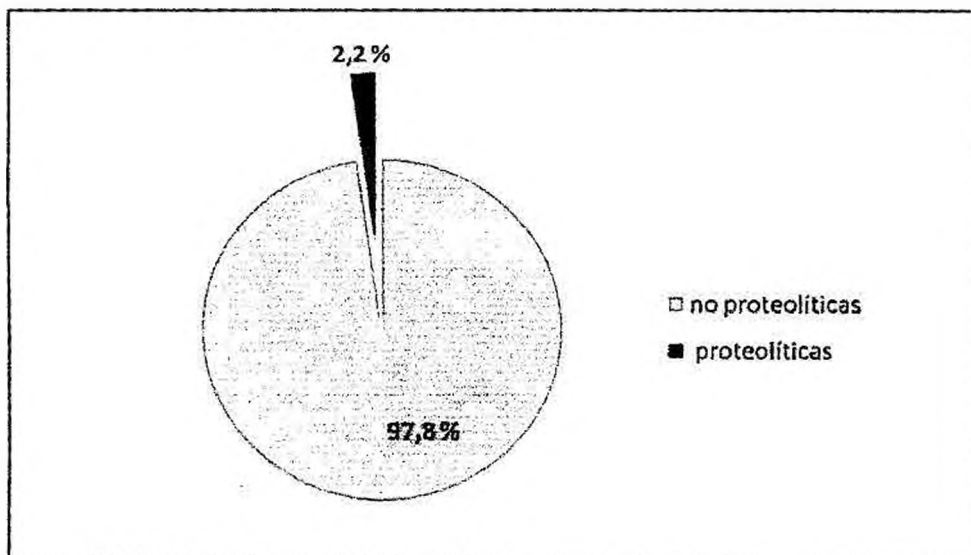


Figura 3.10. Actividad proteolítica de cepas de levaduras aisladas durante la elaboración y maduración del Queso Artesanal de Corrientes

Sólo dos de las 90 cepas de levaduras estudiadas presentaron actividad proteolítica: una cepa de *Candida santjacobensis* (4Q1/250) y una cepa de *Debaryomyces polymorphus* (5Q1/260), ambas aisladas de quesos de un día de maduración.

Estos resultados coinciden con los hallados por otros autores (Besançon *et al.*, 1992; van de Tempel y Jacobsen, 1998; Pereira-Dias *et al.*, 2000; Corbo *et al.*, 2001; Cosentino *et al.*, 2001; Fadda *et al.*, 2004) al estudiar la actividad proteolítica de la biota levaduriforme presente en distintas variedades de quesos. Sin embargo, se contraponen a los publicados por autores nacionales, quienes informaron altos porcentajes de actividad proteolítica en cepas aisladas de quesos provenientes de la cuenca lechera santafesina (Baraggio, 2000).

La proteólisis es importante en quesos porque contribuye al desarrollo del sabor y aroma durante la maduración. Este proceso es conducido, básicamente, por enzimas provenientes de la leche, del cuajo, y de las bacterias lácticas del fermento. Las levaduras podrían jugar un papel importante en la proteólisis, sin embargo los resultados hallados hasta el momento, a través de los métodos indicados, sugieren que las levaduras aisladas del QAC carecen de actividad proteolítica significativa por sí mismas.

Tzanetakis *et al.* (1998), también detectaron sólo una cepa de *Pichia farinosa*, aislada de queso Feta, con actividad proteolítica en agar leche, mientras que a través del empleo del test API-ZYM pudieron hallar más cepas, entre las especies predominantes, con actividad peptidasa. van de Tempel y Jacobsen (1998) no encontraron cepas de levaduras, aisladas de queso Danablu, con actividad proteolítica en agar caseína. Estos autores sugirieron que la degradación de caseína, y por extensión de proteínas, debería ser evaluada por otros métodos más sensibles como electroforesis capilar (Hansen y Jacobsen, 1998). Por lo tanto, sería necesario continuar la evaluación de la actividad proteolítica en las cepas de levaduras autóctonas del QAC empleando otros métodos más sensibles y específicos como podrían ser los test comerciales API-ZYM.

3.5.2. Actividad lipolítica

En las Figs. 3.11, 3.12, 3.13 y 3.14 se presentan los resultados de actividad lipolítica en las cepas de levaduras aisladas de leche, agente coagulante, cuajadas y quesos, respectivamente.

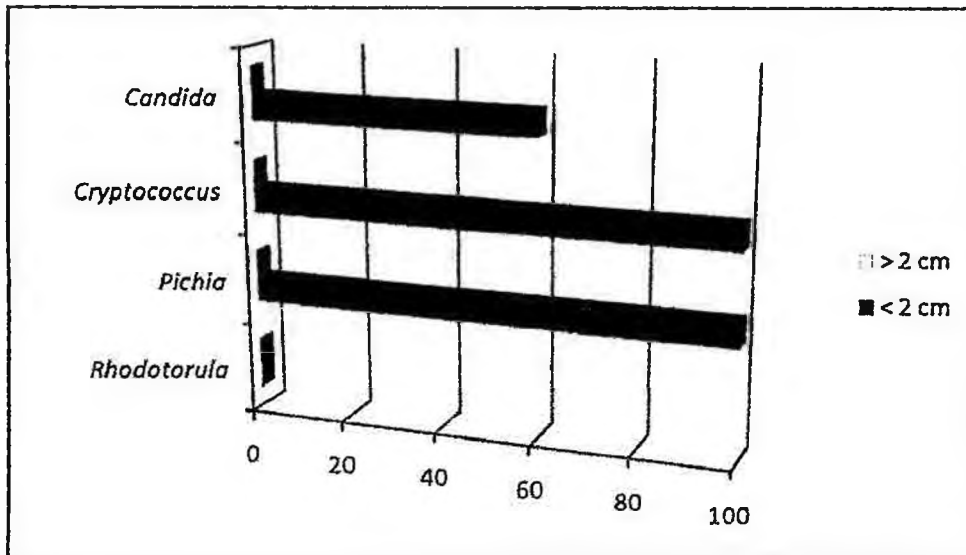


Figura 3.11. Porcentajes de cepas de levaduras aisladas de leche cruda con actividad lipolítica

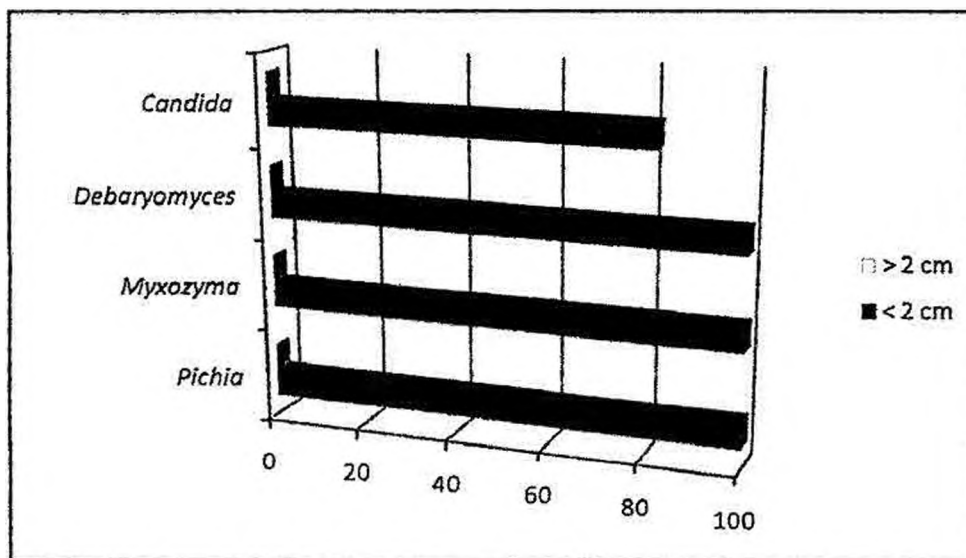


Figura 3.12. Porcentajes de cepas de levaduras aisladas de agente coagulante con actividad lipolítica

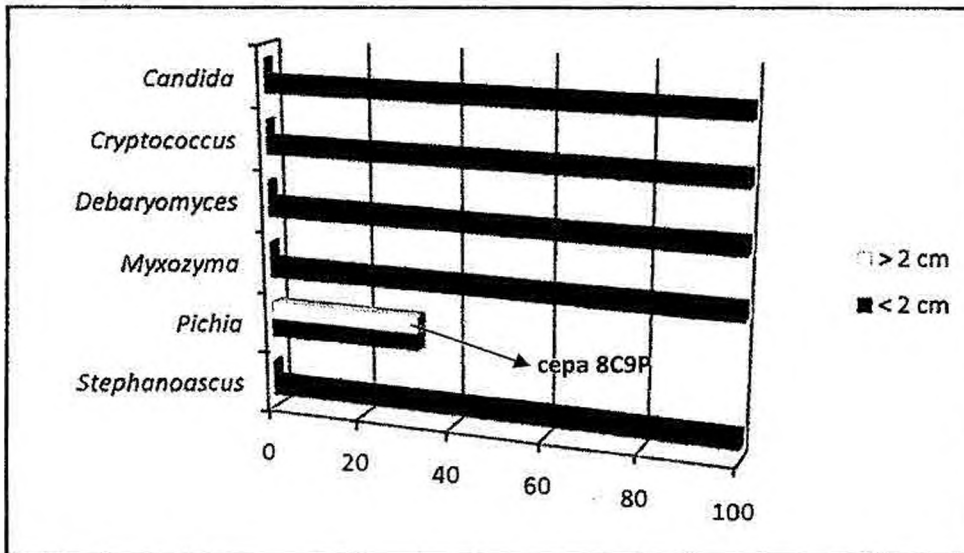


Figura 3.13. Porcentajes de cepas de levaduras aisladas de cuajada con actividad lipolítica

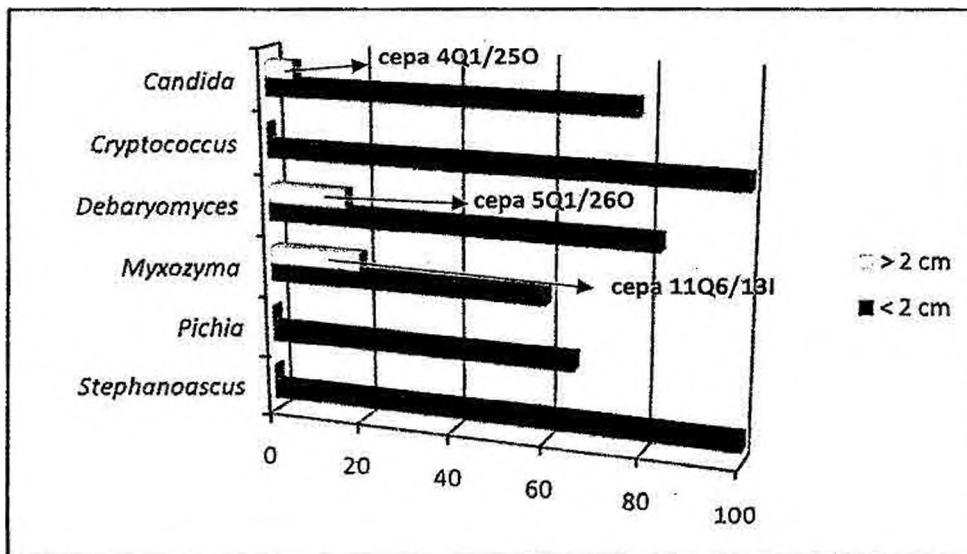


Figura 3.14. Porcentajes de cepas de levaduras aisladas de quesos con actividad lipolítica

En primer lugar se observa que la habilidad para hidrolizar grasas es una propiedad que está ligada a cada cepa en particular y no a la especie, como ya indicaron otros autores (Besançon *et al.*, 1992).

La mayoría de los géneros estudiados incluyeron aislamientos capaces de hidrolizar tributirina. Entre el 60 y 100 % de las cepas pertenecientes al género *Candida*

estudiadas fueron lipolíticas. Entre estos aislamientos, sólo una cepa (4Q1/250) de *Candida santjacobensis* evidenció acentuada actividad hidrolítica (halo >2 cm).

También los géneros *Myxozyma* y *Debaryomyces* presentaron porcentajes altos de cepas con capacidad lipolítica, entre 80 y 100 % de las diferentes muestras. Una cepa (5Q1/260) de *Debaryomyces polymorphus* y una de *Mxozyma monticola* (11Q6/131) fueron además fuertemente lipolíticas. Asimismo, la cepa de levadura *Pichia* spp. 8C9P fue otra que evidenció una marcada actividad.

Entre las cuatro cepas que presentaron mayor actividad lipolítica se encuentran las dos cepas que también presentaron actividad proteolítica en agar leche.

Si bien no es significativa la presencia de la especie *Cryptococcus albidus* durante la elaboración y maduración del QAC es notorio el hecho de que todas sus cepas fueron capaces de hidrolizar tributirina.

Estos resultados son similares a los informados en otros trabajos (Besançon *et al.*, 1992; Pereira-Dias *et al.*, 2000; Corbo *et al.*, 2001; Cosentino *et al.*, 2001; van de Tempel y Jacobsen, 1998; Wojtatowicz *et al.*, 2001; Fadda *et al.*, 2004) realizados con cepas de levaduras pertenecientes a los géneros *Candida* y *Debaryomyces*.

La actividad lipolítica de levaduras podría influenciar positivamente en el proceso de maduración, contribuyendo al desarrollo de la textura y a las características organolépticas de los quesos (Pereira-Dias *et al.*, 2001; Ferreira y Viljoen, 2003; De Wit *et al.*, 2005). La lipólisis libera ácidos grasos libres, los cuales son componentes de las características organolépticas y pueden ser precursores de otros compuestos del sabor- aroma, tales como metilcetonas, alcoholes, lactonas y ésteres. Sin embargo, cuando la actividad es excesiva, podrían generar también compuestos volátiles y no volátiles indeseables que afectarían a la textura de la pasta (ablandamiento) y desarrollarían sabores amargos (Corbo *et al.*, 2001; Wyder y Puhan, 1999; Ferreira y Viljoen, 2003).

Asimismo, otros autores han realizado distintos estudios consistentes en la adición de levaduras con fuerte actividad lipolítica durante la elaboración casearia a fin de acelerar la maduración de distintas variedades de quesos (Wyder y Puhan, 1999; De Wit *et al.*, 2005).

Por consiguiente, las levaduras del QAC participarían activamente durante la maduración a través de su actividad lipolítica, siendo un importante grupo microbiano con influencia marcada en las características texturales y del sabor-aroma de esta variedad de quesos.

3.5.3. Degradación de aminoácidos a amoníaco

Se evaluó la capacidad para degradar los aminoácidos ornitina, lisina, fenilalanina y tirosina en 62 cepas de levaduras aisladas de materias primas, cuajada y quesos de diferentes días de maduración.

La Fig. 3.15 muestra los porcentajes de aislamientos que degradaron los aminoácidos estudiados, discriminados por muestras.

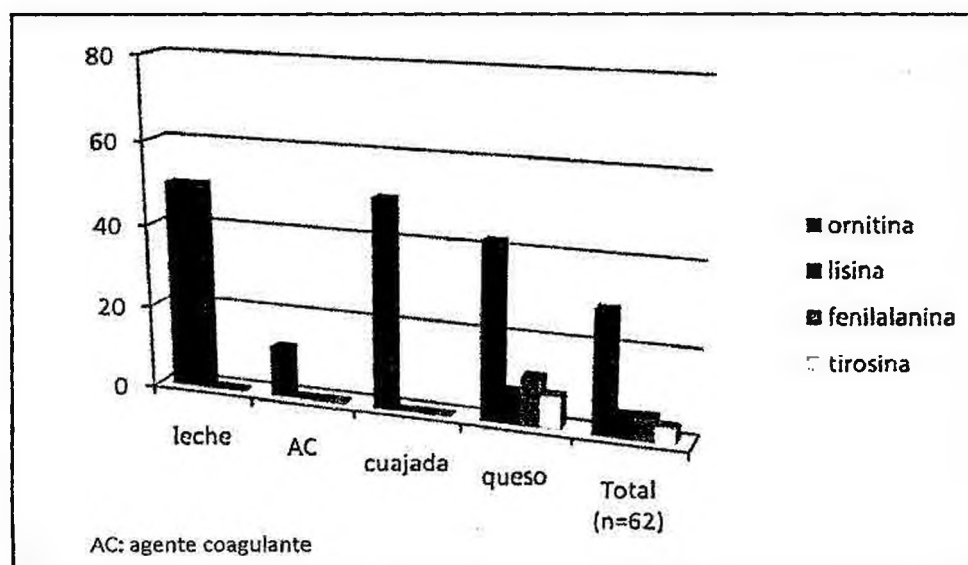


Figura 3.15. Degradación de aminoácidos por las cepas de levaduras aisladas durante la elaboración y maduración del QAC

En general, la mayoría de las cepas aisladas, a partir de las diferentes muestras, no fueron capaces de utilizar los aminoácidos ensayados. Sólo catorce cepas (Tabla 3.28) catabolizaron al menos un aminoácido, siendo ornitina el más degradado (Fig. 3.15).

Tabla 3.28. Cepas de levaduras que degradaron aminoácidos

Género y especie	Cepa	ornitina	lisina	fenilalanina	tirosina
<i>Candida blankii</i>	3Q1/9V	+	+	-	-
	1Q15/290	+	-	+	-
	3Q15/20V	+	-	-	-
	2Q30/24V	+	-	-	-
<i>Candida shehatae</i>	5L1V	+	+	-	-
<i>Candida spp.</i>	7A70	+	-	-	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	5Q1/260	+	+	+	+
	8Q6/15V	+	-	-	-
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	6C7V	+	-	-	-
	7Q1/10V	+	-	+	-
<i>Myxozyma monticola</i>	12Q6/14I	+	-	-	-
<i>Pichia farinosa</i>	13Q6/16V	-	-	-	+
<i>Pichia spp.</i>	28A5I	+	-	-	-
	9C8V	+	-	-	-

La Fig. 3.16 muestra las especies que presentaron la mayor capacidad de degradar ornitina, indicando sus respectivos porcentajes.

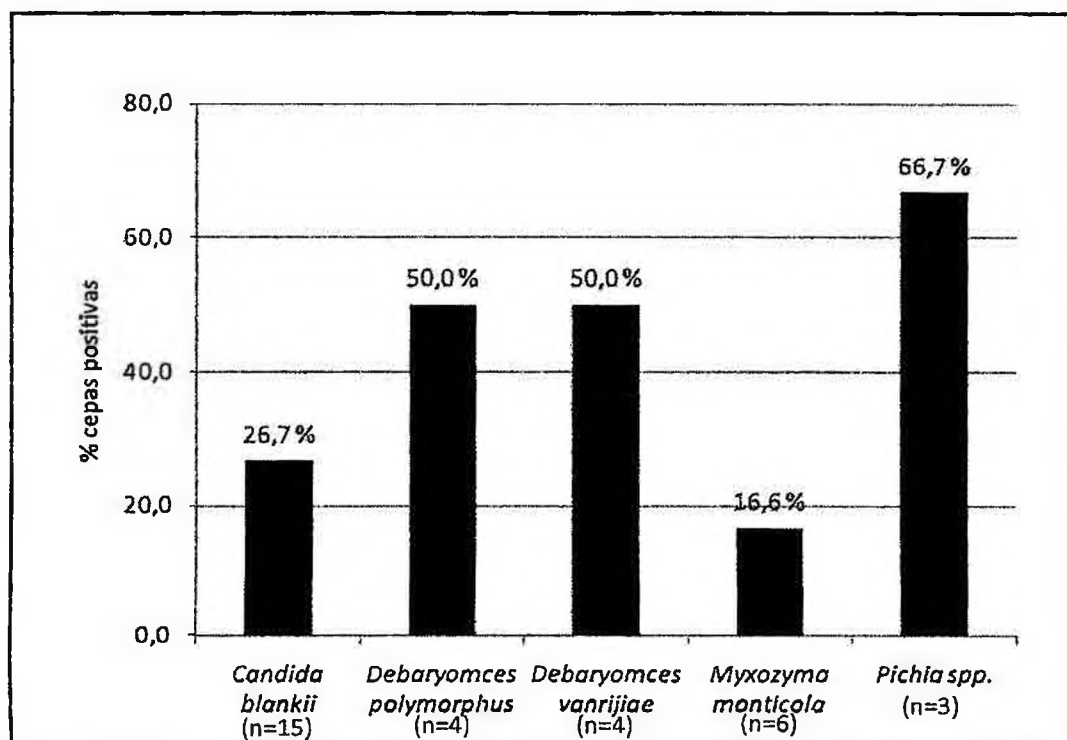


Figura 3.16. Degradación del aminoácido ornitina por las especies de levaduras que presentaron mayor actividad degradativa

Las especies *Debaryomyces vanriijiae*, *Debaryomyces polymorphus* y el género *Pichia* fueron los que evidenciaron mayor actividad (entre 50,0 y 66,7 %) sobre este compuesto. Sin embargo estas especies no se encuentran en número significativo en los diferentes aislados obtenidos durante la elaboración y maduración del QAC.

Con respecto a los demás aminoácidos (Tabla 3.28) sólo dos cepas, una *Candida shehatae* (5L1V) y una *Candida blankii* (3Q1/9V), presentaron actividad sobre lisina además de ornitina. Otras dos cepas fueron capaces de utilizar fenilalanina junto con ornitina: *Debaryomyces vanriijiae* (7Q1/10V) y *Candida blankii* (1Q15/29O). Una sola cepa de *Pichia farinosa* (13Q6/16V) catabolizó sólo tirosina. La cepa *Debaryomyces polymorphus* 5Q1/26O fue capaz de hidrolizar los cuatro aminoácidos ensayados. Esta es una de las dos cepas que presentó actividad proteolítica.

Estos resultados se contraponen a los obtenidos por Seiler y Busse (1990) y Baraggio (2000) en lo que respecta a la capacidad para metabolizar aminoácidos por representantes de *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia* y *Cryptococcus*. Sin embargo coincide con los hallados por Gardini *et al.* (2006) quienes estudiaron la descarboxilación de estos cuatro aminoácidos, además de histidina, a fin de evaluar la probable producción de aminas biógenas por parte de levaduras.

La propiedad de utilizar aminoácidos en altas concentraciones como fuente nitrogenada, aún en presencia de otra fuente orgánica de nitrógeno debe ser considerada bajo tres puntos de vista diferentes.

- Por un lado, la formación de amoníaco que, en concentraciones adecuadas, contribuirá al logro de características sensoriales propias de ciertos tipos de quesos y al incremento del pH.
- Por otra parte, la disminución en la concentración de aminoácidos de la cuajada podría afectar negativamente al desarrollo de bacterias lácticas debido a que muchas veces deben satisfacer sus necesidades metabólicas a partir de aminoácidos libres para multiplicarse adecuadamente dada su escasa actividad proteolítica.
- Además, una elevada descarboxilación de ciertos aminoácidos puede implicar la formación de aminas biógenas por parte de las levaduras.

Esto pone en evidencia la importancia de la evaluación de esta propiedad como paso previo a la selección de cepas de levaduras para integrar starters, teniendo en cuenta los aspectos positivos y negativos que implica.

3.5.4. Capacidad para degradar aminas biógenas

Se evaluó la capacidad para degradar las aminas biógenas: histamina, triptamina y tiramina en 90 cepas de levaduras aisladas durante la elaboración y maduración del QAC.

Todas las cepas estudiadas fueron capaces de metabolizar las tres aminas biógenas ensayadas (resultados no mostrados).

Estos resultados coinciden con los informados para cepas de levaduras aisladas durante la elaboración de distintos quesos santafesinos (Baraggio, 2000) y queso Roquefort de origen francés (Besançon *et al.*, 1992).

Las aminas biógenas pueden estar presentes naturalmente en muchos alimentos como frutas y verduras, carnes, pescados, chocolate y leche. Pero estos compuestos también pueden ser hallados en mayor medida en alimentos fermentados como vinos, carnes fermentadas, quesos y vegetales fermentados debido a la actividad aminodescarboxilasa de los microorganismos presentes (Silla Santos, 1996; Shalab, 1996). Altas cantidades de aminas biógenas pueden encontrarse en los alimentos fermentados elaborados a partir de materias primas crudas ricas en proteínas como salames (Suzzi y Gardini, 2003) y queso elaborados con leche cruda.

El consumo excesivo de estas aminas tiene relevancia sanitaria, debido a que pueden producir un desequilibrio en el organismo por su acción sobre la presión arterial y los sistemas nervioso, gástrico e intestinal (Suzzi y Gardini, 2003), sobre todo en personas sometidas a tratamientos con ciertos medicamentos inhibidores de la monoaminooxidasa hepática, enzima encargada de la degradación de esas aminas en el organismo humano (Baraggio, 2000).

En consecuencia, la aptitud para degradar aminas biógenas es considerada una propiedad muy importante en la selección de cultivos iniciadores destinados a la elaboración de alimentos fermentados (Suzzi y Gardini, 2003). Por lo tanto, las levaduras salvajes del QAC jugarían un papel significativo en la eliminación de las posibles aminas

provenientes de la descarboxilación de aminoácidos, común en muchas bacterias lácticas de los Géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*.

Si bien, las cepas de bacterias lácticas constituyentes del fermento “Gaucho” empleado en la elaboración del QAC no producen estas aminas (Vasek, 2003), hay que tener en cuenta que este queso se elabora con leche cruda y por lo tanto en su elaboración y maduración participan bacterias lácticas no-starters (NSLAB) junto a otros microorganismos que podrían formar estos compuestos.

3.6. Interacciones con bacterias lácticas constituyentes del fermento “Gaucho”

3.6.1. Determinación de la actividad antagónica

3.6.1. a Método de estrías cruzadas

Se enfrentaron cada una de las ocho cepas de bacterias lácticas constituyentes del fermento “Gaucho” a cuatro cepas de levaduras salvajes, seleccionadas por presentar características y propiedades tecnológicas interesantes para ser empleadas como adjuntos en la elaboración de quesos.

Las cepas de levaduras empleadas fueron:

- dos cepas de *Candida blankii* (2L1P, 2Q1/10P)
- una cepa de *Debaryomyces vanriijiae* (6Q1/11P)
- una cepa de *Debaryomyces polymorphus* (5Q1/26O)

Las Figs. 3.17, 3.18 y 3.19 muestran algunas fotos ilustrativas utilizando el método de estrías cruzadas con cepas de *Debaryomyces* y *Candida* frente a algunas cepas de BAL del fermento.

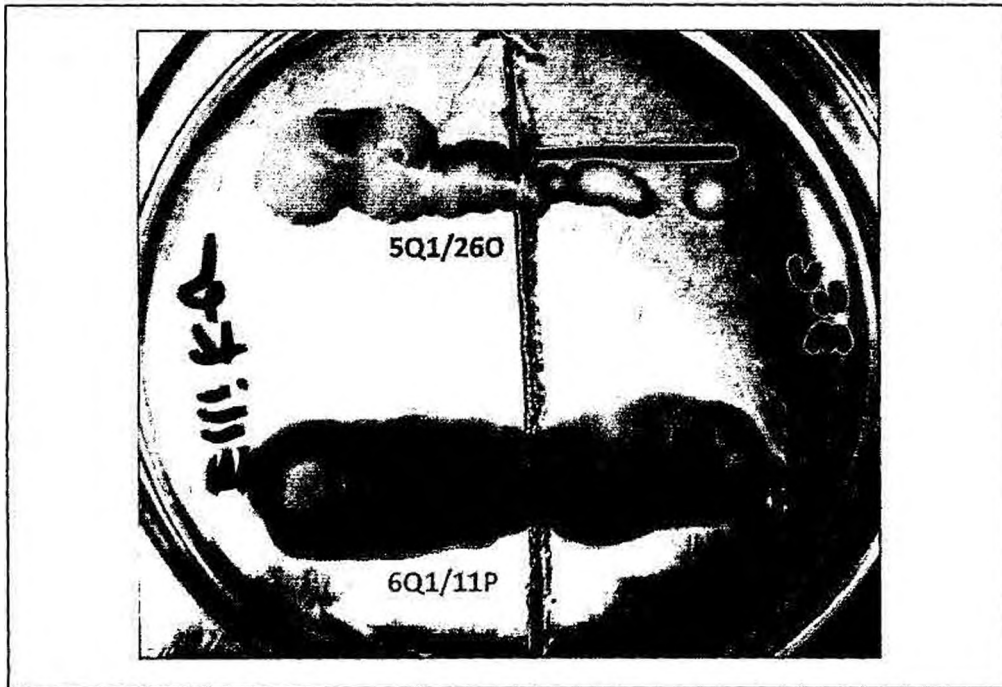


Figura 3.17. Estrías cruzadas de cepas de *Debaryomyces* (5Q1/260 y 6Q1/11P) y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 35cVCOR en Agar Elliker

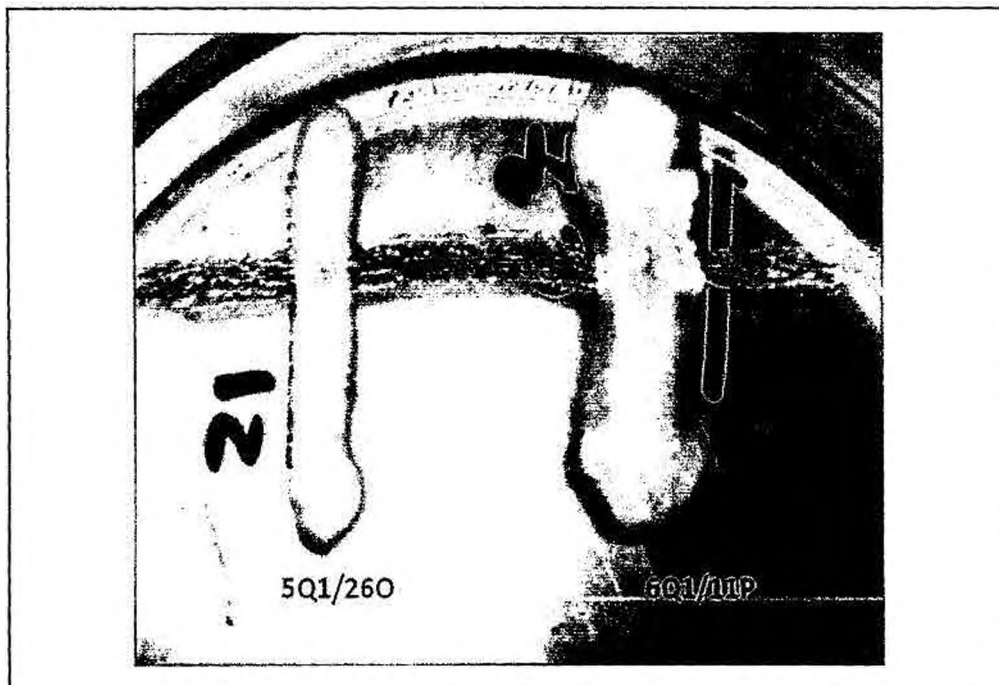


Figura 3.18. Estrías cruzadas de cepas de *Debaryomyces* (5Q1/260 y 6Q1/11P) y *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR en Agar MRS

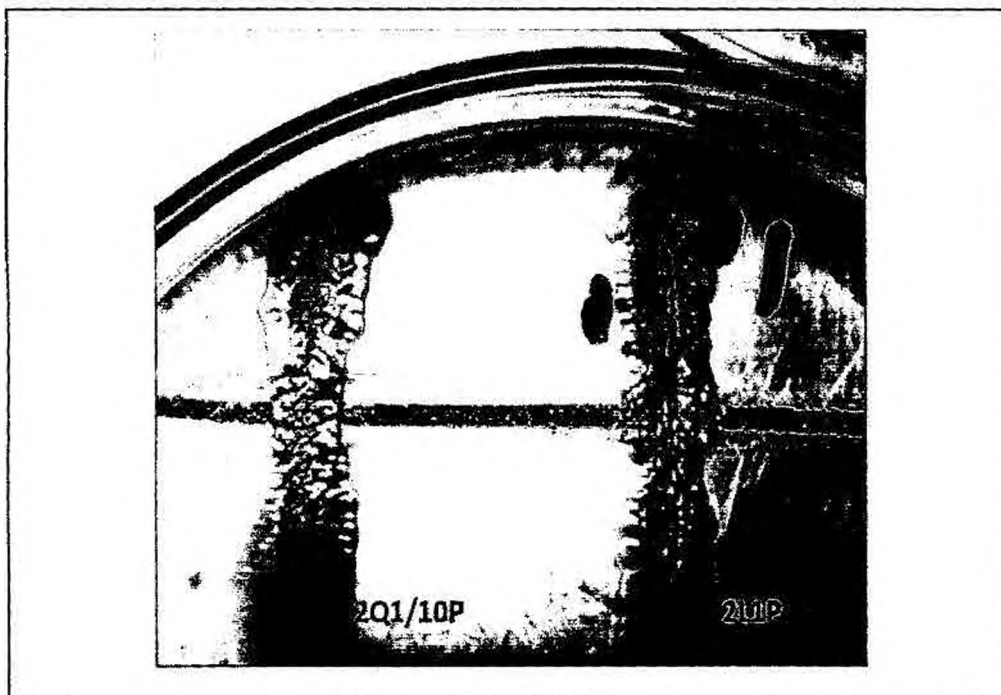


Figura 3.19 Estrías cruzadas de cepas de *Candida blankii* (2Q1/10P, 2L1P) y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextransicum* 14cVCOR en Agar MRS

Se comprobó que ninguna de las cepas de bacterias lácticas constituyentes del fermento inhibió el crecimiento de las levaduras ensayadas.

3.6.1. b Método de difusión en agar

Se determinó la sensibilidad de las cuatro cepas de levaduras usadas en el ítem anterior frente a los sobrenadantes libres de células (concentrados diez veces), provenientes del crecimiento de cuatro cepas de bacterias lácticas constituyentes del fermento "Gaucho", indicadas a continuación:

- *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextransicum* 14cVCOR
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 35cVCOR
- *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 166cVCOR

En las Figs. 3.20 y 3.21 se muestran algunas fotos ilustrativas de los pequeños halos de inhibición observados al enfrentar cepas de levaduras a los sobrenadantes libres de células de algunas de las BAL integrantes del fermento Gaucho.

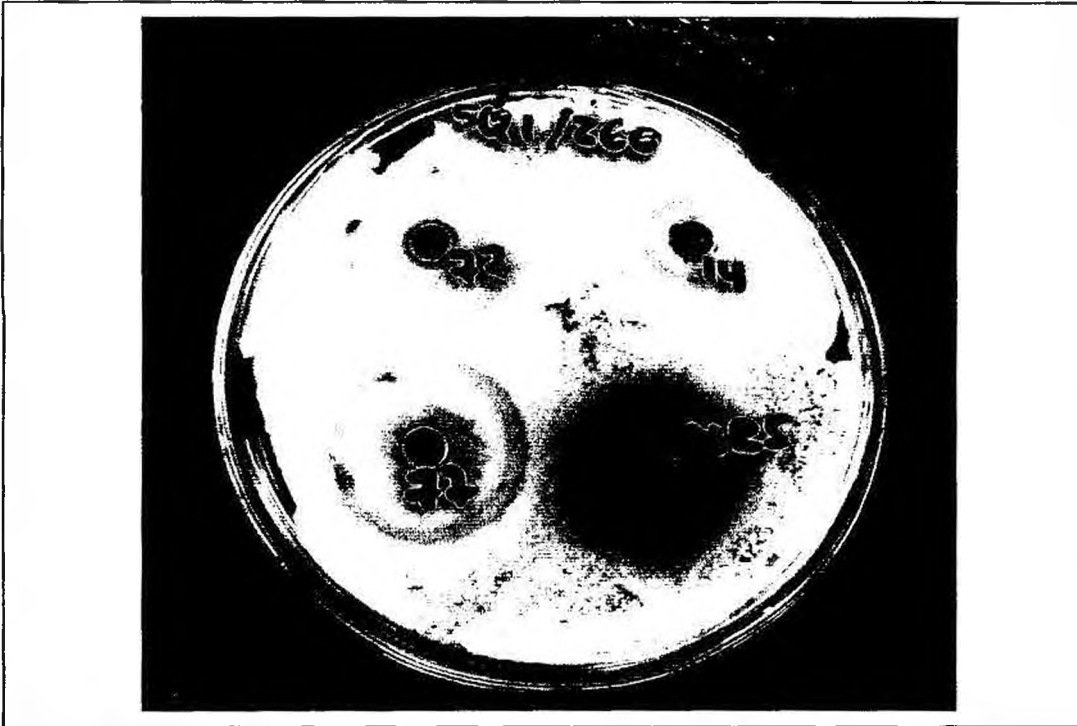


Figura 3.20. Efecto antagónico de los sobrenadantes de *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR (77) y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextransicum* 14cVCOR (14) sobre la cepa de *Debaryomyces polymorphus* 5Q1/260

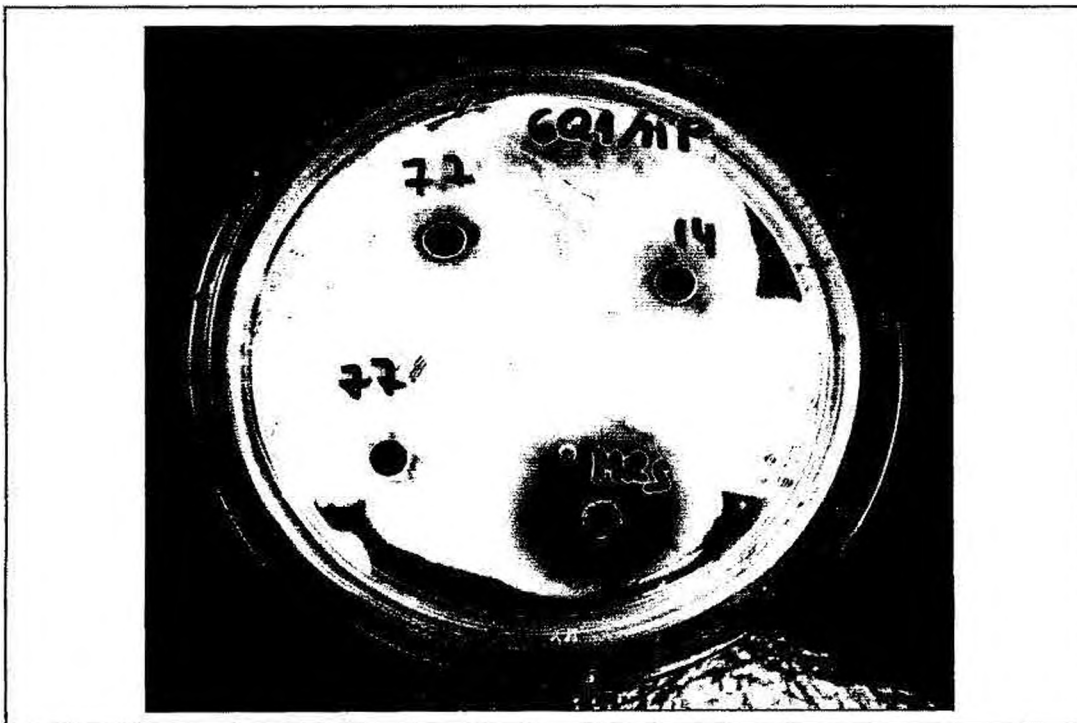


Figura 3.21. Efecto antagónico de los sobrenadantes de *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR (77) y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextransicum* 14cVCOR (14) sobre la cepa de *Debaryomyces vanriijiae* 6Q1/11P

Cuando se aplicó el método de difusión en agar, se observaron respuestas disímiles por parte de las levaduras ensayadas.

- El sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR inhibió el desarrollo de tres de las cuatro cepas estudiadas, resultando diferente la intensidad de dicho efecto inhibitorio sobre la cepa *Debaryomyces polymorphus* (5Q1/26O) con un halo de 9,50 mm (Fig. 3.20). Durante las primeras horas de incubación el efecto inhibitorio fue intenso, luego el halo fue invadido por *Debaryomyces polymorphus*, lo que indicaría, en principio, una acción bacteriostática del sobrenadante. Con respecto a las cepas de *Debaryomyces vanriijiae* (6Q1/11P) y *Candida blankii* (2Q1/10P) los halos fueron de 8,50 mm y 7,00 mm, respectivamente. *Candida blankii* 2L1P no evidenció efecto antagónico.
- El sobrenadante proveniente del crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 14cVCOR mostró una débil actividad antagónica. Frente a las cepas 2Q1/10P y 6Q1/11P, los halos de inhibición fueron de 7,00 mm y 6,50 mm respectivamente. El crecimiento de la cepa 2L1P de *Candida blankii*, no fue inhibida por este sobrenadante. En cambio, su efecto inhibitorio sobre *Debaryomyces polymorphus* (5Q1/26O) fue un halo de inhibición (Fig. 3.20) igual 8,00 mm.
- Los sobrenadantes provenientes del crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 35cVCOR y *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 166cVCOR prácticamente no mostraron actividad antagónica. El primero sólo inhibió una cepa, la misma que mostró mayor sensibilidad a los sobrenadantes anteriores: *Debaryomyces polymorphus* 5Q1/26O, pero con un efecto mucho menor [halo de inhibición igual a 7,00 mm de diámetro].

El mayor efecto inhibitorio, sobre las distintas cepas de levaduras, aunque con pequeño grado de inhibición, lo provocó el sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR. Sin embargo, éste tampoco fue capaz de inhibir el crecimiento de la cepa de levadura resistente a todos los sobrenadantes empleados: *Candida blankii* 2L1P aislada de leche.

Cepas de una misma especie, *Candida blankii*, mostraron diferentes sensibilidades a los sobrenadantes de las bacterias lácticas estudiadas, esto implica que la acción antagónica es una propiedad dependiente de cada cepa en particular.

El efecto inhibitorio observado no puede ser atribuido a elevadas concentraciones de ácido láctico, dado que los sobrenadantes libres de células fueron obtenidos en medios tamponados donde la concentración de ácido láctico libre es baja y los aislamientos ensayados fueron elegidos, entre otras propiedades, por evidenciar resistencia a concentraciones del 3 % de este ácido (ver Tablas 3.19 y 3.22). Tampoco puede atribuirse a la concentración de iones hidrógeno libres, ya que en los sobrenadantes, el pH varió entre 5,2 y 6,0, y todas las cepas fueron capaces de desarrollar a valores de hasta 4,7.

Por lo tanto, la pequeña capacidad antagónica de las bacterias lácticas del fermento "Gaucho" comprobada para las cepas de levaduras 5Q1/26O, 6Q1/11P y 2Q1/10P podría ser atribuida a metabolitos producidos por las cepas de bacterias lácticas, pudiendo tratarse de bacteriocinas o sustancias tipo bacteriocinas que son también las responsables de su acción antibacteriana.

Los resultados obtenidos utilizando el método de difusión en agar, no deben necesariamente coincidir con los hallados mediante el método de estrías cruzadas, dado que en este último, sólo se observa el efecto de bacterias lácticas que desarrollan en la superficie de medios sólidos, mientras que en el primero se emplean sobrenadantes libres de células que han sido obtenidos de cultivos sumergidos en caldos definidos y concentrados diez veces. En consecuencia, los productos inhibitorios pueden ser diferentes debido a que las condiciones de desarrollo no son las mismas en las dos metodologías y además, los metabolitos actuantes se encuentran, en un caso, diez veces concentrados.

El método de estrías cruzadas se aconseja como técnica de selección o "screening" preliminar (Baraggio, 2000) para determinar la compatibilidad entre cepas de levaduras y bacterias lácticas que deben desarrollar en forma conjunta y simultánea en un mismo sustrato, como es el caso de los quesos madurados con la adición de levaduras como

adjunto. Por ello, esta técnica de interacciones antagónicas fue la primera en realizarse cuando se emprendieron los estudios de inhibición.

Por otro lado, el método de difusión en agar (Baraggio, 2000) es más adecuado para proceder a una selección final o definitiva de cepas compatibles. Sin embargo, las condiciones de ensayo no son las mismas a las que se imponen en un producto lácteo o en el queso durante su maduración, donde las interacciones poblacionales son más complejas.

Debido a esto y para realizar una selección final de las cepas compatibles en condiciones más cercanas a las que prevalecen en el cuerpo del queso se realizó el crecimiento asociativo en leche (cultivos conjuntos), de algunas cepas de levaduras y de bacterias del fermento utilizado en la elaboración del QAC.

3.6.2. Estimulación o inhibición del crecimiento de levaduras por bacterias lácticas

Las Figs. 3.22 y 3.23 muestran el crecimiento de las cepas de levaduras *Debaryomyces vanriijiae* (6Q1/11P), *Debaryomyces polymorphus* (5Q1/260) y *Candida blankii* (2L1P, 2Q1/10P) en cultivos puros y en crecimiento asociativo en leche con las bacterias lácticas constituyentes del fermento "Gaucha".

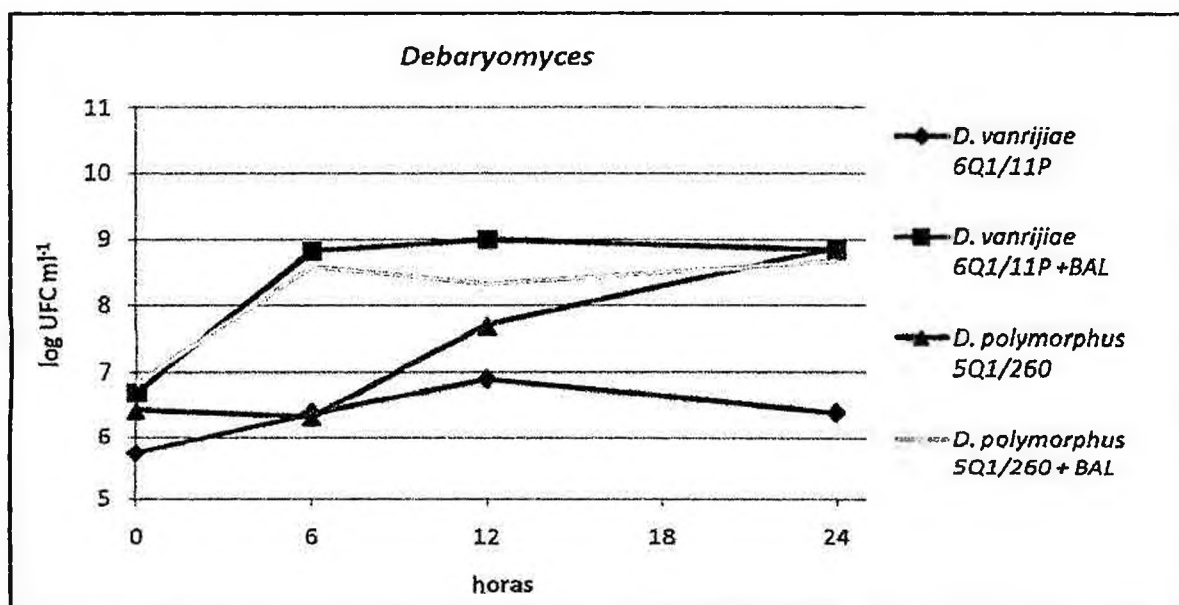


Figura 3.22. Cinéticas de crecimiento de *Debaryomyces* en cultivos puros y mixtos con bacterias lácticas (BAL) del fermento Gaucha

El crecimiento de *Debaryomyces vanriijiae* 6Q1/11P fue estimulado por la presencia de bacterias lácticas del fermento durante todo el período de incubación, observándose un efecto más marcado durante las primeras 12 h. Los recuentos poblacionales de los cultivos conjuntos superaron, entre 0,96 y 2,44 unidades logarítmicas, a los correspondientes recuentos de los cultivos puros.

Debaryomyces polymorphus 5Q1/26O mostró una intensificación en el crecimiento, que resultó muy marcada durante las primeras 6 h, la misma se revierte a partir de ese momento evidenciando velocidades de crecimiento prácticamente nulas. Los recuentos correspondientes a la etapa final del período de incubación del cultivo asociativo y el cultivo puro no presentaron diferencias significativas, dado que la cepa pura tuvo una elevada velocidad a partir de las 6 h de cultivo.

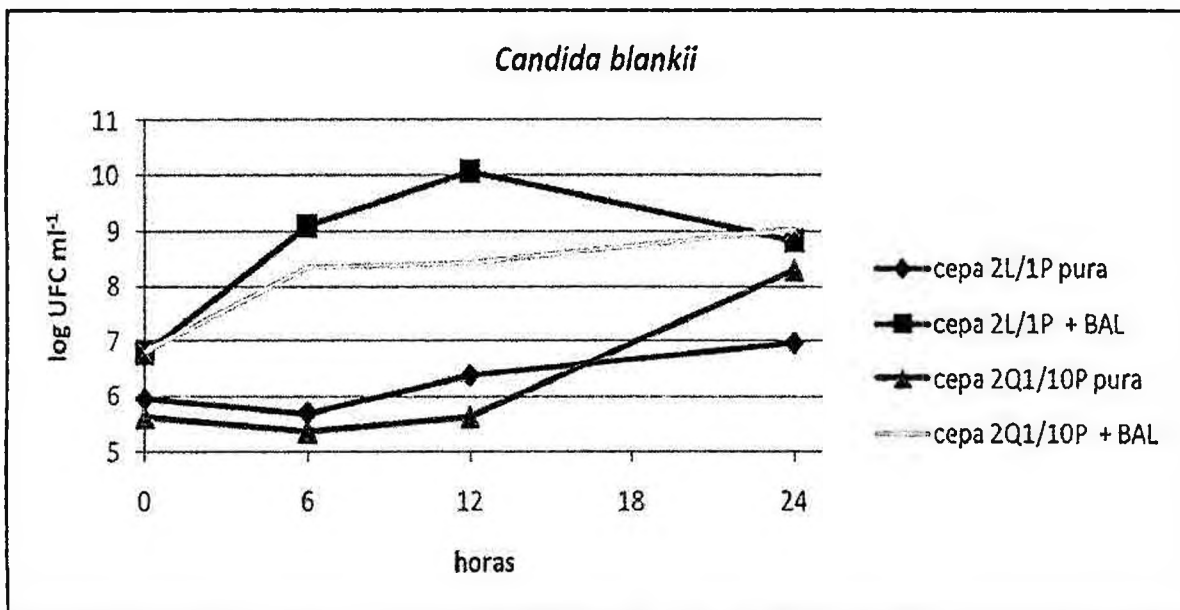


Figura 3.23. Cinéticas de crecimiento de *Candida blankii* en cultivos puros y mixtos con bacterias lácticas (BAL) del fermento Gaucho

Para la cepa *Candida blankii* 2L1P se comprobó una acentuada estimulación del crecimiento entre las 0 y 12 h de cultivo, con diferencias en los recuentos cercanos a cuatro (3,70) unidades logarítmicas respecto a los cultivos puros. A partir de las 12 h, la levadura ingresa a la fase estacionaria con disminución de la velocidad de crecimiento. La población de levaduras en cultivos asociativos correspondiente a la etapa final de la incubación superó a la generada en los cultivos puros en 2 unidades logarítmicas. Estos

resultados coinciden completamente con los registrados mediante el método de difusión en agar, dado que esta cepa fue la única que no presentó ningún tipo de inhibición frente a los distintos sobrenadante ensayados.

También, se observó una estimulación desde el inicio del cultivo asociativo por parte de las bacterias lácticas frente a *Candida blankii* 2Q1/10P, acción que se mantuvo hasta el fin de la incubación.

Estos resultados son discordantes con los obtenidos mediante los ensayos de difusión en agar realizados previamente. Particularmente, el sobrenadante libre de células (concentrado diez veces) de *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR, integrante del fermento "Gaucha", mostró un efecto bacteriostático frente a *Debaryomyces polymorphus*. En los cultivos asociativos en leche, este efecto se anula, ya que se empleó el fermento (integrado por ocho cepas) y no la cepa de *L. plantarum* pura.

Estos resultados son discrepantes a los informados por otros autores (Baraggio, 2000; Gadaga *et al.*, 2001), quienes indicaron inhibiciones de bacterias lácticas sobre levaduras, llevadas a cabo en cultivos conjuntos en leche.

A fin de evaluar el efecto de las cepas de levaduras seleccionadas sobre las bacterias lácticas constituyentes del fermento, también se determinó el perfil de crecimiento de éstas en estado puro y en cultivos conjuntos.

La Fig. 3.24 muestra las cinéticas de crecimiento de la mezcla de las ocho cepas incluidas en el fermento en cultivos asociativos con las diferentes cepas de levaduras y sin ellas.

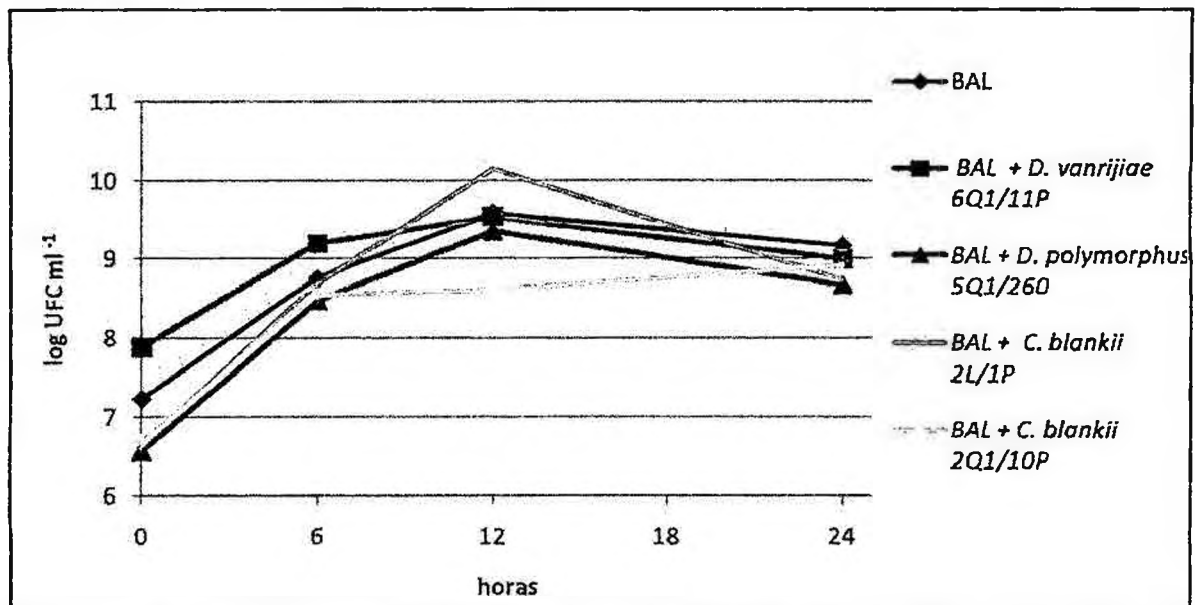


Figura 3.24. Cinéticas de crecimiento de bacterias lácticas (BAL) del fermento en cultivos puros y en conjunto con diferentes cepas de levaduras

No se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre la mayoría de los puntos constituyentes de las curvas de los perfiles de crecimiento de bacterias lácticas en cultivos conjuntos con levaduras y cultivos puros. Lo cual demuestra que las cepas de levaduras no estimulan pero tampoco inhiben el crecimiento de las bacterias lácticas del fermento.

Estos resultados coinciden con los datos presentados por otros autores para cultivos conjuntos en leche de *Lactococcus lactis* y *Candida kéfir* (Gadaga *et al.*, 2001). Neviani *et al.* (2001) tampoco informaron inhibiciones en el crecimiento de BAL, efectuados en cultivo conjunto en leche, por parte de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, incluso hallaron una disminución en el tiempo de la fase lag junto con un incremento en la velocidad máxima de crecimiento de las BAL en co-cultivos.

Esta condición es indispensable para que las cepas de levaduras puedan ser utilizadas como adjunto al cultivo iniciador en elaboración del QAC, dado que no podrán ser empleadas si se evidenciaran un efecto inhibitorio sobre las cepas del fermento.

3.7. Estimulación de propiedades tecnológicas deseadas

3.7.1. Métodos cualitativos

En las Tablas 3.29 y 3.30 se aprecia el efecto producido por el desarrollo conjunto de las ocho cepas de bacterias lácticas del fermento (en las proporciones indicadas en la Tabla 2.1) sobre la capacidad de cada una de las cepas de levaduras para degradar lípidos y proteínas.

Tabla 3.29. Actividad lipolítica de cepas de levaduras en cultivos puros y en cultivos mixtos con las bacterias lácticas del fermento Gaucho

Cepa	Actividad lipolítica (diámetro de lipólisis)	
	levadura	levadura + bacterias lácticas del fermento
<i>Candida blankii</i> 2Q1/10P	1,0 cm	1,0 cm
<i>Candida blankii</i> 2L1P	0,9 cm	0,9 cm
<i>Debaryomyces vanriijiae</i> 6Q1/11P	1,2 cm	1,2 cm
<i>Debaryomyces polymorphus</i> 5Q1/260	4,9 cm	4,9 cm

No se observaron incrementos en la actividad lipolítica de ninguna de las cuatro cepas de levaduras estudiadas cuando fueron co-cultivadas con la mezcla de las ocho cepas de bacterias lácticas del fermento.

Los resultados obtenidos en los ensayos de lipólisis se contraponen a los informados por autores nacionales (Baraggio, 2000) quienes hallaron aumentos en el metabolismo lipolítico en cepas de levaduras que presentaban baja actividad.

Tabla 3.30. Actividad proteolítica de cepas de levaduras en cultivos puros y en cultivos mixtos con las bacterias lácticas del fermento Gaucho

Cepa	Actividad proteolítica (diámetro de proteólisis)	
	levadura	levadura + bacterias lácticas del fermento
<i>Candida blankii</i> 2Q1/10P	0,0 cm	0,0 cm
<i>Candida blankii</i> 2L1P	0,0 cm	0,0 cm
<i>Debaryomyces vanriijiae</i> 6Q1/11P	0,0 cm	1,1 cm
<i>Debaryomyces polymorphus</i> 5Q1/260	1,2 cm	2,0 cm

Las cepas de levaduras pertenecientes al género *Debaryomyces* mostraron un incremento en la actividad proteolítica en los cultivos conjuntos con las cepas de bacterias lácticas del fermento.

Dado que una de las cepas del fermento, *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR es capaz de degradar proteínas (Vasek, 2003) se evaluó simultáneamente y en iguales condiciones la actividad proteolítica de esta cepa pura. Los halos formados por los cultivos conjuntos en leche de las bacterias lácticas y las cepas *Debaryomyces vanriijiae* 6Q1/11P y *Debaryomyces polymorphus* 5Q1/260 fueron más claros y presentaron mayor diámetro que los observados en el ensayo con *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR puro (datos no mostrados). Por lo tanto, se podría decir que se produjo una estimulación en la actividad proteolítica de la levadura por parte de las bacterias lácticas o viceversa, una estimulación de la actividad proteolítica del lactobacilo (única integrante del fermento con actividad proteolítica) por las cepas de levaduras; o incluso ambas situaciones simultáneamente.

Con respecto a la intensificación en la actividad proteolítica, los resultados coinciden con los informados por otros autores (Baraggio, 2000).

3.7.2. Métodos cuantitativos

La estimulación de la actividad proteolítica en cultivos conjuntos se evaluó cuantitativamente aplicando el ensayo espectrofotométrico con aldehído ftálico (OPA), sobre cultivos de los microorganismos en leche.

Los resultados corresponden a lecturas de DO realizadas a 340 nm contra blanco de reactivo (leche estéril).

Para el cálculo de los resultados se utilizaron las siguientes fórmulas (Church *et al.*, 1983).

$$n' = \Delta A_{340nm} / \epsilon \cdot M \cdot F$$

Donde:

n' : número de enlaces peptídicos hidrolizados en el tiempo de reacción.

ΔA : variación de la absorbancia observada experimentalmente a 340nm.

ϵ : absortividad molar de grupos α y ϵ amino medidos a 340 nm ($M^{-1} cm^{-1}$).

M : concentración molar de proteínas (mol/ litro).

F : factor de dilución.

Los cálculos se realizaron de acuerdo con un valor promedio del peso molecular (PM) de las caseínas (α_{s1} :23.000 g/mol; β : 25.000 g/mol; k: 19.000 g/mol). En función de estos valores, el PM promedio de las caseínas es de 22.000 g/mol.

Según datos del proveedor, la leche descremada en polvo tiene una concentración de 35 gramos de proteína cada 100 gramos de leche deshidratada, y teniendo en cuenta que para el ensayo ésta ha sido reconstituida al 10 % (p/v), resulta que:

$$M = 0,00159 \text{ mol /litro.}$$

$$F = 0,005.$$

Además, según Church *et al.* (1983) el valor de ϵ es:

$$\epsilon = 6000 M^{-1} cm^{-1}.$$

y

$$\% H = n' \cdot 100 / n$$

Donde:

% H: porcentaje de hidrólisis.

n': número de uniones peptídicas hidrolizadas en el tiempo de reacción.

n: número inicial de uniones peptídicas (para las caseínas se considera un valor igual a 200).

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y los resultados se expresaron como promedios de los valores individuales obtenidos en cada determinación. Los mismos se detallan en las Tablas 3.31 y 3.32.

Tabla 3.31. Actividad proteolítica, expresada como porcentaje de hidrólisis (%H), número de enlaces peptídicos hidrolizados (n') y valores experimentales de absorbancia para las cepas de levaduras y *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR en cultivos puros

Cepa	Abs.	n'	% H
<i>Candida blankii</i> 2Q1/10P	0,031	0,650	0,3
<i>Candida blankii</i> 2L1P	0,000	-	0,0
<i>Debaryomyces vanrijae</i> 6Q1/11P	0,000	-	0,0
<i>Debaryomyces polymorphus</i> 5Q1/26O	0,104	2,18	1,1
<i>Lactobacillus plantarum</i> 77bVCOR	0,054	1,13	0,6

Tabla 3.32. Actividad proteolítica, expresada como porcentaje de hidrólisis (% H), número de enlaces peptídicos hidrolizados (n') y valores experimentales de absorbancia para las cepas de levaduras en cultivos conjuntos con *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR

Cepa	levaduras + <i>Lactobacillus plantarum</i> 77bVCOR		
	Abs.	n'	% H
<i>Candida blankii</i> 2Q1/10P	0,092	1,93	1,0
<i>Candida blankii</i> 2L1P	0,044	0,92	0,5
<i>Debaryomyces vanrijiae</i> 6Q1/11P	0,011	0,23	0,1
<i>Debaryomyces polymorphus</i> 5Q1/26O	0,191	4,00	2,0

Al evaluar la actividad proteolítica de estas cuatro cepas de levaduras puras a través del método Opa test se encontró que *Debaryomyces polymorphus* 5Q1/26O, presentaba una considerable actividad proteolítica por sí misma. Asimismo, la cepa de *Candida blankii* 2Q1/10P mostró una baja absorbancia que podría implicar cierto grado de actividad proteolítica no detectada por el método cualitativo.

En el cultivo asociativo de *Debaryomyces polymorphus* 5Q1/26O con *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR, se registraron valores de absorbancia superiores a la suma de las observadas en cada cultivo puro por separado, por lo tanto la actividad proteolítica fue estimulada en el cultivo asociativo.

En cultivos conjuntos de *Candida blankii* 2Q1/10P y el lactobacilo, la actividad proteolítica se vió incrementada levemente en relación a la que poseían los cultivos individuales.

Estos resultados sólo coinciden con los hallados en el caso en particular de la cepa *Debaryomyces polymorphus* 5Q1/26O cuando se empleó el método cualitativo mediante el cual también evidenció estimulación en su actividad hidrolítica sobre la caseína.

3.8. Elaboración de quesos a escala de laboratorio usando el fermento “Gaucha” con la adición de levaduras como adjunto. Análisis sensorial.

Se midió la **Aceptabilidad Sensorial** de seis quesos artesanales de Corrientes elaborados con el agregado del fermento “Gaucha”: a cinco de ellos se le adicionaron cinco cepas diferentes de levaduras como adjunto en forma individual. El sexto queso, sin la adición de levaduras, fue usado como control.

3.8.1. Microorganismos

Las cepas de levaduras empleadas fueron:

- *Debaryomyces vanriijiae* (6Q1/11P)
- *Debaryomyces polymorphus* (5Q1/26O)
- *Candida blankii* (2L1P, 2Q1/10P)
- *Candida santjacobensis* (4Q1/25O)

Las cepas de bacterias lácticas constituyentes del fermento y los controles realizados sobre las mismas fueron descriptos en el ítem 3.1.1.

3.8.2. Quesos Artesanales de Corrientes a escala de laboratorio

Se obtuvieron seis quesos de un tamaño promedio de 500 g con 15 días de maduración (Figura 3.25, 3.26, 3.27, 3.28 y 3.29).

Cada queso elaborado con la adición de levaduras como adjunto recibió la denominación indicada en la Tabla 3.33.

Tabla 3.33. Denominación asignada a cada QAC elaborado con la adición de levaduras

Denominación del queso	Cepa de levadura adicionada como adjunto
queso 1	<i>Debaryomyces vanriijiae</i> 6Q1/11P
queso 2	<i>Candida blankii</i> 2L1P
queso 3	<i>Candida blankii</i> 2Q1/10P
queso 4	<i>Debaryomyces polymorphus</i> 5Q1/26O
queso 5	<i>Candida santjacobensis</i> 4Q1/25O

El queso elaborado sin la adición de levaduras se llamó queso control.



Figura 3.25. Quesos Artesanales de Corrientes elaborados a escala de laboratorio

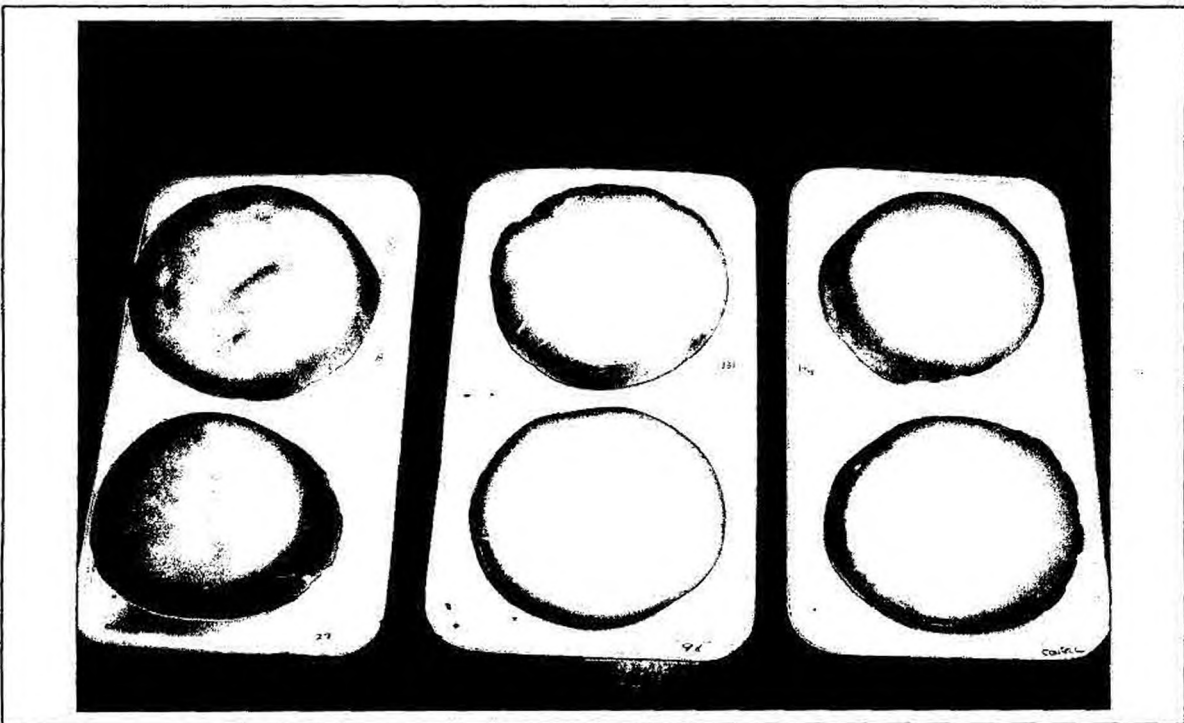


Figura 3.26. Quesos Artesanales de Corrientes elaborados a escala de laboratorio

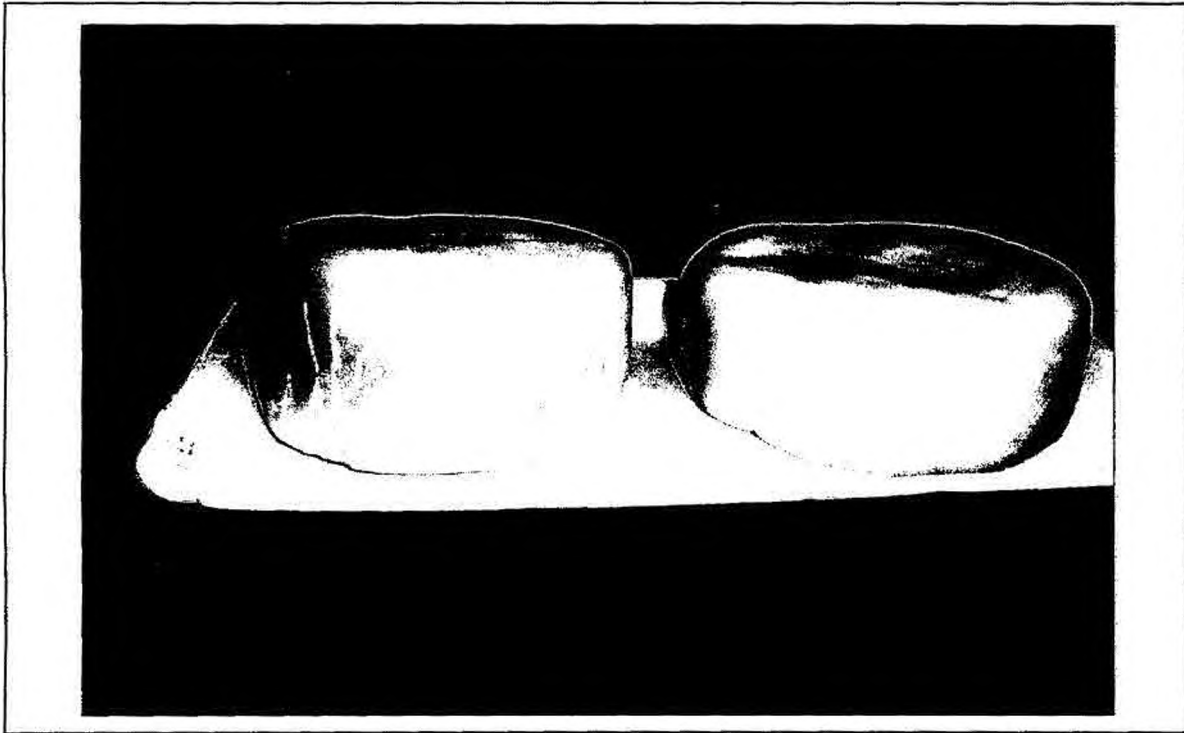


Figura 3.27. Quesos artesanales de Corrientes: queso 5 (izq.) y queso 4 (der.)

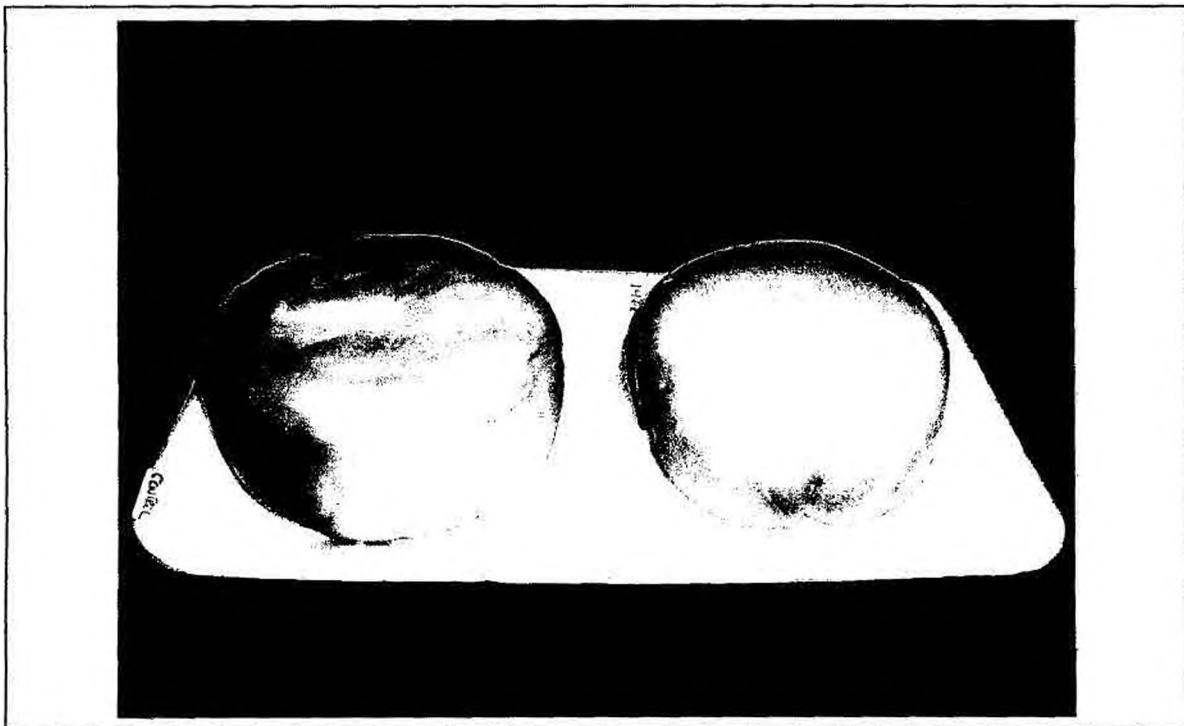


Figura 3.28. Quesos artesanales de Corrientes: queso control (izq.) y queso 2 (der.)

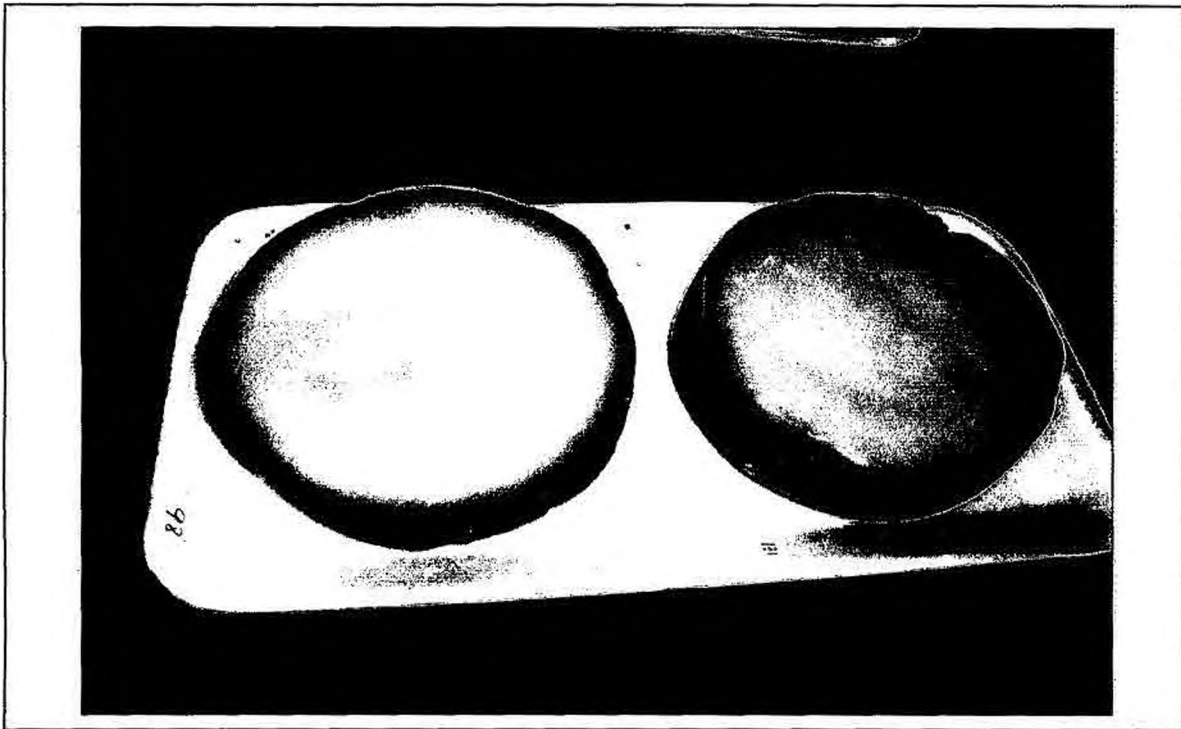


Figura 3.29. Quesos artesanales de Corrientes: queso 3 (izq.) y queso 1 (der.)

3.8.3. Análisis sensorial

Se estudió la aceptabilidad sensorial empleando dos métodos:

- Ordenamiento de preferencia
- Escala hedónica

3.8.3. a Ordenamiento de preferencia

Se solicitó a los consumidores que ordenaran las muestras de quesos según el orden de preferencia, indicando el número de la muestra que más les gustara a la izquierda siguiendo, hacia la derecha, con las que les gustaran menos. Se evaluó la aceptabilidad global, la textura y el sabor - aroma.

A la muestra a la cual se asignara el primer lugar se le fijó un valor igual a seis, a la siguiente un valor de cinco y así sucesivamente.

A fin de determinar la existencia de diferencias significativas entre los distintos quesos se realizó el análisis estadístico de los resultados a través del test de Friedman (Newell y MacFarlane, 1987) con un grado de confianza del 95 % empleando el software

Infostat (2002). V1.1. Este test determina si las sumas de los ordenamientos totales para cada muestra difieren significativamente.

Las Tablas 3.34, 3.35 y 3.36 presentan los resultados hallados.

Tabla 3.34. Test de Friedman de los puntajes del ranking de preferencia global obtenidos por los diferentes quesos evaluados (Mínima diferencia significativa entre suma de rangos: 29,094)

Queso	Suma	Media	n	
1	104	3,47	30	A
2	103	3,43	30	A
3	102	3,40	30	A
4	108	3,60	30	A
5	104	3,47	30	A
control	109	3,63	30	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Tabla 3.35. Test de Friedman de los puntajes del ranking de preferencia del atributo textura obtenidos por los diferentes quesos evaluados (Mínima diferencia significativa entre suma de rangos: 28,894)

Queso	Suma	Media	n	
1	110	3,67	30	A
2	101	3,37	30	A
3	94	3,13	30	A
4	114	3,80	30	A
5	103	3,43	30	A
control	108	3,60	30	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Tabla 3.36. Test de Friedman de los puntajes del ranking de preferencia del atributo sabor aroma obtenidos por los diferentes quesos evaluados. (Mínima diferencia significativa entre suma de rangos: 28, 923)

Queso	Suma	Media	n	
1	109	3,63	30	A
2	104	3,47	30	A
3	104	3,47	30	A
4	98	3,27	30	A
5	99	3,30	30	A
control	116	3,87	30	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Tanto para la aceptabilidad global, la textura y el sabor aroma no se hallaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la prueba de ranking de preferencia entre los seis quesos estudiados.

En relación a las razones por las que los consumidores preferían un determinado queso, en primer lugar, se generó mayor coincidencia en las características de textura: en general les gustaba la textura cremosa, firme y suave. En cuanto al sabor-aroma, hubo quienes optaron por los quesos de sabor suave y “no picante”, otros escogieron los quesos de sabor ácido, mientras que otros consumidores tuvieron predilección por los quesos de sabor fuerte, picante y salado. Esta gran variedad de preferencias indica que, si bien ningún queso fue rechazado, es necesario continuar con estudios sensoriales utilizando jueces entrenados capaces de identificar las características típicas del QAC.

3.8.3. b Ensayo de aceptabilidad utilizando escala hedónica

Las Figs. 3.30, 3.31 y 3.32 muestran la distribución de frecuencias de las preferencias de los atributos: preferencia global, textura y sabor-aroma respectivamente.

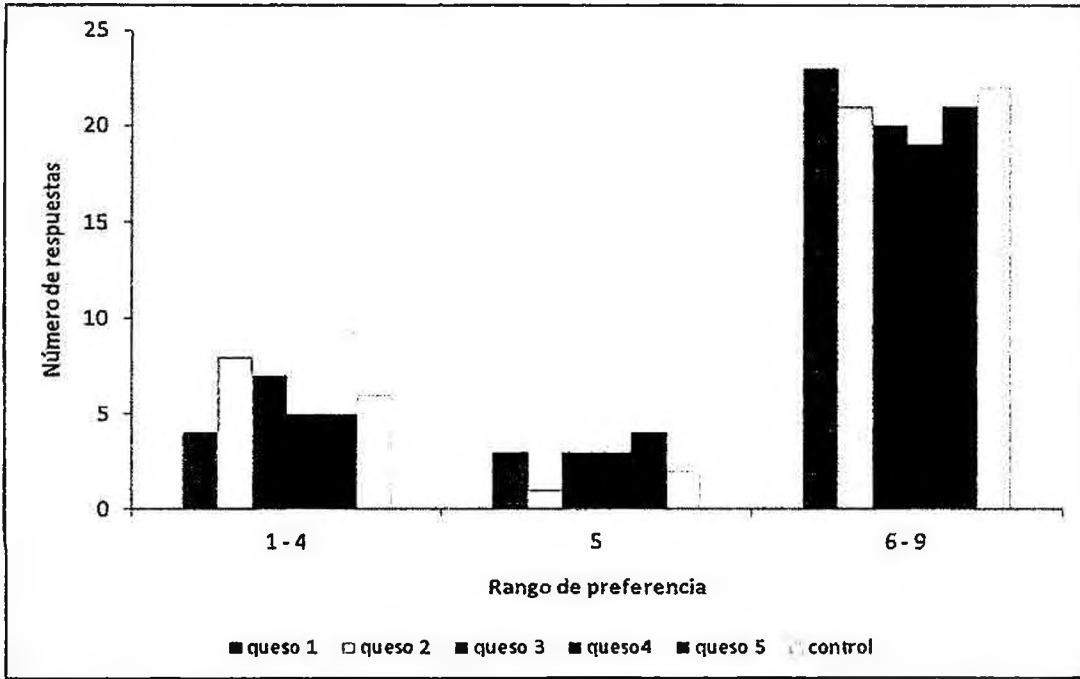


Figura 3.30. Distribución de frecuencias de la preferencia global

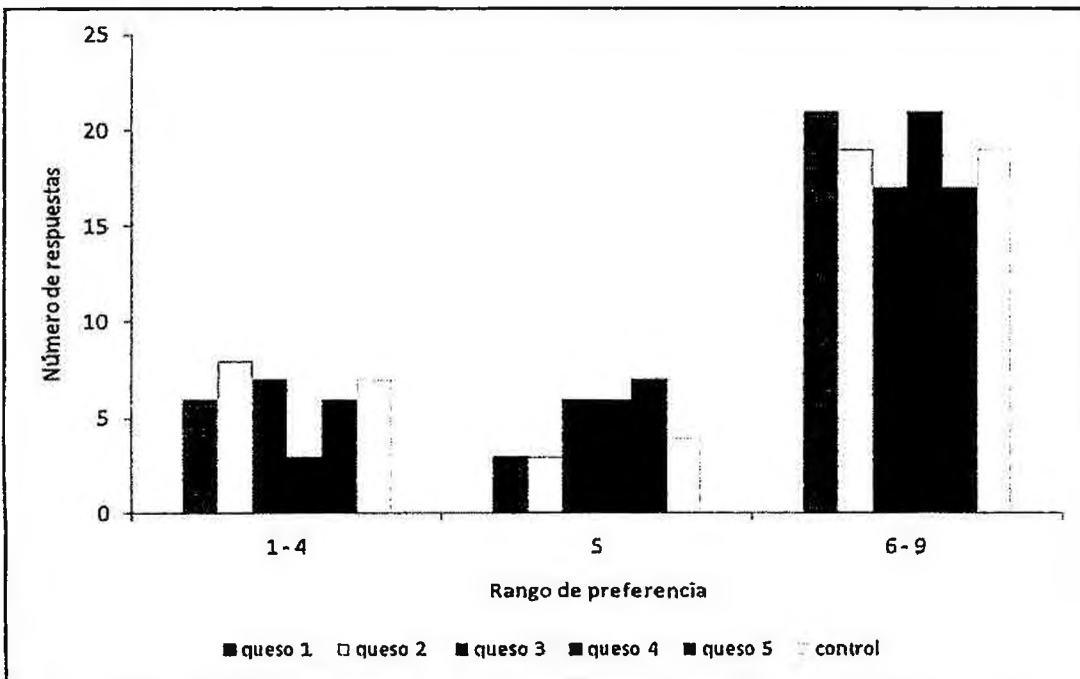


Figura 3.31. Distribución de frecuencias de la preferencias del atributo textura

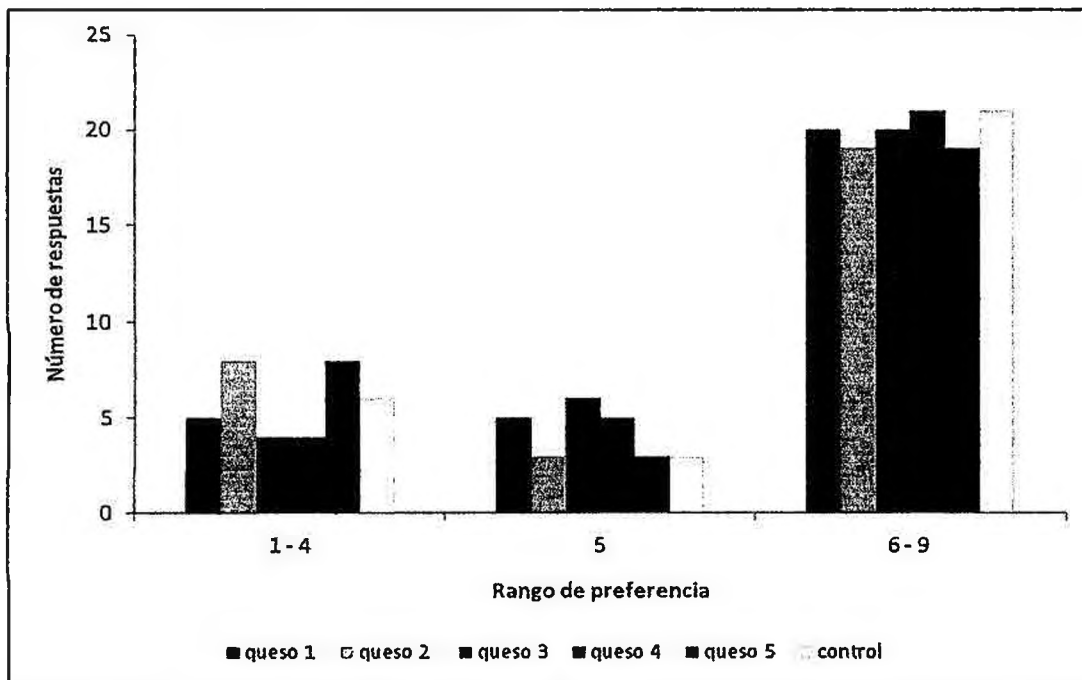


Figura 3.32. Distribución de frecuencias de la preferencias del atributo sabor aroma.

Se puede apreciar que todos presentan mayores frecuencias en el rango de preferencia 6-9. Este rango en la escala hedónica implica aceptación sensorial, mientras que el valor igual a 5 significa indiferencia y debajo de 5, disgusto. En consecuencia, todos los quesos evidenciaron una aceptación por parte de los consumidores.

Se realizó el análisis estadístico mediante MANOVA, con un grado de confianza del 95 % empleando el software Infostat (2002). V1.1.

Los resultados se pueden apreciar en la Tabla 3.37.

Tabla 3.37. Análisis multivariado de los puntajes relativos obtenidos por los diferentes quesos evaluados. Test de comparación de Hotelling ($\alpha \leq 0,05$)

Queso	aceptabilidad global	sabor aroma	textura	n	
1	6,67	6,33	6,23	30	A
2	6,43	6,20	6,13	30	A
3	6,30	6,47	5,87	30	A
4	6,53	6,60	6,33	30	A
5	6,67	6,17	5,87	30	A
control	6,57	6,70	6,00	30	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Estos resultados también demuestran que todos los quesos presentaron un buen grado de aceptabilidad entre los consumidores con valores promedios de satisfacción entre 6,67 y 6,30 en una escala de 1 a 9. Esto indica que las levaduras adicionadas no producen defectos en los quesos que alteren las características sávido-aromáticas ni la textura. Estos efectos deberían producir rechazo del producto por parte de los evaluadores.

Los quesos 2 y 4 superaron al control en el atributo textura, el 5 lo hizo en la aceptabilidad global y el 1 en ambas características. Sin embargo, el análisis estadístico (Tabla 3.37) reveló que no existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en las características organolépticas entre los diferentes quesos elaborados, incluido el queso control.

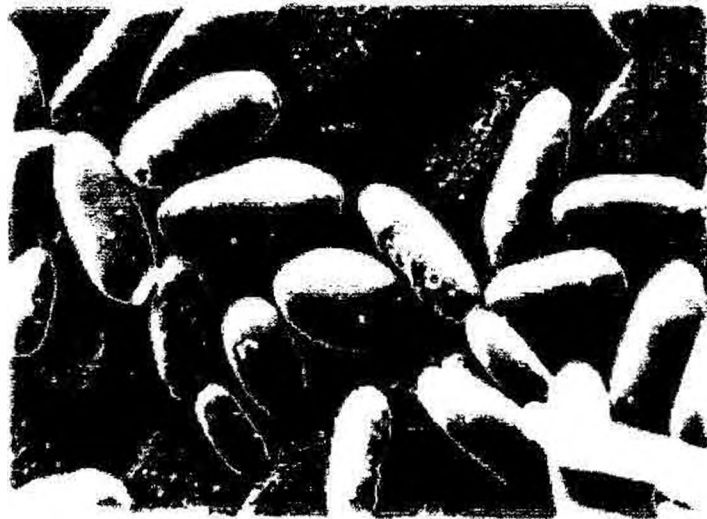
De acuerdo a los resultados obtenidos, tanto en la prueba de ranking de preferencia como en el ensayo de aceptabilidad empleando una escala hedónica, podemos afirmar que todos los quesos fueron equivalentes en preferencia dentro de la población ensayada sin evidenciar rechazo por parte de los consumidores, con lo cual no se descarta ninguno de ellos para futuros ensayos sensoriales descriptivos con jueces entrenados.

Estos resultados son muy auspiciosos dado que manifiestan que ninguna de las levaduras genera alteraciones en el sabor-aroma ni en la textura del producto y por lo tanto no influyen negativamente en la maduración de estos quesos.

Es necesario profundizar el análisis sensorial a través de ensayos descriptivos con jueces entrenados además del estudio cuali y cuantitativo de los compuestos que influyen sobre el desarrollo de las características organolépticas de los quesos elaborados con levaduras como adjuntos al cultivo iniciador.

Capítulo 4

Conclusiones



Conclusiones

En función de los resultados obtenidos a través del desarrollo del trabajo experimental, se pueden formular las siguientes conclusiones:

- La metodología empleada para la conservación, activación, purificación y control de las cepas de bacterias lácticas ensayadas ha resultado adecuada, dado que no se observaron contaminantes ni alteraciones detectables durante el período de trabajo. Del mismo modo, la metodología usada para la conservación, activación, purificación y control de las cepas de levaduras estudiadas también resultó adecuada, ya que no se detectaron contaminantes.
- La biota levaduriforme siempre estuvo presente durante la elaboración de los Quesos Artesanales de Corrientes con valores entre $10^3 - 10^7$ UFC ml⁻¹ ó g⁻¹.
- Las especies de levaduras predominantes en leche cruda empleada en la elaboración del Queso Artesanal de Corrientes corresponden al género *Candida*, especialmente *Candida santjacobensis*.

En agente coagulante se observó un notable predominio del género *Candida*, principalmente *Candida santjacobensis*, y en una proporción mucho menor se encuentra el género *Myxozyma*.

En cuajada, el género mayoritario fue *Debaryomyces*, siendo *D. polymorphus* la especie más abundante.

En quesos, se encontraron representantes de los mismos géneros detectados en las materias primas. Además, se aislaron cepas del género *Staphanoascus*. Es de destacar que *Candida* también fue en este caso el género mayoritario.

Estos resultados proveen una indicación, al menos preliminar, acerca del origen o procedencia de los géneros y especies de levaduras presentes en la elaboración y maduración de los Quesos Artesanales de Corrientes.

- En lo que respecta a la caracterización tecnológica de las cepas aisladas, todas o la gran mayoría de ellas han resultado capaces de desarrollar bajo diversas condiciones: temperaturas entre 5 y 37 °C, pH entre 4,7 y 5,5, concentraciones de lactosa del 1, 2 y 3 %(p/v), concentraciones de ácido láctico de 1, 2 y 3 %(p/v). Todas las cepas estudiadas, excepto las pertenecientes al género *Rhodotorula*, fueron capaces de

crecer en concentraciones de cloruro de sodio del 10 % (p/v). Un gran número de las mismas, también han resultado capaces de multiplicarse en concentraciones de cloruro de sodio de 15 y 20 % (p/v).

Esto demuestra que la mayoría de los aislamientos pueden crecer y ejercer su actividad metabólica en las condiciones micro-ambientales existentes en la elaboración y maduración del Queso Artesanal de Corrientes.

- En lo que se refiere a las propiedades de interés tecnológico estudiadas, se ha comprobado cierta diversidad entre especies y aún entre cepas para algunas de ellas, tales como actividad proteolítica y degradación de aminoácidos. Para otras, tales como la asimilación de lactosa y aminos biógenas, se constató prácticamente una total coincidencia de todos los aislamientos, que resultaron igualmente capaces de metabolizar estos compuestos.

La mayoría de los géneros estudiados incluyeron aislamientos capaces de hidrolizar la tributirina, con actividad lipolítica media a intensa. Esta característica es muy importante debido a que las cepas de bacterias lácticas del cultivo iniciador no son lipolíticas; y, por lo tanto las levaduras podrían complementar la actividad metabólicas de las mismas.

Por lo tanto, el estudio en particular de estas propiedades tecnológicas, es de fundamental importancia como paso previo a la selección de cepas que podrían ser empleadas como adjunto al fermento "Gaucho".

- En los ensayos efectuados para detectar probables interacciones entre levaduras y bacterias lácticas, se han obtenido resultados disímiles. Cuando se aplicaron técnicas de screening preliminar de estrías cruzadas no se observó efecto inhibitorio en ninguna de las cepas de levaduras estudiadas. En cambio, al emplear el método de difusión en agar se apreciaron pequeños halos de inhibición cuando los sobrenadantes de las cepas de *Lactobacillus plantarum* 77bVCOR y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 14cVCOR, ambos integrantes del fermento "Gaucho", fueron ensayados frente a las cepas de levaduras: *Debaryomyces vanriijiae* 6Q1/11P, *Debaryomyces polymorphus* 5Q1/26O y *Candida blankii* 2Q1/10P y *Candida blankii* 2L1P. Cuando se estudió el crecimiento asociativo en leche, todas las cepas de

levaduras ensayadas experimentaron una estimulación del crecimiento por las bacterias lácticas constituyentes del fermento en una determinada etapa del cultivo. Ninguna de las bacterias lácticas del fermento fueron inhibidas por la presencia de levaduras en cultivos conjuntos en leche.

Al estudiar la probable estimulación de las actividades lipolítica y proteolítica en cultivos asociativos en leche, se observó un incremento de la actividad proteolítica, cuando en el cultivo conjunto participó la cepa *Debaryomyces polymorphus* 5Q1/26O, esta propiedad había resultado mínima para el cultivo puro de levadura. La estimulación de la actividad enzimática fue ratificada por el método cuantitativo.

La evaluación de las diferentes interacciones es primordial para determinar la compatibilidad entre cepas de levaduras y bacterias lácticas, como paso preliminar a su integración a un cultivo iniciador.

- El Análisis Sensorial de los quesos elaborados con la adición de levaduras como adjunto mostraron una buena aceptación sensorial de todos los productos en los atributos de preferencia global, textura y sabor-aroma por parte de la población ensayada, sin evidenciar diferencias significativas con el queso control (sin adición de levaduras). Esto indica, que las levaduras no producen alteraciones sobre las características sávido-aromáticas y texturales de los Quesos Artesanales de Corrientes.

Relacionando las conclusiones establecidas con los objetivos propuestos se puede concluir que las cepas autóctonas de levaduras presentes en el Queso Artesanal de Corrientes poseen características que le permiten crecer y permanecer en las condiciones de elaboración casearia. Las mismas participarían activamente durante la maduración a través de la asimilación del ácido láctico y lactosa, su actividad lipolítica, la metabolización de aminos biógenos y la estimulación de la actividad metabólicas de las BAL, siendo un importante grupo microbiano contribuyente al desarrollo de las características texturales y del sabor-aroma de esta variedad de queso. Por lo tanto, cepas autóctonas de levaduras podían ser empleadas como adjunto al fermento de bacterias lácticas formulado para la elaboración del Queso Artesanal de Corrientes, dado que carecen de efecto inhibitorio sobre las cepas constituyentes del mismo ni son inhibidas por la biota de bacterias

lácticas teniendo, además, en consideración que los productos elaborados con la adición de levaduras tuvieron una muy buena aceptación sensorial.

Los resultados logrados son por sí mismos una herramienta tecnológica útil para tomar decisiones acerca de la conveniencia de la participación de cepas de levaduras en la elaboración del Queso Artesanal de Corrientes, como así también para proceder a una correcta y adecuada selección de las mismas.

Anexo I

Medios de cultivo y

Reactivos



ANEXO I
Medios de cultivo

Medio N° 1: LDDe (Vasek, 2003)

Leche descremada deshidratada, 10,0 g; agua, 100 ml; esterilizado a 115 °C, 20 minutos.

Medio N° 2: LAPTg₁₀ (Raibaud *et al.*, 1961)

Peptona, 15,0 g; triptona, 10,0 g; extracto de levadura, 10,0 g; glucosa, 10,0 g, Tween 80, 1,0 g; agar-agar, 15,0 g; agua, 1 litro; pH 6,5-6,6; esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 3: Agar Elliker (Elliker *et al.*, 1956)

Triptona, 20,0 g; extracto de levadura, 5,0 g; gelatina, 2,5 g; glucosa, 5,0 g, lactosa, 5,0 g; sacarosa, 5,0 g; acetato de sodio, 1,5 g; cloruro de sodio, 4,0 g; ácido ascórbico, 0,5 g; agar, 15,0 g; agua, 1 litro; pH 6,8-6,7; esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 4: Agar MRS (De Man *et al.*, 1960)

Peptona, 10,0 g; extracto de carne, 10,0 g; extracto de levadura, 5,0 g; glucosa, 20,0 g; Tween 80, 1,0 g; fosfatoácido de potasio, 2,0 g; acetato de sodio, 5,0 g; citrato triamónico, 2,0 g; sulfato de magnesio, 0,2 g; sulfato manganeso, 50,0 mg; agar-agar, 15,0 g; agua, 1 litro; pH 6,0-6,5; esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 5: Medio semisólido para producción anaeróbica de CO₂ a partir de glucosa (Gibson y Abd-El-Malek, 1945).

Extracto de levadura, 2,5 g; glucosa, 50,0 g; sulfato manganeso [0,4 % (p/v)], 10 ml; leche descremada reconstituída al 10 % (p/v), 800 ml; agar nutritivo, 200 ml; pH 6,5; esterilizado por vapor fluente 30 minutos, durante tres días sucesivos.

Medio N° 6: Caldo para crecimiento en presencia de 6,5 % (p/v) de cloruro de sodio.

Caldo infusión cerebro corazón, 25,0 g; cloruro de sodio, 59,94 g; glucosa 1,0 g; púrpura de bromocresol [1,6 % (p/v)], 1 ml; agua, 1 litro; pH 7,0 -7,2; esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 7: Caldo para crecimiento de bacterias lácticas a diferentes pH iniciales (Shattock y Hirsch, 1947).

Se mezclaron 900 ml de caldo glucosa (glucosa, 10,0 g; extracto de carne, 10,0 g; peptona, 10,0 g; cloruro de sodio, 5,0 g; agua, 1 litro) con 100 ml de solución buffer (glicina, 7,5 g; cloruro de sodio, 5,85 g; agua, 1 litro), esterilizados (121 °C, 15 minutos) en forma separada; se ajustó el pH a ensayar, se dejó precipitar una noche en frío y se esterilizó por filtración.

Medio N° 8: Agar para Tolerancia a la bilis (Smibert y Krieg, 1981)

Extracto de carne, 10,0 g; peptona, 10,0 g; cloruro de sodio, 5,0 g; bilis deshidratada, 40,0 g; agar-agar, 15,0 g; agua, 1 litro, pH 7,2-7,4, esterilizado a 121 °C, 20 minutos.

Medio N° 9: Caldo para Hidrólisis de la esculina (Raibaud *et al.*, 1973).

Peptona, 6,0 g; extracto de levadura, 4,0 g; triptona, 4,0 g; glucosa, 1,0 g; esculina, 1,0 g; Tween 80, 1,0 g; agua, 1 litro; pH 6,5; esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 10: Producción de NH₃ a partir de arginina (Raibaud *et al.*, 1973)

Peptona, 6,0 g; extracto de levadura, 4,0 g; triptona, 4,0 g; glucosa, 1,0 g; monoclóhidrato de L-arginina, 3,0 g; Tween 80, 1,0 g; agua, 1 litro; pH 6,5-7,0; esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 11: Agar leche semisólido de Crawford (Harrigan y McCance, 1976)

Leche descremada reconstituída al 10 % (p/v) esterilizada a 115 °C, 10 minutos, 10,5 ml; citrato de sodio dihidratado [10 % (p/v)], 0,5 ml, esterilizado a 121 °C, 20 minutos; agar-agar [2 % (p/v)], 4 ml; esterilizado a 121 °C, 20 minutos.

Medio N° 12: Crecimiento en leche adicionada de azul de metileno al 0,1 y 0,3 % (Larpent y Larpent-Gourgaud, 1975)

Leche descremada, 100 g; agua, 1 litro pH 6,6; esterilizada 115 °C, 20 minutos; azul de metileno [5 % (p/v)] esterilizado por filtración en c.s.p. concentración final de 0,1 y 0,3 % (p/v).

Medio N° 13: LAPT (Raibaud *et al.*, 1961)

Peptona, 15,0 g; triptona, 10,0 g; extracto de levadura, 10,0 g, Tween 80, 1,0 g; agar-agar, 15,0 g; agua, 1 litro; pH 6,5 - 6,6; esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 14: LELg (Vasek, 2003)

Leche descremada deshidratada, 10,0 g; extracto de levadura 0,5 g; glucosa 1,0 g; agua, 100 ml; esterilizado a 115 °C, 20 minutos.

Medio N° 15: YGCB (Biokar)

Extracto de levadura, 5,0 g; glucosa, 20,0 g; cloranfenicol, 0,1g; agar, 15,0 g; azul de bromofenol, 0,01g; agua, 1 litro; pH 6,4 - 6,8; esterilizado a 121°C, 15 minutos.

Medio N° 16: YM (Wickerman, 1951)

Extracto de levadura, 3,0 g; extracto de malta, 3,0 g; peptona, 5,0 g; glucosa, 10,0 g; agua, 1 litro; pH 6,0; esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 17: Agar Gorodkowa modificado (Lodder and Kreger-van Rij, 1952)

Glucosa, 0,1 g; peptona, 1,0 g; cloruro de sodio, 0,5 g; agar-agar, 1,2 g; agua, 100 ml; esterilizado a 121 °C, 15 minutos. El medio de cultivo fue distribuido en picos de flauta.

Medio N° 18: Medio basal para la asimilación de compuestos carbonados (Barnett *et al.*, 2000)

Sulfato de sodio, 5,0 g; fosfato monobásico de potasio, 0,85 g; fosfato dibásico de potasio, 0,15 g; sulfato de magnesio, 0,5 g; cloruro de sodio, 0,1 g; cloruro de calcio, 0,1 g; agua, 1

litro; pH 5,2 - 5,6. El medio fue distribuido en alícuotas de 5 ml y esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 19: Medio basal para la fermentación de compuestos carbonados (Kreger-van Rij, 1984)

Peptona, 7,5 g; extracto de levadura, 4,5 g; agua, 1 litro. Distribuido en alícuotas de 4 ml en tubos de ensayo con tubos Durham y esterilizado a 121 °C, 15 minutos

Medio N° 20: Medio basal para la asimilación de compuestos nitrogenados, YNB (Barnett *et al.*, 2000)

Glucosa, 10,0 g; fosfato monobásico de potasio, 0,85 g; fosfato dibásico de potasio, 0,15 g; sulfato de magnesio, 0,5 g; cloruro de sodio, 0,1 g; cloruro de calcio, 0,1 g; agua, 1 litro. Distribuido en alícuotas de 5 ml y esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 21: Medio Base de Christensen (Christensen, 1946)

Glucosa, 1,0 g; tripteína, 1,0 g; fosfato dibásico de potasio, 2,0 g; cloruro de sodio, 5,0 g; rojo de fenol, 0,012 g; agar-agar, 15,0 g; agua, 1 litro.; pH 6,8. Distribuido en alícuotas de 5 ml y esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 22: Caldo para crecimiento de levaduras a diferentes pH iniciales (Vivier *et al.*, 1994)

Glucosa, 5,0 g; sulfato de amonio, 5,0 g; fosfato dibásico de potasio, 0,85 g; fosfato monobásico de potasio, 0,15 g; sulfato de magnesio, 0,5 g; cloruro de calcio, 0,1 g; cloruro de sodio, 0,1 g; agua, 1 litro. El pH a estudiar, se ajustó con ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio. Distribuido en alícuotas de 5 ml y esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 23: Caldo para crecimiento de levaduras a diferentes concentraciones de ácido láctico (Besançon *et al.*, 1992)

Sulfato de amonio, 5,0 g; fosfato dibásico de potasio, 0,85 g; fosfato monobásico de potasio, 0,15 g; sulfato de magnesio, 0,5 g; cloruro de calcio, 0,1 g; cloruro de sodio, 0,1 g; agua, 1 litro. Distribuido en alícuotas de 5 ml y esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 24: Caldo para crecimiento de levaduras a distintas concentraciones de lactosa (Besançon *et al.*, 1992)

Sulfato de amonio, 3,5 g; asparagina, 1,5 g; fosfato dibásico de potasio, 0,85 g; fosfato monobásico de potasio, 0,15 g; sulfato de magnesio, 0,5 g; cloruro de calcio, 0,1 g; cloruro de sodio, 0,1 g; agua, 1 litro. Distribuido en alícuotas de 5 ml y esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 25: Agar leche (Marshall, 1992)

Peptona de carne, 5,0 g; extracto de levadura, 3,0 g; agar-agar, 12,0 g; agua, 1 litro; pH 7,2. Esterilizado a 121 °C durante 15 minutos. La leche se adicionó posteriormente al medio fundido y atemperado a 80 °C en una proporción de 1 ml de LDe cada 9 ml de medio base.

Medio N° 26: Cz-Broth caseína (Kronborg Hansen y Jakobsen, 1998)

Nitrato de sodio, 2,0 g; cloruro de potasio, 0,5 g; glicerofosfato de magnesio, 0,5; sulfato ferroso, 0,01 g; sulfato de potasio, 0,35 g; sacarosa, 30,0 g; caseína, 10,0 g; agar-agar, 12 g; buffer fosfato 0,1 M, 1 litro; pH 5,5. Por cada litro de solución se agregó 1 ml de solución de sulfato de cinc y sulfato de cobre (1 g de sulfato de cinc, 0,5 g de sulfato de cobre en 100 ml de agua destilada). Esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 27: Medio basal para evaluar la actividad lipolítica (Vanderzant, y Splittstoesser, 1992)

Peptona 5,0 g; extracto de levadura, 3,0 g; agar-agar, 12,0 g; agua, 1 litro; pH 7,5. Esterilizado a 121 °C, 15 minutos.

Medio N° 28: Medio para la asimilación de aminoácidos (Kreger-van Rij, 1984)

Peptona, 1,0 g; glucosa, 1,0 g; cloruro de sodio, 5,0 g; fosfato diácido de potasio, 2,0 g; rojo fenol, 0,012 g; agua, 1 litro; pH 6,8. Se agregaron 3,0 g del aminoácido a estudiar y 20,0 g de agar-agar. Se ajusta el pH a un valor de 6,8.

Se distribuye en alícuotas de 5 ml y se esteriliza a 0,5 atmósferas de sobrepresión, 30 minutos.

Medio N° 29: Medio para la metabolización de aminas biogénicas (Besançon *et al.*, 1992)

Glucosa, 10,0 g; amina a estudiar, 0,8 g; fosfato monobásico de potasio, 0,5 g; sulfato de magnesio, 0,5 g; cloruro de sodio, 0,1 g; cloruro de calcio, 0,1 g; agua, 1 litro. Distribuido en alícuotas de 5 ml y esterilizado a 0,5 atmósferas de sobrepresión, 30 minutos.

Soluciones y Reactivos**Reactivo N° 1: reactivo de Nessler**

Yoduro de potasio, 7 g; yoduro mercurioso, 10 g; hidróxido de potasio, 10 g; agua, 100 ml.

Reactivo N° 2: solución de cloranfenicol

Cloranfenicol, 500 mg; alcohol etílico 96°, 100 ml.

Reactivo N° 3: solución stock de vitaminas

Biotina, 0,2 mg; pantotenato de sodio, 40 mg; ácido fólico, 0,2 mg; rivotravina, 20 mg; tiamina, 100 mg; agua, 1 litro. Esterilizada por filtración.

Reactivo N° 4: reactivos para la reacción de color en la prueba de asimilación de nitratos

Reactivo A: ácido sulfanílico, 1 g; ácido acético glacial 5N, 125 ml.

Reactivo B: α - naftilamina, 0,5 g; ácido acético 5N, 100 ml.

Reactivo N° 5: solución de urea

Urea, 40 g; agua, 100 ml. Esterilizada por filtración.

Reactivo N° 6: solución de cicloheximide

Cicloheximide, 1 g; agua, 100 ml. Esterilizada por filtración.

Reactivo N° 7: solución de ácido láctico

Ácido láctico, 10 g; buffer tartrato 0,1 M – pH 7,0, 100 ml. Esterilizada por vapor fluyente, 30 minutos.

Reactivo N° 8: solución de lactosa

Lactosa, 10 g; buffer fosfato 0,2 M - pH 7,0, 100 ml. Esterilizada por vapor fluyente, 30 minutos.

Reactivo N° 9: solución reveladora de actividad proteolítica

Cloruro de mercuríco, 15 g; solución de ácido clorhídrico 1 % (p/v), 20 ml; agua, 100 ml.

Reactivo N° 10: reactivo OPA

Solución de tetraborato de sodio 100mM, 25 ml; solución SDS 20 % (p/v) (dodecil sulfato de sodio), 2,5 ml; β- mercaptoetanol, 100 μl; reactivo OPA (o-ftaldehído), 40 mg en 1 ml de metanol, agua, 26,4 ml.

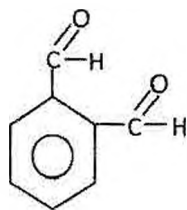


Fig. I.1. Fórmula del aldehído ftálico

Anexo II

Características de los géneros hallados



Anexo II

CARACTERÍSTICAS DE LOS GÉNEROS HALLADOS

(Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D.Y. 2000. Yeasts: Characteristics and Identification. Cambridge University Press, Cambridge).

Candida Berkhout (151 especies)

Células vegetativas: células brotadas, a veces presentan pseudohifas o hifas septadas.

Reproducción sexual: ausente

Fisiología: fermentación (+/-); nitrato (+/-); hidrólisis de urea (-); DBB (-).

Nota: este género, si bién no posee reproducción sexual, presenta algunas características comunes con ascomicetes, tales como doble pared celular, DBB (-) e hidrólisis de urea (-).

Referencias: Berkhout, 1923; Kreger-van Rij, 1984 p.585; Weijman *et al.*, 1988.

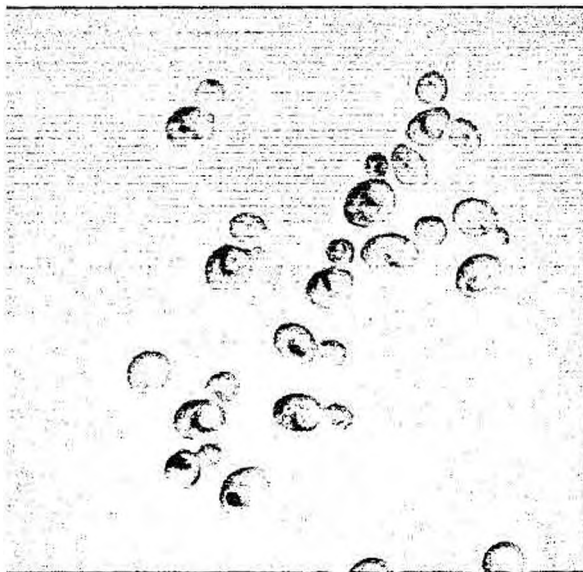


Figura II1. Células de *Candida*

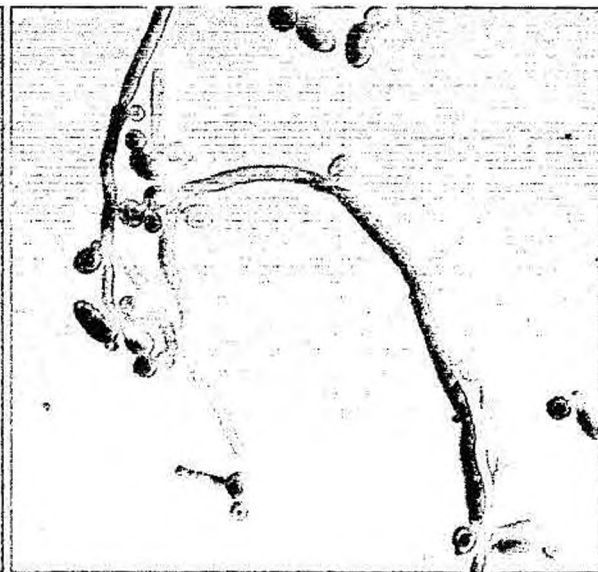


Figura II2. Pseudohifas de *Candida*

Cryptococcus (35 especies)

Células vegetativas: células brotadas, usualmente presentan cápsulas de polisacáridos, a veces se observan pseudohifas o hifas septadas.

Reproducción sexual: ausente

Fisiología: fermentación (-); myo-inositol (+) (usualmente); nitrato (-/+); hidrólisis de urea (+) (usualmente); DBB (+). La xilosa es un componente de la pared celular.

Notas y Referencias: Phaff y Spencer, 1969; Golubev, 1980; Kreger-van Rij, 1984 p. 845; Weijman *et al.*, 1988. *Cryptococcus neoformans*, la forma anamorfa de *Filobasidiella neoformans*, pertenece a esta especie (Greuter *et al.*, 1994)



Figura II3. Células de *Cryptococcus*

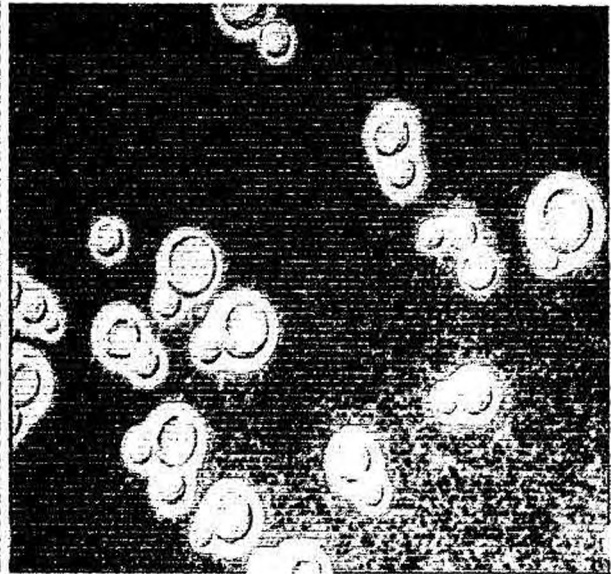
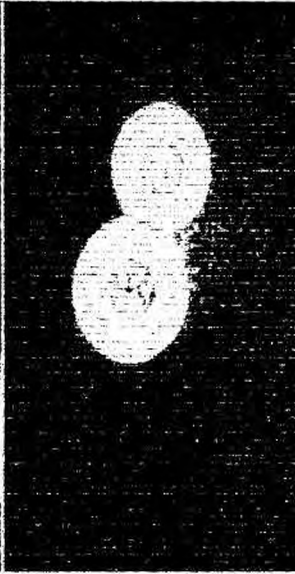


Figura II4. Células con cápsula de *Cryptococcus*

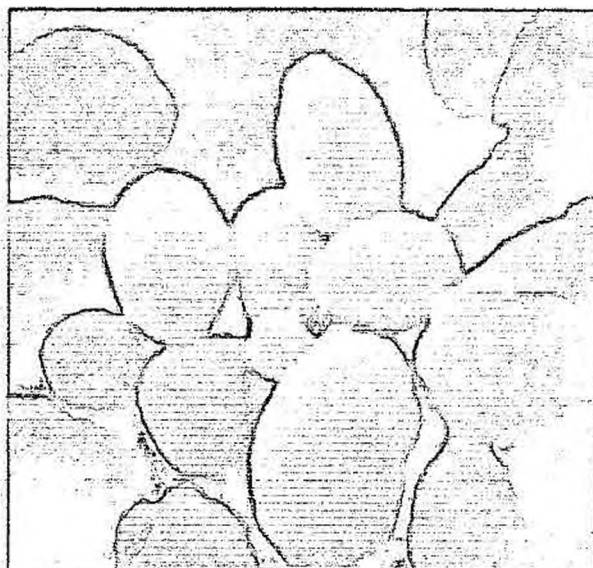
Debaryomyces Lodder y Kreger-van Rij (15 especies)

Células vegetativas: células brotadas, a veces presentan pseudohifas.

Reproducción sexual: ascos conteniendo de 1 a 4 ascosporos redondos, ovales, frecuentemente rugosos; usualmente se produce la conjugación entre células y brotes.

Fisiología: fermentación (-/+); nitrato (-); hidrólisis de urea (-); DBB (-).

Referencias: Lodder y Kreger-van Rij, 1978; Kreger-van Rij, 1984 p.130

Figura II5. Células de *Debaryomyces*Figura II6. Células de *Debaryomyces****Myxozyma* van der Walt et al. (9 especies)**

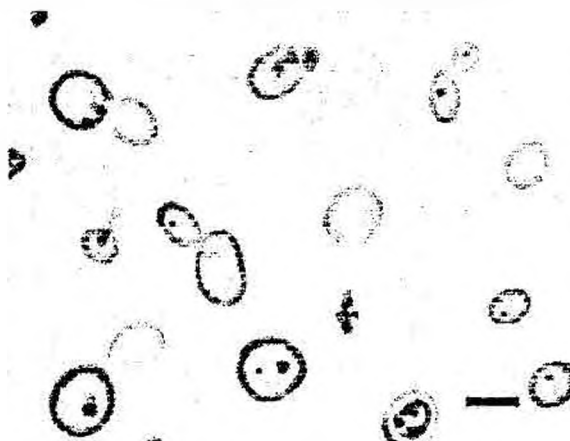
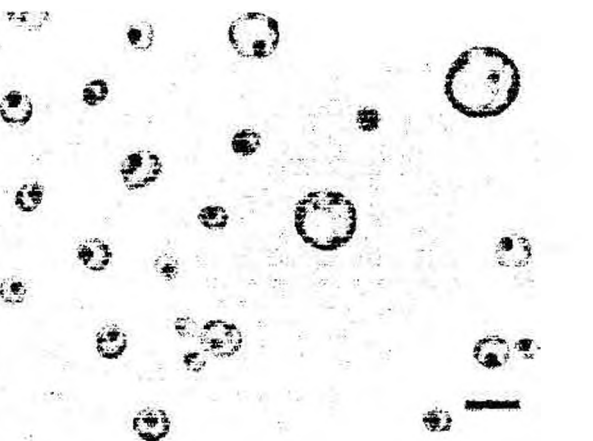
Células vegetativas: células brotadas con cápsula de polisacáridos.

Reproducción sexual: ausente

Fisiología: fermentación (-); hidrólisis de urea (-); DBB (-); imidazol (+);
D-galacturónico (+).

Nota: *Myxozyma nipponensis* (Spaij et al., 1993) y *Myxozyma sirexii* (Spaij et al., 1992) descritas anteriormente, no han podido ser verificadas por Barnett (2000).

Referencias: van der Walt et al., 1981.

Figura II7. Células de *Myxozyma*Figura II8. Células de *Myxozyma*

***Pichia* Hansen (89 especies)**

Células vegetativas: células brotadas, usualmente presentan pseudohifas y ocasionalmente hifas septadas

Reproducción sexual: asco conteniendo de 1 a 4 ascosporos (ocasionalmente hasta 8) lisos, redondos, con forma de sombrero o forma de Saturno.

Fisiología: fermentación (-); nitrato (-/+); hidrólisis de urea (-); DBB (+).

Referencias: Hansen 1904; Kurtzman 1984; Kurtzman y Fell, 1998 p.273

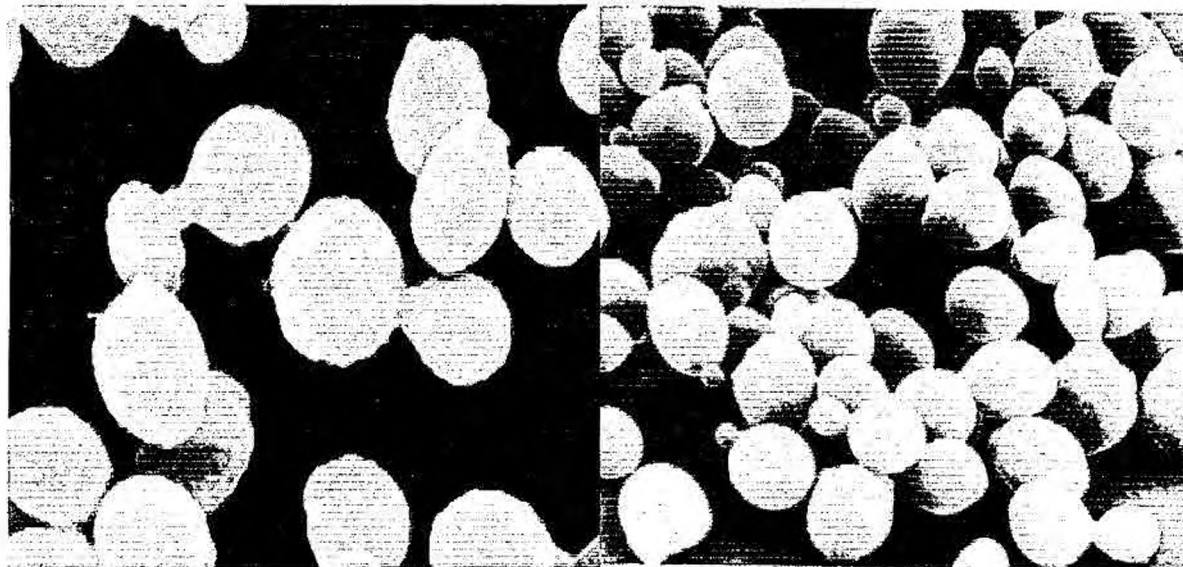


Figura II9. Células de *Pichia*

Figura II10. Células de *Pichia*

***Rhodotorula* Harrison (39 especies)**

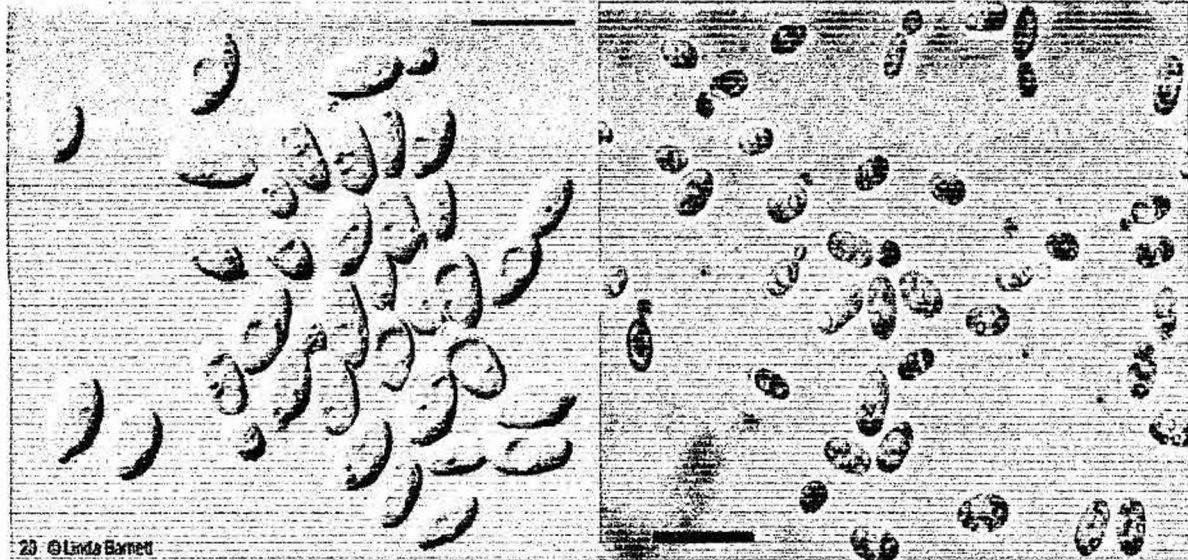
Células vegetativas: células brotadas

Reproducción sexual: ausente

Fisiología: pigmentadas; fermentación (-); myo-inositol

(-/+); nitrato (-/+); hidrólisis de urea (+); DBB(+); producción de almidón (-/+); la xilosa no es un componente de los polisacáridos celulares.

Referencias: Harrison, 1927; Yamazaki y Komagata, 1981; Weijman *et al.*, 1988.

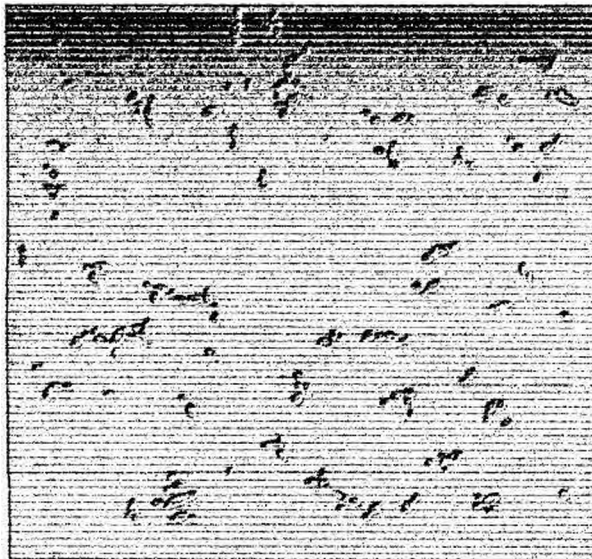
Figura II11. Células de *Rhodotorula*Figura II12. Células de *Rhodotorula****Stephanoascus* Smith et al. (2 especies)**

Células vegetativas: células brotadas con presencia de pseudohifas e hifas septadas con blastoconidios

Reproducción sexual: asco formado luego de la conjugación entre células de 2 hifas, cada uno contiene de 1 a 4 ascosporos, usualmente con forma de sombrero; heterotálica.

Fisiología: fermentación (-); nitrato (-); hidrólisis de urea (-); DBB (-).

Referencias: Smith et al. 1976; Giménez-Jurado et al., 1994.

Figura II13. Células de *Stephanoascus*

Anexo III

Estadísticas



Anexo III

Estadísticas

1. Análisis de varianza de log UFC. ml⁻¹ de levaduras durante la elaboración y maduración de Queso Artesanal de Corrientes

1.1. Análisis de la varianza de log UFC en las cuatro estaciones empleando Test de Duncan

Análisis de la varianza

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AC	log UFC	32	0.65	0.62	14.95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	24.45	3	8.15	17.57	<0.0001
ESTACIÓN	24.45	3	8.15	17.57	<0.0001
Error	12.99	28	0.46		
Total	37.44	31			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.4639 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n	
VERANO	3.70	8	A
OTOÑO	3.74	8	A
INVIERNO	5.04	8	B
PRIMAVERA	5.75	8	C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Cuajada	log UFC	32	0.42	0.36	13.54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	8.02	3	2.67	6.83	0.0013
ESTACIÓN	8.02	3	2.67	6.83	0.0013
Error	10.96	28	0.39		
Total	18.97	31			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.3913 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n	
VERANO	3.80	8	A
PRIMAVERA	4.63	8	B
INVIERNO	5.00	8	B
OTOÑO	5.06	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Leche	log UFC	32	0.56	0.51	13.50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	9.18	3	3.06	11.85	<0.0001
ESTACIÓN	9.18	3	3.06	11.85	<0.0001
Error	7.23	28	0.26		
Total	16.42	31			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.2584 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n	
INVIERNO	2.99	8	A
VERANO	3.57	8	B
OTOÑO	4.12	8	C
PRIMAVERA	4.38	8	C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso1	log UFC	32	0.20	0.12	23.38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	7.07	3	2.36	2.34	0.0945
ESTACIÓN	7.07	3	2.36	2.34	0.0945
Error	28.17	28	1.01		
Total	35.25	31			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 1.0062 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n	
VERANO	3.68	8	A
INVIERNO	4.02	8	A B
OTOÑO	4.58	8	A B
PRIMAVERA	4.89	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso15	log UFC	32	0.72	0.69	5.31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	7.07	3	2.36	23.71	<0.0001
ESTACIÓN	7.07	3	2.36	23.71	<0.0001
Error	2.78	28	0.10		
Total	9.85	31			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.0994 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n	
OTOÑO	5.38	8	A
INVIERNO	5.57	8	A
PRIMAVERA	6.38	8	B
VERANO	6.44	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso30	log UFC	32	0.38	0.32	11.01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	8.77	3	2.92	5.80	0.0033
ESTACIÓN	8.77	3	2.92	5.80	0.0033
Error	14.12	28	0.50		
Total	22.89	31			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.5043 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n	
OTOÑO	5.81	8	A
INVIERNO	6.08	8	A
PRIMAVERA	6.82	8	B
VERANO	7.09	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso6	log UFC	32	0.22	0.13	21.53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	7.59	3	2.53	2.56	0.0747
ESTACIÓN	7.59	3	2.53	2.56	0.0747
Error	27.64	28	0.99		
Total	35.23	31			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.9871 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n	
INVIERNO	3.93	8	A
VERANO	4.49	8	A
OTOÑO	4.77	8	A
PRIMAVERA	5.28	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

1.2. Análisis de la varianza de log UFC en las estaciones otoño e invierno empleando el Test de Duncan

Análisis de la varianza

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AC	log UFC	16	0.80	0.78	8.04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	6.80	1	6.80	54.60	<0.0001
ESTACIÓN	6.80	1	6.80	54.60	<0.0001
Error	1.74	14	0.12		
Total	8.54	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.1245 gl: 14

ESTACIÓN	Medias	n	
OTOÑO	3.74	8	A
INVIERNO	5.04	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Cuajada	log UFC	16	0.01	0.00	7.42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.01	1	0.01	0.09	0.7625
ESTACIÓN	0.01	1	0.01	0.09	0.7625
Error	1.95	14	0.14		
Total	1.96	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.1392 gl: 14

ESTACIÓN	Medias	n	
INVIERNO	5.00	8	A
OTOÑO	5.06	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Leche	log UFC	16	0.51	0.47	16.86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	5.19	1	5.19	14.44	0.0020
ESTACIÓN	5.19	1	5.19	14.44	0.0020
Error	5.03	14	0.36		
Total	10.22	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.3593 gl: 14

ESTACIÓN	Medias	n	
INVIERNO	2.99	8	A
OTOÑO	4.12	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso1	log UFC	16	0.10	0.03	21.13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	1.27	1	1.27	1.54	0.2356
ESTACIÓN	1.27	1	1.27	1.54	0.2356
Error	11.54	14	0.82		
Total	12.80	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.8241 gl: 14

ESTACIÓN	Medias	n	
INVIERNO	4.02	8	A
OTOÑO	4.58	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso15	log UFC	16	0.17	0.11	3.97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.14	1	0.14	2.85	0.1134
ESTACIÓN	0.14	1	0.14	2.85	0.1134
Error	0.66	14	0.05		
Total	0.80	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.0474 gl: 14

ESTACIÓN	Medias	n	
OTOÑO	5.38	8	A
INVIERNO	5.57	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso30	log UFC	16	0.04	0.00	12.62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.30	1	0.30	0.53	0.4795
ESTACIÓN	0.30	1	0.30	0.53	0.4795
Error	7.88	14	0.56		
Total	8.18	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.5628 gl: 14

ESTACIÓN	Medias	n	
OTOÑO	5.81	8	A
INVIERNO	6.08	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso6	log UFC	16	0.26	0.20	17.50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	2.80	1	2.80	4.83	0.0453
ESTACIÓN	2.80	1	2.80	4.83	0.0453
Error	8.10	14	0.58		
Total	10.90	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.5789 gl: 14

ESTACIÓN	Medias	n	
INVIERNO	3.93	8	A
OTOÑO	4.77	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

1.3. Análisis de la varianza de log UFC en las estaciones primavera y verano empleando Test de Duncan

Análisis de la varianza

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AC	log ufc	16	0.60	0.57	18.98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	16.77	1	16.77	20.87	0.0004
Estación	16.77	1	16.77	20.87	0.0004
Error	11.25	14	0.80		
Total	28.02	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.8034 gl: 14

Estación	Medias	n	
VERANO	3.70	8	A
PRIMAVERA	5.75	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Cuajada	log ufc	16	0.23	0.18	19.04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	2.71	1	2.71	4.21	0.0595
Estación	2.71	1	2.71	4.21	0.0595
Error	9.01	14	0.64		
Total	11.71	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.6435 gl: 14

Estación	Medias	n	
VERANO	3.80	8	A
PRIMAVERA	4.63	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Leche	log ufc	16	0.54	0.51	9.98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	2.58	1	2.58	16.41	0.0012
Estación	2.58	1	2.58	16.41	0.0012
Error	2.20	14	0.16		
Total	4.79	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.1575 gl: 14

Estación	Medias	n	
VERANO	3.57	8	A
PRIMAVERA	4.38	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Quesol	log ufc	16	0.26	0.21	25.43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	5.81	1	5.81	4.89	0.0442
Estación	5.81	1	5.81	4.89	0.0442
Error	16.64	14	1.19		
Total	22.45	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 1.1884 gl: 14

Estación Medias n

VERANO	3.68	8	A
PRIMAVERA	4.89	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso15	log ufc	16	0.01	0.00	6.07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.02	1	0.02	0.10	0.7575
Estación	0.02	1	0.02	0.10	0.7575
Error	2.12	14	0.15		
Total	2.13	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.1514 gl: 14

Estación Medias n

PRIMAVERA	6.38	8	A
VERANO	6.44	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso30	log ufc	16	0.04	0.00	9.60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.29	1	0.29	0.65	0.4322
Estación	0.29	1	0.29	0.65	0.4322
Error	6.24	14	0.45		
Total	6.53	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 0.4458 gl: 14

Estación Medias n

PRIMAVERA	6.82	8	A
VERANO	7.09	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso6	log ufc	16	0.11	0.05	24.20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	2.50	1	2.50	1.79	0.2017
Estación	2.50	1	2.50	1.79	0.2017
Error	19.53	14	1.40		
Total	22.04	15			

Test: Duncan Alfa: 0.05

Error: 1.3953 gl: 14

Estación	Medias	n
VERANO	4.49	8
PRIMAVERA	5.28	8

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)**1.4. Análisis de la varianza de log UFC en las cuatro estaciones empleando el Test de LSD Fisher****Análisis de la varianza**

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AC	log UFC	32	0.65	0.62	14.95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	24.45	3	8.15	17.57	<0.0001
ESTACIÓN	24.45	3	8.15	17.57	<0.0001
Error	12.99	28	0.46		
Total	37.44	31			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.69762

Error: 0.4639 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n
VERANO	3.70	8
OTOÑO	3.74	8
INVIERNO	5.04	8
PRIMAVERA	5.75	8

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Cuajada	log UFC	32	0.42	0.36	13.54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	8.02	3	2.67	6.83	0.0013
ESTACIÓN	8.02	3	2.67	6.83	0.0013
Error	10.96	28	0.39		
Total	18.97	31			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.64072

Error: 0.3913 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n	
VERANO	3.80	8	A
PRIMAVERA	4.63	8	B
INVIERNO	5.00	8	B
OTOÑO	5.06	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Leche	log UFC	32	0.56	0.51	13.50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	9.18	3	3.06	11.85	<0.0001
ESTACIÓN	9.18	3	3.06	11.85	<0.0001
Error	7.23	28	0.26		
Total	16.42	31			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.52062

Error: 0.2584 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n	
INVIERNO	2.99	8	A
VERANO	3.57	8	B
OTOÑO	4.12	8	C
PRIMAVERA	4.38	8	C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Quesol	log UFC	32	0.20	0.12	23.38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	7.07	3	2.36	2.34	0.0945
ESTACIÓN	7.07	3	2.36	2.34	0.0945
Error	28.17	28	1.01		
Total	35.25	31			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 1.02738

Error: 1.0062 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n		
VERANO	3.68	8	A	
INVIERNO	4.02	8	A	B
OTOÑO	4.58	8	A	B
PRIMAVERA	4.89	8		B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso15	log UFC	32	0.72	0.69	5.31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	7.07	3	2.36	23.71	<0.0001
ESTACIÓN	7.07	3	2.36	23.71	<0.0001
Error	2.78	28	0.10		
Total	9.85	31			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.32289

Error: 0.0994 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n		
OTOÑO	5.38	8	A	
INVIERNO	5.57	8	A	
PRIMAVERA	6.38	8		B
VERANO	6.44	8		B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso30	log UFC	32	0.38	0.32	11.01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	8.77	3	2.92	5.80	0.0033
ESTACIÓN	8.77	3	2.92	5.80	0.0033
Error	14.12	28	0.50		
Total	22.89	31			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.72734

Error: 0.5043 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n		
OTOÑO	5.81	8	A	
INVIERNO	6.08	8	A	
PRIMAVERA	6.82	8		B
VERANO	7.09	8		B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso6	log UFC	32	0.22	0.13	21.53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	7.59	3	2.53	2.56	0.0747
ESTACIÓN	7.59	3	2.53	2.56	0.0747
Error	27.64	28	0.99		
Total	35.23	31			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 1.01757

Error: 0.9871 gl: 28

ESTACIÓN	Medias	n		
INVIERNO	3.93	8	A	
VERANO	4.49	8	A	B
OTOÑO	4.77	8	A	B
PRIMAVERA	5.28	8		B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

1.5. Análisis de la varianza de log UFC en las estaciones otoño e invierno empleando el Test de LSD Fisher

Análisis de la varianza

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AC	log UFC	16	0.80	0.78	8.04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	6.80	1	6.80	54.60	<0.0001
ESTACIÓN	6.80	1	6.80	54.60	<0.0001
Error	1.74	14	0.12		
Total	8.54	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.37841

Error: 0.1245 gl: 14

ESTACIÓN	Medias	n		
OTOÑO	3.74	8	A	
INVIERNO	5.04	8		B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Cuajada	log UFC	16	0.01	0.00	7.42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.01	1	0.01	0.09	0.7625
ESTACIÓN	0.01	1	0.01	0.09	0.7625
Error	1.95	14	0.14		
Total	1.96	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.40013

Error: 0.1392 gl: 14

ESTACIÓN Medias n

INVIERNO	5.00	8	A
OTOÑO	5.06	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
L	log UFC	16	0.51	0.47	16.86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	5.19	1	5.19	14.44	0.0020
ESTACIÓN	5.19	1	5.19	14.44	0.0020
Error	5.03	14	0.36		
Total	10.22	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.64282

Error: 0.3593 gl: 14

ESTACIÓN Medias n

INVIERNO	2.99	8	A
OTOÑO	4.12	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Quesol	log UFC	16	0.10	0.03	21.13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	1.27	1	1.27	1.54	0.2356
ESTACIÓN	1.27	1	1.27	1.54	0.2356
Error	11.54	14	0.82		
Total	12.80	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.97351

Error: 0.8241 gl: 14

ESTACIÓN Medias n

INVIERNO	4.02	8	A
OTOÑO	4.58	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso15	log UFC	16	0.17	0.11	3.97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.14	1	0.14	2.85	0.1134
ESTACIÓN	0.14	1	0.14	2.85	0.1134
Error	0.66	14	0.05		
Total	0.80	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.23340

Error: 0.0474 gl: 14

ESTACIÓN	Medias	n
OTOÑO	5.38	8 A
INVIERNO	5.57	8 A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso30	log UFC	16	0.04	0.00	12.62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.30	1	0.30	0.53	0.4795
ESTACIÓN	0.30	1	0.30	0.53	0.4795
Error	7.88	14	0.56		
Total	8.18	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.80452

Error: 0.5628 gl: 14

ESTACIÓN	Medias	n
OTOÑO	5.81	8 A
INVIERNO	6.08	8 A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

MUESTRA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso6	log UFC	16	0.26	0.20	17.50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	2.80	1	2.80	4.83	0.0453
ESTACIÓN	2.80	1	2.80	4.83	0.0453
Error	8.10	14	0.58		
Total	10.90	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.81593

Error: 0.5789 gl: 14

ESTACIÓN	Medias	n	
INVIERNO	3.93	8	A
OTOÑO	4.77	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

1.6. Análisis de la varianza de log UFC en las estaciones primavera y verano empleando el Test de LSD Fisher

Análisis de la varianza

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AC	log ufc	16	0.60	0.57	18.98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	16.77	1	16.77	20.87	0.0004
Estación	16.77	1	16.77	20.87	0.0004
Error	11.25	14	0.80		
Total	28.02	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.96120

Error: 0.8034 gl: 14

Estación	Medias	n	
VERANO	3.70	8	A
PRIMAVERA	5.75	8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Cuajada	log ufc	16	0.23	0.18	19.04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	2.71	1	2.71	4.21	0.0595
Estación	2.71	1	2.71	4.21	0.0595
Error	9.01	14	0.64		
Total	11.71	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.86024

Error: 0.6435 gl: 14

Estación	Medias	n	
VERANO	3.80	8	A
PRIMAVERA	4.63	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Leche	log ufc	16	0.54	0.51	9.98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	2.58	1	2.58	16.41	0.0012
Estación	2.58	1	2.58	16.41	0.0012
Error	2.20	14	0.16		
Total	4.79	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.42553

Error: 0.1575 gl: 14

Estación	Medias	n
----------	--------	---

VERANO	3.57	8	A
--------	------	---	---

PRIMAVERA	4.38	8	B
-----------	------	---	---

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Quesol	log ufc	16	0.26	0.21	25.43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	5.81	1	5.81	4.89	0.0442
Estación	5.81	1	5.81	4.89	0.0442
Error	16.64	14	1.19		
Total	22.45	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 1.16904

Error: 1.1884 gl: 14

Estación	Medias	n
----------	--------	---

VERANO	3.68	8	A
--------	------	---	---

PRIMAVERA	4.89	8	B
-----------	------	---	---

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Quesol5	log ufc	16	0.01	0.00	6.07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.02	1	0.02	0.10	0.7575
Estación	0.02	1	0.02	0.10	0.7575
Error	2.12	14	0.15		
Total	2.13	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.41729

Error: 0.1514 gl: 14

Estación	Medias	n	
PRIMAVERA	6.38	8	A
VERANO	6.44	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso30	log ufc	16	0.04	0.00	9.60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.29	1	0.29	0.65	0.4322
Estación	0.29	1	0.29	0.65	0.4322
Error	6.24	14	0.45		
Total	6.53	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.71602

Error: 0.4458 gl: 14

Estación	Medias	n	
PRIMAVERA	6.82	8	A
VERANO	7.09	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Muestra	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Queso6	log ufc	16	0.11	0.05	24.20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	2.50	1	2.50	1.79	0.2017
Estación	2.50	1	2.50	1.79	0.2017
Error	19.53	14	1.40		
Total	22.04	15			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 1.26673

Error: 1.3953 gl: 14

Estación	Medias	n	
VERANO	4.49	8	A
PRIMAVERA	5.28	8	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

1.7. Log UFC promedio de cada estación

Estadística descriptiva

ESTACIÓN	Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	CV	Mín.	Máx.
INVIERNO	log UFC	56	4.66	1.21	1.46	25.89	2.00	7.04
OTOÑO	log UFC	56	4.78	0.81	0.66	16.98	3.00	6.67
PRIMAVERA	log UFC	56	5.44	1.30	1.70	23.97	3.00	8.70
VERANO	log UFC	56	4.68	1.46	2.12	31.09	2.60	7.26

1.8. Análisis de la varianza de log UFC promedio en las cuatro estaciones empleando el Test de LSD Fisher

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
log UFC	224	0.07	0.05	24.91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	23.29	3	7.76	5.23	0.0017
ESTACIÓN	23.29	3	7.76	5.23	0.0017
Error	326.50	220	1.48		
Total	349.79	223			

Test: LSD Fisher Alfa: 0.05 DMS: 0.45373

Error: 1.4841 gl: 220

ESTACIÓN	Medias	n	
INVIERNO	4.66	56	A
VERANO	4.68	56	A
OTOÑO	4.78	56	A
PRIMAVERA	5.44	56	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

2. Análisis de varianza de Log UFC. ml⁻¹ de BAL en cultivos conjuntos con cepas de levaduras y cultivos puros

2.1. Análisis de varianza con *Candida blankii* 2L1P

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 0 h	8	0,88	0,86	1,60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,54	1	0,54	43,80	0,0006
Cultivo	0,54	1	0,54	43,80	0,0006
Error	0,07	6	0,01		
Total	0,61	7			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 0,28973

Error: 0,0122 gl: 6

Cultivo	Medias	n	
BAL con cepa 2L1P	6,64	4	A
BAL	7,16	4	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 6 h	8	0,52	0,44	3,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,58	1	0,58	6,61	0,0423
Cultivo	0,58	1	0,58	6,61	0,0423
Error	0,53	6	0,09		
Total	1,11	7			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 0,77850

Error: 0,0883 gl: 6

Cultivo	Medias	n	
BAL con cepa 2L1P	8,57	4	A
BAL	9,11	4	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 12 h	8	0,00	0,00	6,39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,01	1	0,01	0,01	0,9082
Cultivo	0,01	1	0,01	0,01	0,9082
Error	2,51	6	0,42		
Total	2,51	7			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 1,69402

Error: 0,4181 gl: 6

Cultivo	Medias	n	
BAL	10,10	4	A
BAL con cepa 2L1P	10,15	4	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 24 h	8	0,24	0,11	1,03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,02	1	0,02	1,90	0,2178
Cultivo	0,02	1	0,02	1,90	0,2178
Error	0,05	6	0,01		
Total	0,06	7			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 0,23550

Error: 0,0081 gl: 6

Cultivo	Medias	n	
BAL con cepa 2L1P	8,72	4	A
BAL	8,81	4	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,01$)

2.2. Análisis de varianza con *Debaryomyces polymorphus* 5Q1/260

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 0 h	8	0,52	0,44	5,54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,96	1	0,96	6,57	0,0427
Cultivo	0,96	1	0,96	6,57	0,0427
Error	0,88	6	0,15		
Total	1,83	7			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 1,00074

Error: 0,1459 gl: 6

Cultivo	Medias	n	
BAL con cepa 5Q1/260	6,54	4	A
BAL	7,24	4	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,01$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 6 h	8	0,88	0,86	0,46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,07	1	0,07	43,56	0,0006
Cultivo	0,07	1	0,07	43,56	0,0006
Error	0,01	6	0,00		
Total	0,08	7			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 0,10245

Error: 0,0015 gl: 6

Cultivo	Medias	n	
BAL con cepa 5Q1/260	8,47	4	A
BAL	8,65	4	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 12 h	8	0,01	0,00	3,43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,00	1	0,00	0,04	0,8475
Cultivo	0,00	1	0,00	0,04	0,8475
Error	0,60	6	0,10		
Total	0,61	7			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 0,83041

Error: 0,1005 gl: 6

Cultivo	Medias	n	
BAL	9,21	4	A
BAL con cepa 5Q1/260	9,26	4	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 24 h	8	0,67	0,62	1,98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,37	1	0,37	12,26	0,0128
Cultivo	0,37	1	0,37	12,26	0,0128
Error	0,18	6	0,03		
Total	0,56	7			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 0,45766

Error: 0,0305 gl: 6

Cultivo	Medias	n	
BAL con cepa 5Q1/260	8,63	4	A
BAL	9,06	4	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$)

2.3. Análisis de varianza con *Debaryomyces vanriijiae* 6Q1/11P

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 0h	4	0,56	0,34	3,98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,23	1	0,23	2,56	0,2507
Cultivo	0,23	1	0,23	2,56	0,2507
Error	0,18	2	0,09		
Total	0,41	3			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 2,96985

Error: 0,0900 gl: 2

Cultivo	Medias	n	
BAL	7,30	2	A
BAL con cepa 6Q1/11P	7,78	2	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,01$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 6h	4	0,51	0,26	3,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,18	1	0,18	2,04	0,2891
Cultivo	0,18	1	0,18	2,04	0,2891
Error	0,18	2	0,09		
Total	0,37	3			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 2,97809

Error: 0,0905 gl: 2

Cultivo	Medias	n	
BAL	8,76	2	A
BAL con cepa 6Q1/11P	9,19	2	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,01$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 12h	4	0,13	0,00	3,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,04	1	0,04	0,31	0,6349
Cultivo	0,04	1	0,04	0,31	0,6349
Error	0,26	2	0,13		
Total	0,30	3			

Test : Tukey Alfa: 0,01 DMS: 3,56931

Error: 0,1300 gl: 2

Cultivo	Medias	n	
BAL	9,30	2	A
BAL con cepa 6Q1/11P	9,50	2	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,01$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 24 h	4	1,00	1,00	0,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,49	1	0,49	9800,00	0,0001
Cultivo	0,49	1	0,49	9800,00	0,0001
Error	0,00	2	0,00		
Total	0,49	3			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 0,07000

Error: 0,0000 gl: 2

Cultivo	Medias	n	
BAL con cepa 6Q1/11P	9,00	2	A
BAL	9,70	2	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,01$)

2.4. Análisis de varianza con *Candida blankii* 2Q1/10P

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 0 h	8	0,56	0,49	2,10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,16	1	0,16	7,66	0,0325
Cultivo	0,16	1	0,16	7,66	0,0325
Error	0,12	6	0,02		
Total	0,28	7			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 0,37475

Error: 0,0205 gl: 6

Cultivo	Medias	n	
BAL con cepa 2Q1/10P	6,66	4	A
BAL	6,94	4	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,01$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 6 h	8	0,10	0,00	1,75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,01	1	0,01	0,66	0,4489
Cultivo	0,01	1	0,01	0,66	0,4489
Error	0,13	6	0,02		
Total	0,15	7			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 0,38883

Error: 0,0220 gl: 6

Cultivo	Medias	n	
BAL	8,42	4	A
BAL con cepa 2Q1/10P	8,50	4	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 12 h	8	0,88	0,87	0,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,20	1	0,20	45,94	0,0005
Cultivo	0,20	1	0,20	45,94	0,0005
Error	0,03	6	0,00		
Total	0,23	7			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 0,17357

Error: 0,0044 gl: 6

Cultivo	Medias	n	
BAL con cepa 2Q1/10P	8,60	4	A
BAL	8,92	4	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Log UFC 24 h	8	0,36	0,25	1,88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0,10	1	0,10	3,39	0,1152
Cultivo	0,10	1	0,10	3,39	0,1152
Error	0,17	6	0,03		
Total	0,27	7			

Test: Tukey Alfa: 0,01 DMS: 0,44276

Error: 0,0286 gl: 6

Cultivo	Medias	n	
BAL con cepa 2Q1/10P	8,89	4	A
BAL	9,11	4	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$)

3. Análisis Sensorial de Quesos

3.1. Aceptabilidad Sensorial empleando escala hedónica

Análisis de la varianza multivariado

Cuadro de Análisis de la Varianza (Wilks)

F.V.	Estadístico F	gl (núm...)	gl (den)	p
Queso	0,94 0,74	15	475	0,7480

Cuadro de Análisis de la Varianza (Pillai)

F.V.	Estadístico F	gl (núm...)	gl (den)	p
Queso	0,06 0,74	15	522	0,7461

Cuadro de Análisis de la Varianza (Lawley-Hotelling)

F.V.	Estadístico F	gl (núm...)	gl (den)	p
Queso	0,06 0,73	15	512	0,7500

Cuadro de Análisis de la Varianza (Roy)

F.V.	Estadístico F	gl (núm...)	gl (den)	p
Queso	0,04 1,56	5	174	0,1732

Test: Hotelling Alfa: 0,05

Error: Matriz de covarianzas común gl: 174

Queso	global	textura	sabor	aroma	n
Queso 1	6,67	6,23	6,33	30	A
Queso 2	6,43	6,13	6,20	30	A
Queso 3	6,30	5,87	6,47	30	A
Queso 4	6,53	6,33	6,60	30	A
Queso 5	6,67	5,87	6,17	30	A
control	6,57	6,00	6,70	30	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

3.2. Prueba de ranking de preferencia**a) Ranking de preferencia global****Prueba de Friedman**

queso 1	queso 2	queso 3	queso 4	quesos 5	control	T2	p
3,47	3,43	3,40	3,60	3,47	3,63	0,07	0,9961

Mínima diferencia significativa entre suma de rangos: 29,094

Tratamientos	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n
queso 3	102,00	3,40	30 A
queso 2	103,00	3,43	30 A
quesos 5	104,00	3,47	30 A
queso 1	104,00	3,47	30 A
queso 4	108,00	3,60	30 A
control	109,00	3,63	30 A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

b) Ranking de preferencia del atributo textura**Prueba de Friedman**

queso 3	queso 4	queso 5	queso 1	queso 2	control	T2	p
3,13	3,80	3,43	3,67	3,37	3,60	0,48	0,7914

Mínima diferencia significativa entre suma de rangos: 28,894

Tratamientos	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n	
queso 3	94,00	3,13	30	A
queso 2	101,00	3,37	30	A
queso 5	103,00	3,43	30	A
control	108,00	3,60	30	A
queso 1	110,00	3,67	30	A
queso 4	114,00	3,80	30	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

c) Ranking de preferencia del atributo sabor-aroma**Prueba de Friedman**

queso 3	queso 4	queso 5	queso 1	queso 2	control	T2	p
3,47	3,27	3,30	3,62	3,48	3,87	0,41	0,8411

Mínima diferencia significativa entre suma de rangos: 28,914

Tratamientos	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	n	
queso 4	98,00	3,27	30	A
queso 5	99,00	3,30	30	A
queso 3	104,00	3,47	30	A
queso 2	104,	3,47	30	A
queso 1	109,00	3,63	30	A
control	116,00	3,87	30	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Bibliografía



Bibliografía

- Anderson, D.F. & Day, E.A.** 1966. Quantitation, evaluation, and effect of certain microorganisms on flavor components of blue cheese. *J. Agric. Food Chem.*, 14, 241-245. En: **Jakobsen, M. y Narvhus, J.** 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy Journal* 6, 755-768.
- Banks, J. M.; Law, A. J. R.; Leaver, J.; Horne, D. S.** 1995. Maturation profiles of Cheddar-type cheese produced from high heat treatment milk to incorporate whey protein. In: *Chemistry of structure-function relationships in cheese.* (Malin, E. L. and Tunick, M.H. Ed.). Plenum, New York, N. Y., pp. 221-234.
- Baraggio, N.G.** Estudios sobre la participación de levaduras en el proceso de maduración de quesos y su interacción con las bacterias lácticas de starters. 2000. Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
- Baraggio N.; Carrasco M.; Simonetta A.** 2007/08. Aislamiento de levaduras a partir de leche y productos lácteos. Determinación de sus características tecnológicas de interés caseario. *Revista Argentina de Lactología* N° 25, 20-31.
- Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D.** 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Baroiller, C. & Schmidt, J.L.** 1990. Contribution a l'étude de l'origine des levures du fromage de Camembert. *Le Lait*, 70, 67-84. En: **Jakobsen, M. y Narvhus, J.** 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy Journal* 6, 755-768.
- Benfeldt, C. and Sorensen, J.** 2001. Heat treatment of cheese milk: effect on proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11, 567-574.
- Benkerroum N.; Ghouati Y.; Sandine W.E.; Tantaqui-Elaraki A.** 1993. Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. *Letters Appl. Microbiol.* 17, 78-81.
- Beresford, T. P.; Fitzsimons, N. A.; Brennan, N. L.; Cogan, T. M.** 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11, 259-274.
- Berkhout, M.C.** 1923. *De Schimmelgeslachten Monilla, Oidum, Oospora en Torula.* Thesis, Rijksuniversiteit te Utrecht.
- Besançon, X.; Smet, C.; Chabalier, C.; Rivermale, M.; Reverbel, J.P.; Ratamahenina, R.; Galzy, P.,** 1992. Study of surface yeast flora of Roquefort cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 9-18.
- Bintsis, T. and Robinson, R.K.** 2004. A study of the effects of adjunct cultures on the aroma compounds of Feta-type cheese. *Food Chemistry* 88, 435-441.

- Breve Descripción de la Argentina Quesera. <http://www.quesosargentinos.gov.ar>
- Carrasco M.; Moragues L.; Vignatti C.; Scarinci H.; Simonetta A. 2006. Characterization and technological aspects of yeasts isolated from raw milk and different types of cheeses produced in Argentina. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61 (N° 1, 21-25).
- Carrasco, M.S.; Scarinci, H.E.; Simonetta, A.C. 1997. Inhibitory spectrum of bacteriocin-like substances produced by *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiologie - Aliments - Nutrition* 15, 299-305.
- Centro de la Industria Lechera (CIL), 1999. Reseña estadística de la lechería nacional (1989 – 1998) y Situación Mundial de la Lechería. *Industria Lechera* 80, N° 721, 59 – 163.
- Centro de la Industria Lechera (CIL), 2002. <http://www.cil.org.ar>
- Centro de la Industria Lechera (CIL), 2003. La lechería argentina. Situación coyuntural y perspectivas. <http://www.cil.org.ar>
- Centro de la Industria Lechera (CIL), 2009. <http://www.cil.org.ar>
- Cersovsky, H.; Sonntang, S. y Johst, F. 1982. Especificaciones de calidad de la leche cruda y métodos para su determinación. Fabricación de productos lácteos. Ed. Acribia, Zaragoza. Pp. 55-83. En: Tornadijo, M.E.; Marra, A.L.; García Fontán, M.C.; Prieto, B.; Carballo, J. 1998. La calidad de la leche destinada a la fabricación de quesos: calidad química. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos* Vol. 2, N° 2, 79-91.
- Christensen. W.B. 1946. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bacteriol.* 52, 461-466.
- Church, F.C.; Swaisgood, H. E.; Porter, D.; Catignani, G. L. 1983. Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66, 1219-1227.
- Código Alimentario Argentino. Capítulo VIII. Alimentos Lácteos. Artículo 605. Res. Conj. SP y RS y SAGPA N° 33/2006 y N° 563/2006.
- Cogan, T. M.; Barbosa, M.; Beuvier, E.; Bianchi-Salvadori, B.; Cocconcelli, P. S.; Fernandes, I.; Gómez, J.; Gómez, R.; Kalantzopoulos, G.; Ledda, A.; Medina, M.; Rea, M. C.; Rodríguez, E. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64, 409-421.
- Corbo, M. R.; Lanciotti, R.; Albenzio, M.; Sinigaglia, M. 2001. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *Int. J. Food Microbiology* 69, 147–152.

- Cosentino, S.; Fadda, M.E.; Deplano, M.; Mulargia, A.F.; Palmas, F.** 2001. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 69, 53–58.
- Curia, A.V.; Fiszman, S.M.; Gámbaro García, A.; Garitta, L.V.; Gómez Melis, G.; Hough, G.E.; López, C.; Martínez, M.C.; Restrepo Sanchez, P.; Salvador, Ana; Santa Cruz, M.J.; Varela, P.; Witting de Penna, E.** 2005. Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos. Cap. 2. Ediciones Programa CYTED (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo). I.S.B.N. 84-96023-33-8. Madrid, España.
- Dalgleish, D. G.** 1993. Chap. 3. The enzymatic coagulation of milk. In: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 2th (P. F. Fox ed.). Chapman and Hall, London, U. K., pp. 69-100.
- De Man, J. C., Rogosa, M.; Sharpe, M. E.** 1960. In: Harrigan W. F., and M. E. McCance. 1976. *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic Press, London, U. K., pp. 205.
- De Wit, M.; Osthoff, G.; Viljoen, B.C.; Hugo, A.** 2005. A comparative study of lipolysis and proteolysis in Cheddar cheese and yeast-inoculated Cheddar cheeses during ripening. *Enzyme and Microbial Technology* 37, 606–616.
- Deak, T. and Beuchat, L.R.** 1996. *Handbook of Food Spoilage*. CRC Press, New York.
- Deiana, P.; Fatichenti, F.; Farris, G.A.; Mocquout, G.; Lodi, R.; Todesco, R.; Cecchi, L.** 1984. Metabolization of lactic and acetic acids in Pecorino Romano cheese made with a combined starter of lactic acid bacteria and yeast. *Le Lait* 64, 380-394.
- Devoyod, J. J.** 1990. Yeasts in cheese-making. In *Yeasts Technology*. Eds J. F. T. Spencer and D. M. Spencer. pp. 229 - 240. Heidelberg, Springer-Verlag.
- Elliker, P.R.; Anderson, A.W.; Hannesson, G.** 1956. An agar culture medium for acid lactic streptococci and lactobacilli. *J. Dairy. Sci.*39:1611
- Evaluación Sensorial de Alimentos.** Curso-Taller. 2004. Departamento de Evaluación Sensorial de Alimentos (DESA), Instituto Superior Experimental de Tecnología Alimentaria (ISETA). 9 de julio, Argentina.
- Fadda, M.E.; S. Cosentino, M. Deplano, F. Palmas.** 2001. Yeast populations in Sardinian feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* 69, 153–156.
- Fadda, M.E.; Mossa, V.; Pisano, M.B.; Deplano, M.; Cosentino, S.** 2004. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *International Journal of Food Microbiology* 95, 51– 59.

- Fatichenti, F.; Bergere, J.L.; Deiana, P.; Fams, G.A. 1983. Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Clostridium butyricum*. J. Dairy Res. 50, 399–457.
- Ferreira, A.D. and Viljoen, B.C. 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. International Journal of Food Microbiology 86, 131–140.
- Fleet, G. H. 1992. Spoilage yeasts. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 12, 1-44.
- Fleet, G.H. 1990. Yeasts in dairy products – a review. J. Appl. Bacteriol. 68, 199–211.
- Fleet, G.H. and Mian, M.A., 1987. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. Int. J. Food Microbiol. 4, 145–155.
- Fox, P.; Law, J.; McSweeney, P.; Wallace, J. 1993. Biochemistry of cheese ripening. Capítulo 10, Vol. 1 segunda edición, en Fox, P. (editor). In: Cheese: chemistry, physics and microbiology. General Aspects. Chapman & Hall, London.
- Gadaga, T.H.; Mutukumira, A.N.; Narvhus, J.A. 2001. Growth characteristics of *Candida kefyr* and two strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. International Journal of Food Microbiology 70, 11–19.
- García Garibay, M.; Revah, S. M.; Gómez Ruiz, L. 1993. Cap. 6. Productos Lácteos. En: Biotecnología Alimentaria (Grupo Noriega eds.). Limusa, S. A. de C. V. México, D. F., pp. 153-223.
- Gardini, F.; Tofalo, R.; Belletti, N.; Iucci, L.; Suzzi, G. Torriani, S. Guerzoni, M.E.; Lanciotti, R. 2006. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. Food Microbiology 23, 641-648.
- Garrison, E.R. 1959. Lipolytic yeasts in cream from dairy farms. J. Dairy Sci. 42, 905-911.
- Gauna, M. C.; Vasek, O. M.; Fusco, A. J. V. 1995. Quesos Artesanales De Corrientes (Argentina). Microflora Contaminante. Revista de Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura. UNNE. Vol. 11, 85-91.
- Gibson, T. and Abd-el-Malek, I. 1945. The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. J. Dairy Res. 14, 35-38.
- Giménez-Jurado, G.; Cidadao, A.J.; Beijin-van der Waaij, A. 1994. A novel heterothallic ascomycetous yeast species: *Strophanoascus smithiae*, teleomorph of *Candida edax*. Systematic and Applied Microbiology 17, 237-246.
- Golubev, V.I. 1980. Taksonomiya i identifikatsiyadrozhzhevykh gribov roda *Cryptococcus*. Biologiya i Sistematika Konkretnykh Grupp. Mikroorganizmov. Puschino: Akademiya Nauk SSR.

- Green, M. L. and Grandison, A. S.** 1993. Chap. 4. Secondary (non-enzymatic) phase of rennet coagulation and post-coagulation phenomena. *In: Cheese: chemistry, physics and microbiology*, vol. 1. 2th (P. E. Fox ed.) Chapman and Hall, London, U. K., pp. 101-140.
- Greuter, W.; Barrie, F.R.; Burdet, H.M.; Chaloner, W.G.; Demoulin, V.; Hawksworth, D.L.; Jørgensen, P.M.; Nicolson, D.H.; Silva, P.C.; Trehane, P.; McNeill, J.** (Editors). 1994. International Code of Botanical Nomenclature. Königstein: Koeltz Scientific Books.
- Gripou, J.C.** 1993. Mould-ripened cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 2, Major cheese groups, ed. P.E. Fox. Chapman & Hall, London, pp. 111-136. **En: Jakobsen, M. y Narvhus, J.** 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy Journal* 6, 755-768.
- Guerzoni, M.E.; Gobbetti, M.; Lanciotti, R.; Vannini, L.; Chaves López, C.** 1998. *Yarrowia lipolytica* as potential ripening agent in milk products, in *Yeasts in the Dairy Industry: Positive & Negative aspects* FIL 1998 I.S.B.N. 92 9098 027 Brussels Belgium . pp. 23-33.
- Guinee, T. P.; O'Callaghan, D. J.; Pudja, P. D.; O'Brien, N.** 1996. Rennet coagulation properties of retentates obtained by ultrafiltration of skim milks heated to different temperatures. *Int. Dairy J.* 6, 581-596.
- Gutman, G.; Guiguet, E.; Rebolini, J.** 2003 Los ciclos en el complejo lácteo argentino. Análisis de políticas lecheras en países seleccionados. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (S.A.G.P. y A.) – Dirección Nacional de Alimentación – Programa Nacional de los Alimentos Argentinos / Programa Nacional de Política Lechera.
- Hansen, E.C.** 1904. Grundlinien zur Systematik der Saccharomyceten. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, Zweite Abteilung*, 12, 529-538.
- Harrigan, W. F. and McCance, M. E.** 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press Inc. LTD, London. K.
- Harrison, F.C.** 1927. Cheese torulae. *Transactions of the Royal Society of Canada, Third Series*, 21. Section V, 341-380.
- Hill, A. R.** 1995. Chemical species in cheese and their origin in milk components. *In: Chemistry of structure-function relationships in cheese* (E. L. Malin, and M. H. Tunick eds.). Plenum, New York, N. Y., pp. 43-58.
- Hynes, E.; Delacroix-Buchet, A.; Meinardi, C. A.; Zalazar, C. A.** 1999. Relation between pH, degree of proteolysis and consistency in soft cheeses. *Aust. J. Dairy Technol.* 54, 24-27.

- International Standard FIL-IDF. 122C:1996.** Milk and milk products. Preparation of samples and dilutions for microbiological examination
- International Standard FIL-IDF. 50C:1995.** Milk and milk products. Guidance on sampling.
- Jakobsen, M. and Narvhus, J.** 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy Journal* 6, 755-768.
- James, R.** 1996. Entrevista al Sr. Ricardo James, Presidente de la CIL. *Tecnología Láctea Latinoamericana* N° 4, 38-39.
- James, R.** 1997. Situación de la industria láctea argentina en el marco del nuevo mercado global. *Tecnología Láctea Latinoamericana* N° 7, 20-21
- Jay, M.J.** 1992. *Modern Food Mycobiology*. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Keating, P. F. y Gaona Rodríguez, H.** 1999. Cap. 7. Tratamiento de la leche para fines industriales. En: *Introducción a la lactología*. Limusa, S. A. de C. V., México, D. F., pp., 115-124.
- Kreger-van Rij, N.J.W.** 1984. *The yeast, a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Kronborg Hansen, T. and Jakobsen, M.** Interactions between *Penicillium raqueforti* and yeast of importance in the production of Danish blue cheese. In: *Yeasts in the Dairy Industry: Positive & Negative aspects FIL 1998 I.S.B.N. 92 9098 027*. Brussels, Belgium.
- Kunz, B.** 1986. Cap. 4. Empleo de los cultivos de microorganismos. En: *Cultivo de microorganismos para la producción de alimentos*. Acribia, Zaragoza, España, pp. 61-91.
- Kurtzman, C. P.** 1984. Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. *Antonie van Leeuwenhoek* 50, 209-217.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W.** 1998. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, four Edition, Amsterdam: Elsevier. pp. 273
- Larpent J. P. et Larpent-Gourgaud, M.** 1975. *Mémento technique de microbiologie*. Diffusion yechnique et documentation, Paris, France, pp. 200.
- Laubscher, P.J. and Viljoen, B.C.** 1999. Key properties of yeasts isolated during the manufacturing and ripening of matured Cheddar cheese. In: Laubscher, P.J., Viljoen, B.C. (Eds.). *The Occurrence, Growth and Survival of Yeasts in Matured Cheddar*. University
- Law, B. A.** 1984. Chap. 7. Flavour development in cheeses. In: *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and ferment milk* (F. L. Davies, and B. A. Law Eds.). Elsevier Applied Science Publishers, Essex, England, p. 187-208.

- Lodder J. and Kreger-van Rij, N.J.W. 1952. The yeast, a taxonomic study. North Holland Publishing Co. Amsterdam.
- Lodder, J. and Kreger-van Rij, N.J.W. 1978. Proposal for conservation of the generic name *Debaryomyces* Lodder et Kreger-van Rij against *Debaryomyces* Klöcker. *Taxon*.27, 306-307.
- Lopez-Diaz, T.M.; Santos, J.A.; Prieto, M.; Garcia-Lopez, M.L.; Otero, A. 1995. Mycoflora of a traditional Spanish blue cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 49, 191-199.
- Lucey, J. A. 2002. Formation and physical properties of milk protein gels. Online. Disponible en: <http://www.fass.org/fass01/pdfs/lucey.pdf>. Acceso: Nov., 10, 2002.
- Lucey, J. A.; Tamehana, M.; Singh, H.; Munro, P. A. 2001. Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels made with both rennet and acid. *Int. Dairy J.* 11, 559-565.
- Machota, S.V.; Vicens, M.J.P.; De Simon, M.T.C.; Fernandez, G.S. 1987. Raw milk mycoflora. *Milchwissenschaft* 42, 20-22.
- Madigan M.T.; Martinko, J.M.; Parker J. 1998. Brock. Biología de los microorganismos. Editorial Prentice Hall International (U.K.) Ltd. Hertfordshire.
- Magariños, H. 2001. Producción higiénica de la leche cruda. Guía para la pequeña y mediana empresa. Proyecto de Calidad y Productividad en la Pequeña y Mediana Empresa, copatrocinado por la Organización de los Estados Americanos, OEA, y la Agencia de Cooperación Alemana para el Desarrollo, GTZ.
- Marshall, R.T. (Ed.). 1992. Standard Methods for the Examination of Dairy Products 16th Edition. APHA. Washington.
- Mastellone, P. 2000. Ayudando a conocer el mundo de la leche. Editorial Ángel Estrada y Cía. Buenos Aires.
- Mäyry-Mäkinen, A. and Bigret, M. 1998. Chap. 2. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. 2th ed. (Sepo Salminen and Atte von Wright eds.). Marcel Dekker Inc., New York, N. Y., pp. 73-102.
- McMahon, D. J.; Yousif, B. H.; Kalab, M. 1993. Effect of whey protein denaturation on structure of casein micelles and their rennetability after ultra-high temperature processing with or without ultrafiltration. *Int. Dairy J.* 3, 239-256.
- McSweeney, P. y Sousa, M. 2000. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait* 80, 293-324.
- Meilgaard, M.; Civille, G.V.; Carr, B.T. 1991. Sensory Evaluation Techniques, Cap. 11, CRC Press Inc., Florida, Estados Unidos.

- Menéndez, S.; Godínez, R.; Rodríguez Otero, J.L.; Centeno, J.A.** 1999. Fenómenos bioquímicos durante la maduración. Alimentación. Equipos y Tecnología. Julio/Agosto, 97 – 105.
- Mietton, B.; Desmazeaud, M.; de Roissart, H., Weber, F.** 1994. Chap. IV-3. Transformation du lait en fromage. En: Bactéries Lactiques, vol. II. Aspects fondamentaux et technologiques. (H. de Roissart, et F. M. Luquet coord.). Coquand, Grenoble, France, pp. 55-133.
- Molimard, P. and Spinnler, H. E.** 1996. Review: Compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. J. Dairy Sci. 79, 169-184.
- Narvhus, J.A.; Gadaga, T.H.** 2003. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. International Journal of Food Microbiology 86, 51– 60.
- Neviani, E.; Gatti, M.; Vannini, L.; Gardini, F.; Suzzi, G.** 2001. Contribution of Gal⁺ lactic acid bacteria to *Saccharomyces cerevisiae* metabolic activity in milk. International Journal of Food Microbiology 69, 91–99.
- Newell, G.J.; MacFarlane, J.D.** 1987. Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. Journal of Food Science 52, 1721.
- Parellada, G. y Schilder, E.** 1999. Transformaciones cíclicas y estacionales de la producción lechera argentina a partir del plan de convertibilidad. Documento de Trabajo N°4. Instituto de Economía y Sociología, INTA. www.inta.gov.ar/ies
- Pereira-Dias, S.; Potes, M.E.; Marinho, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V.** 2000. Characterization of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. International Journal of Food Microbiology 60, 55–63.
- Phaff, H.J.; Spencer, J.F.T.** 1969. Improved parameters in the separation of species in the genera *Rhodotorula* y *Cryptococcus*. Proceeding of the 2nd Symposium on Yeasts Bratislava 16-21, July 1966, pp. 59-64. Bratislava: Vydavatel 'stvo Slovenskej Akadémie Vied.
- Poste, L.M.; Mackie, D.A; Butler, G.; Larmond, E.** 1991. Laboratory Methods for Sensory Analysis of Food, pp. 61-67. Agriculture Canada, Ottawa, Canada.
- Raibaud, P., Caulet, M.; Galpin, J. V.; Mocquot, G.** 1961. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs. II. Streptococci: Selective enumeration and differentiation of the dominant group. Appl. Bacteriol. 24, 285-291.
- Raibaud, P.; Galpin, J. V.; Ducluzeau, R.; Mocquot, G. et Oliver, G.** 1973. Le genre lactobacillus dans le tube digestif du rat. I. Caracteres des souches homofermentaires isolées de rats holo-et gnotoxéniques. Ann. Microbiol. (Inst.Pasteur). 124A, 83-109.

- Reglamento Técnico General Mercosur.** Res. GMC N° 69/93. Requisitos microbiológicos para quesos. Res. GMC N°79/94. Identidad y Calidad de Quesos.
- Riviere, J.W.M.L.A.** 1969. Ecology of yeasts in the kefir grain. *Antonie van Leeuwenhoek* 35, D15–D16 (suppl.).
- Robinson, R.K.** 1987. *Microbiología Lactológica. Volumen I. Microbiología de la leche.* Editorial Acirbia, S.A. Impreso en España.
- Romano, P.; Ricciardi, A.; Salzano, G.; Suzzi, G.** 2001. Yeasts from Water Buffalo Mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area. *International Journal of Food Microbiology* 69, 45–51.
- Rossi, J.; Gobbetti, M.; Smacchi, E.; Battistotti, B.; Fox, P.F.** 1998. Enzymatic evolution ripening of Taleggio cheese related to the surface microflora, in *Yeasts in the Dairy Industry: Positive & Negative aspects FIL 1998.* I.S.B.N. 92 9098 027 Brussels, Belgium. pp. 7-22.
- Rousseau, M.** 1984. Study of the surface flora of traditional Camembert cheese by scanning electron microscopy. *Milchwissenschaft*, 39, 129-134. **En: Jakobsen, M. y Narvhus, J.** 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy Journal* 6, 755-768.
- Sancho, J.; Bota, E.; Castro, J.J.** 2002. *Introducción al Análisis Sensorial de Alimentos.* Cap. 7 y 8. Alfa Omega Grupo Editor. I.S.B.N. 970-15-0767-3. D.F. México.
- Sauter, H.** 1986. *Die Oberflächenerfauna von Weinkäse. Reifungsfehler und ihre Ursachen.* Thesis. Technical University, Munich.
- Schaller, A.** 2010. *Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Lácteos. Revista Alimentos Argentinos N° 48.*
- Schmidt, J.L. & Daudin, J.J.** 1983. Etude de l'homogénéité d'une population de levures isolées a partir de fromage de Camembert. *Ann. Microbiol. (Institute de Pasteur)*, 134A, 399-409. **En: Jakobsen, M. y Narvhus, J.** 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy Journal* 6, 755-768.
- Schmidt, J.L.; Graffard, C.; Lenoir, L.** 1979. Contribution a l'étude des aptitudes biochimiques de levures isolées du fromage de Camembert I. Essais préliminaires. *Le Lait*, 59, 142-163. **En: Jakobsen, M. y Narvhus, J.** 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy Journal* 6, 755-768.
- Schmidt, J.L. & Lenoir, J.** 1978. Contribution a l'étude de la flore levure du fromage de Camembert. Son evolution au tours de la maturation. *Le Lait*, 58, 355-370. **En:**

-
- Jakobsen, M. y Narvhus, J.** 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy Journal* 6, 755-768.
- Schmidt, J.L. & Lenoir, J.** 1980a. Contribution a l'étude de la flore levure du fromage de Camembert (II). *Le Lait*, 60, 272-282. En: **Jakobsen, M. y Narvhus, J.** 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy Journal* 6, 755-768.
- Schmidt, J.L. & Lenoir, J.** 1980b. Contribution a l'étude des aptitudes biochimiques de levures isolées du fromage de Camembert II. Essais et interprétations complémentaires. *Le Lait*, 60, 343-350. En: **Jakobsen, M. y Narvhus, J.** 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy Journal* 6, 755-768.
- Schreiber, R.** 2001. Heat-induced modifications in casein dispersions affecting their rennetability. *Int. Dairy J.* 11, 553-558.
- Scott, R.** 1981. *Cheese making practice*. Applied Science Publishers, London.
- Seiler, H.** 1991. Some additional physiological characteristics for the identification of food-borne yeasts. *Neth. Milk Dairy J.* 45, 253-258.
- Seiler, H. and Busse, M.,** 1990. The yeast of cheese brines. *International Journal of Food Microbiology* 11, 289-304.
- Shalaby, A.R.** 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* 29, 675-690.
- Shattock, P. M. F., and Hirsch, A.** 1947. A liquid medium buffered at pH 9.6 for the differentiation of *Streptococcus faecalis* from *Streptococcus lactis*. *J. Path. Bacteriol.* 59, 495-497.
- Siewert, R.** 1986. Zur Bedeutung der Hefen bei der Reifung von Camembert und Brie. *Deutsche Molkerei-Zeitung*, 35, 1134-1138. En: **Jakobsen, M. y Narvhus, J.** 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy Journal* 6, 755-768.
- Silla Santos, M.H.,** 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal Food Microbiology.* 29, 213- 231.
- Simonetta, A.C.; Frison, L.N.; Moragues de Velasco, L.G.** 1998. Antibacterial activity of bacteriocin-like substances produced by *Enterococci* strains. *Microbiologie - Aliments - Nutrition.* 16, 281-288.
- Singh, H. and Waungana, A.** 2001. Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *Int. Dairy J.* 11, 543-551.

- Smibert, R. M. and Krieg, N. R.** 1981. Chap. 20. General characterization. *In: Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology. Washington, D. C., pp., 409-443.
- Smith, M.T.; van der Walt, J.P.; Johansen, E.** 1976. The genus *Stephanoascus* gen. nov. (Ascoideaceae). *Antonie van Leeuwenhoek* 42, 119-127.
- Software Infostat.** 2002, versión 1.1. Grupo Infostat, F. C. A., Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Sousa, M. J.; Ardö, Y.; McSweeney, P. L. H.** 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11, 327-345.
- Spaaij, F.; Weber, G.; Aoki, T.; van der Walt, J.P.** 1993. *Myxozyma nipponensis* sp. nov. (Candidaceae), a new yeast species recovered from a frass of *Ips typographus* F. *japonicus* Nijjima. *Journal of General and Applied Microbiology* 39, 521-528.
- Spaaij, F.; Weber, G.; van der Walt, J.P.** 1992. *Myxozyma sirexii* sp. nov. (Candidaceae), a new yeast species isolated from frass of woodwasp *Sirex juvencus* L. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 427-431.
- Stone, H. and Sidel, J.L.** 1985. *Sensory Evaluation Practiques*. Cap. 7. Academic Press. Florida, Estados Unidos.
- Suzzi, G. and Gardini, F.** 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 41– 54.
- Suzzi, G.; Gardini, F.; Fiore, C.; Caruso, M.; Lanorte, M.T.** 1998. A survey of yeast isolated from water-buffalo mozzarella cheese produced in Basilicata, in *Yeasts in the Dairy Industry: Positive & Negative aspects FIL 1998* I.S.B.N. 92 9098 027. Brussels, Belgium. pp. 44-49.
- Suzzi, G.; Schirone, R.; Martuscelli, M.; Gatti, M.; Fornasari, M. E.; Neviani, E.** 2003. Yeasts associated with Manteca. *FEMS Yeast Research* 3, 159-166.
- Tagg, J.R. and McGiven, A.R.** 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 21, 843-947.
- Tilbury, R.H.** 1980. Xerotolerant (osmophilic) yeast. *In: F.A. Skinner, S. Passmore and R.R. Davenport (Editors). Biology and Activities of Yeast.* Academic Press, London, pp. 153 – 180.
- Tokouka, T.** 1993. Sugar and salt –tolerant yeasts. I. *Appl. Bacteriol.* 74, 102-110.
- Tornadijo, M.E.; Marra, A.L.; García Fontán, M.C.; Prieto, B.; Carballo, J.** 1998. La calidad de la leche destinada a la fabricación de quesos: calidad química. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos* Vol. 2, N° 2, 79-91.

- Tudor, E., Board, R. 1993. Food-spoilage yeasts. In: Rose, A., Harrison, J. (Eds.). The Yeasts, Vol. 5. Academic Press, London, pp. 435–508.
- Tzanetakis, N.; Hatzikamari, M.; Litopoulou-Tzanetaki, E. 1998. Yeasts of the surface microflora of feta cheese, in Yeasts in the Dairy Industry: Positive & Negative aspects FIL 1998 I.S.B.N. 92 9098 027 Brussels, Belgium. pp. 34 – 43.
- Valdés-Stauber, N.; Scherer, S. Seifler, H. 1997. Identification of yeast and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. Int. J. Food Microbiol. 34, 115 – 129.
- van de Tempel, T. and Jacobsen, M. 1998. The technological characteristics of *Candida famata* isolated from Danablu, in Yeasts in the Dairy Industry: Positive & Negative aspects FIL 1998 I.S.B.N. 92 9098 027.Brussels, Belgium. pp. 59–69.
- van der Walt, J.P.; Weijman, A.C.M.; von Arx; J.A. 1981. The anamorphic yeast genus *Myxozyma* gen. nov. Sydowia Annales Mycologici 34, 191-198.
- Van Eck, J.H.; Prior, B.A.; Brandt, E.V. 1993. The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. J. Gen. Microbiol. 139, 1047-1054.
- Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. 1992. Compendium of methods for the Microbiological Examination of Food. Third edition. APHA Washington..
- Vasek, O.M. 2003. Fermento autóctono para la elaboración de Queso Artesanal de Corrientes. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina.
- Vasek, O. M. 2005. Fermento autóctono para la elaboración de queso artesanal de Corrientes. Industria & Química. Revista de la Asociación Química Argentina. ISSN 0368-0819, 351, 22-24.
- Vasek, O. M.; de Giori, G. S.; Fusco, A. J. V. 2000. Formulación y evaluación de fermentos para la elaboración de un queso artesanal de Corrientes (Argentina). Inf. Tecnol. 11, 6: 65-71.
- Vasek, O.M. ; Cabrera, Coronel, G.J. ; de Giori, G.S.; Fusco, A.J.V. 2004a. Análisis de riesgos en la elaboración de queso artesanal de Corrientes (Argentina). FACENA, ISN: 0325-4216, vol. 20, 13-22.
- Vasek, O.M., Fusco, A.; de Giori, G.S. 2004b. Cultivo iniciador de composición de fermento, proceso para su preparación, su uso para la elaboración de quesos artesanales y dicho queso. Solicitud de patente de invención con carácter definitivo por 20 años. INPI – P040102310.

- Veisseyre, R.** 1988. Cap. XII. Principios fundamentales de la tecnología quesera. *En: Lactología Técnica*. Acribia, Zaragoza, España, pp. 377-424.
- Viljoen, B.C.** 1998. The ecological diversity of yeasts in dairy products. In *Yeasts in the Dairy Industry: Positive & Negative aspects*. FIL 1998 I.S.B.N. 92 9098 027. Brussels, Belgium. pp. 70-77.
- Viljoen, B. C. and Greyling, T.** 1995. Yeasts associated with Cheddar and Gouda making. *Int. J. Food Microbiology* 28, 79-88.
- Viljoen, B.C.; Khoury, A.R.; Hattingh, A.** 2003. Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-ripened cheeses. *Food Research International* 36, 275-283.
- Vivier, D.; Rivemales, M; Revervel, J.P.; Ratomahenina, R.; Galzy, P.** 1994. Study of the growth of yeasts from feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* 22, 207-215.
- Walstra, P.** 1993. Chap. 5. The syneresis of curd. In: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 2th. (P. F. Fox ed.) Chapman and Hall, London, U. K., pp. 141-191.
- Walstra, P.** 1993. Chap. 5. The syneresis of curd. In: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 2th. (P. F. Fox ed.) Chapman and Hall, London, U. K., pp. 141-191.
- Weijman, A.C.M.; Rodrigues de Miranda, L.; van der Walt, J.P.** 1988. Redefinition of *Candida* Berkhout and the consequent emendation of *Cryptococcus* Kützing and *Rhodotorula* Harrison. *Antonie van Leeuwenhoek* 54, 545 – 553.
- Welthagen, J.J. and Viljoen, B.C.** 1998. Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *International Journal of Food Microbiology* 41, 185-194
- Welthagen, J. J. and Viljoen, B. C.** 1999. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Food Microbiology*, 16, 63 – 73.
- Westall, S. and Filtenborg, O.** 1998. Yeast occurrence in Danish feta cheese. *Food Microbiology*, 15, 215-222.
- Wickerham, L.J.** 1951. Taxonomy of yeasts. Techn. Bull. 1029, U.S. Dept. Agr., Washington, D.C.
- Wojtatowicz, M.; Chrzanowska, J.; Juszczak, P.; Skiba, A.; Gdula, A.** 2001. Identification and biochemical characteristics of yeast microflora of Rokpol cheese. *International Journal of Food Microbiology* 69, 135-140.
- Wyder, M. T. and Puhán, Z.** 1999. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in aseptic cheese curd slurries. *International Dairy Journal* 9, 117-24.

- Yamazaki, M. and Komagata, K. 1981. Taxonomic significance of electrophoretic comparison of enzymes in the genera *Rhodotorula* and *Rhodospirium*. International Journal of Systematic Bacteriology 31, 361-381.
- Zalazar, C.A. PICT 98. 1998. La producción y la Industria Láctea Argentina. Evolución. Estado actual. Perspectivas. Revista Argentina de Lactología N° 16, 27-75.