

UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL

SEDE ATENAS

ÁREA DE TECNOLOGÍA

CARRERA DE INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOPRESERVANTE DE LA BACTERIA

Lactobacillus curvatus B-LC-48 EN EL QUESO FRESCO

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE

LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

DANIELA ARCE HERRERA

ATENAS, COSTA RICA

2019

DECLARACIÓN JURADA

Yo, Daniela María Arce Herrera portadora de la cédula de identidad número 113360536 estudiante de la Universidad Técnica Nacional, UTN, en la carrera de Ingeniería en Tecnología de alimentos, conocedora de las sanciones legales con que la Ley Penal de la República de Costa Rica castiga el falso testimonio y el delito de perjurio que pueda ocasionarse ante la Directora de Carrera y quienes constituyen el Tribunal Examinador de este trabajo de investigación, juro que este trabajo de investigación es una obra original respetando las leyes y que ha sido elaborada siguiendo las disposiciones exigidas por la Universidad Técnica Nacional, UTN, así como con los derechos de autor.

En fe de lo anterior, firmo en la ciudad de Atenas, a los diecisiete días del mes de mayo del dos mil diecinueve.

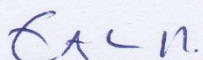


Daniela María Arce Herrera

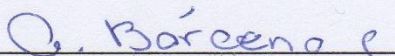
Cédula 113360536

HOJA DE APROBACIÓN

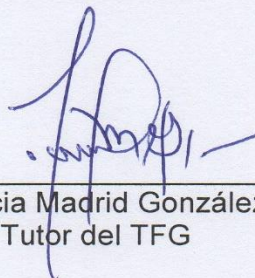
Este Trabajo Final de Graduación fue aprobado por el Tribunal Evaluador como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Tecnología de Alimentos



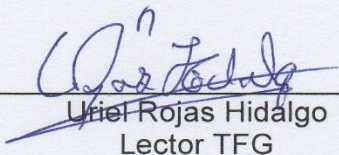
Eduardo Barrantes Guevara
Director Investigación Sede Atenas



Ana María Bárcenas Parra
Directora de Carrera



Francia Madrid González
Tutor del TFG



Uriel Rojas Hidalgo
Lector TFG



Carlos Hernández Aguirre
Lector TFG

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar a concluir una de las tantas metas que deseo alcanzar en mi carrera profesional, por ser aquella inspiración y apoyo durante todo mi proceso de formación como profesional en una de las áreas científicas más importantes para el ser humano como lo son los alimentos.

A mis padres Lorena Herrera y Daniel Arce por ser las personas que me apoyaron siempre con lo que necesitara durante todo el proceso de formación académica. Fueron un motor fundamental para lograr esta meta.

Y también le quiero dedicar este logro a todas aquellas personas que de alguna u otra manera me ayudaron a realizar dicho proyecto.

AGRADECIMIENTO

Primordialmente, este proyecto es gracias a Dios por darme la oportunidad de la vida y la salud para alcanzar realizarlo, sin su bendición no hubiese sido posible llevarlo a cabo. Seguidamente, el apoyo de mis padres, Daniel y Lorena, ha sido el pilar fundamental para desarrollarlo. Ellos son las personas más importantes para mí y han estado en todas las etapas de mi vida, apoyándome, amándome, escuchándome, aconsejándome y motivándome. No tengo las palabras para agradecerles todo lo que han hecho y hacen por mí.

A Francia Madrid González como tutora del proyecto y a quien le agradezco su apoyo, tiempo, dedicación, constancia y guía durante el desarrollo de este. Además, a sus compañeros de la corporación Grupo ASEAL que me ayudaron en varias etapas del proyecto.

Por otro lado, le agradezco infinitamente a la directora de la carrera de Ingeniería en Tecnología de Alimentos, Ana María Bárcenas, quien siempre me apoyó en todas las etapas del proyecto, creyó en mi capacidad y en mis ganas de graduarme. Gracias por estar siempre dispuesta a dar lo mejor por sus estudiantes y brindarme su tiempo para aconsejarme.

Finalmente, este proyecto de graduación se realizó por un conjunto de apoyos en infraestructura, materiales, equipos y recurso humano que he recibido de muchas personas, empresas y universidades. Algunas de ellas son la empresa Coopebrisas R.L., Industrias To Quesitos S.A., al personal de la planta de lácteos de la Universidad Técnica Nacional sede Atenas y al decano Rodney Cordero, profesores y funcionarios de la UTN: Freddy Velázquez, Verny Montoya, Catalina Chaves, Cristian Rojas, al director Mario Chaves y Michael Abarca del Laboratorio SupliLab, al profesor Carlos Hernández y Alejandra Mensía del Laboratorio de Calidad Agroalimentaria (CIAGRO) de la Universidad Nacional, así como el apoyo del coordinador del Laboratorio de Biotecnología de Docencia, Ángel Herrera. Compañeros de trabajo y jefaturas de la Escuela de Ciencias Biológicas de la

Universidad Nacional como Nancy Villalobos, Tania Bermúdez, Junior Pérez, Abad Rodríguez, Fabián Araya, Stefany Solano, entre otros.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN EJECUTIVO	xii
I. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Objetivo general.....	17
1.2. Objetivos específicos	17
1.3. Hipótesis.....	17
1.3.1. Hipótesis de análisis fisicoquímicos.....	18
1.3.2. Hipótesis de análisis sensoriales.....	19
II. MARCO TEÓRICO.....	20
2.1. Bacterias ácido lácticas y su importancia en la industria alimenticia	20
2.2. Aplicación de las BAL como cultivos bioconservantes en la industria de alimentos	22
2.3. Utilización de <i>Lactobacillus curvatus</i> para la bioconservación de alimentos	28
2.4. Queso fresco	30
2.5. Control de vida anaquel en quesos frescos	31
2.6. Microbiología del queso fresco y su contaminación	33
III. MARCO METODOLÓGICO	36
3.1. Materiales y métodos.....	36
3.2. Diseño experimental	37
3.3. Análisis fisicoquímicos de los quesos frescos	38
3.3.1. Análisis de humedad	38
3.3.2. Análisis de pH	40
3.3.3. Análisis de textura	41

3.4. Análisis microbiológicos	43
3.5. Análisis sensorial de los quesos frescos	43
3.5.1. Selección de los jueces	45
3.5.2. Orientación de los jueces	45
3.5.3. Preparación de las muestras y materiales	46
3.5.4. Evaluación de las muestras	47
3.6. Análisis de datos.....	48
3.6.1. Análisis de varianza (ANOVA).....	49
3.6.2. Análisis de chi cuadrado (X^2) de contingencia	50
3.6.3. Prueba binomial	51
IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	52
4.1. Análisis fisicoquímicos	52
4.1.1. Variable de pH	54
4.1.2. Variable de humedad	55
4.1.3. Variable de textura	57
4.2. Problemas en planta, proceso y análisis microbiológicos.....	62
4.3. Análisis sensoriales	64
4.3.1. Resultados del análisis de escala hedónica	65
4.3.2. Resultados de la prueba triangular	71
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	74
5.1. Conclusiones	74
5.2. Recomendaciones	75
VI. REFERENCIAS	77
VII. GLOSARIO	84
VIII. APÉNDICES	86

Apéndice 1. Procedimiento de elaboración del queso fresco sin el cultivo B-LC-48 en la planta de lácteos	86
Apéndice 2. Procedimiento de elaboración del queso fresco con el cultivo B-LC-48 en la planta de lácteos.....	87
Apéndice 3. Procedimiento de elaboración del queso fresco sin el cultivo B-LC-48 en el laboratorio.....	91
Apéndice 4. Procedimiento de elaboración del queso fresco con el cultivo B-LC-48 en el laboratorio.....	91
IX. ANEXOS.....	96
Anexo 1. Instrumentos y desarrollo de algunas etapas del proceso de análisis.....	96
Anexo 2. Cuestionarios para participar en el panel sensorial.....	99
Anexo 3. Guía de características sensoriales para la evaluación de queso fresco.....	100
Anexo 4. Prueba triangular	103
Anexo 5. Prueba de escala hedónica para el QCC producido en el laboratorio.....	104
Anexo 6. Análisis microbiológicos.....	105
Anexo 7. Carta de constancia en la acreditación de los análisis microbiológicos realizados por Laboratorio Suplilab.....	108

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. ANDEVA de tres vías para los parámetros fisicoquímicos en dos tipos de queso (sin y con cultivo) proveniente de tres diferentes lotes de producción (L1, L2 y L3) en cuatro fechas de medición (0, 7, 15 y 21 días).	52
Tabla 2. Resultados microbiológicos del día 1 en ambos tipos de queso.	105

Tabla 3. Monitoreo de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a través de la vida útil del queso fresco.	106
Tabla 4. Monitoreo de las BAL y <i>E. coli</i> a través de la vida útil del queso fresco del lote 1 y 2.	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales modos de acción propuestos para las bacteriocinas.	27
Figura 2. Gráfica general del análisis del perfil de textura en un alimento.	42
Figura 3. Comportamiento del pH a través de la vida útil del queso fresco.	55
Figura 4. Comportamiento de la humedad a través de la vida útil del queso fresco.	56
Figura 5. Comportamiento de la dureza a través de la vida útil del queso fresco.	58
Figura 6. Comportamiento de la elasticidad a través de la vida útil del queso fresco.	59
Figura 7. Comportamiento de la gomosidad a través de la vida útil del queso fresco.	61
Figura 8. Opinión de los panelistas no entrenados a través de la vida útil del QCC.	65
Figura 9. Categorías del olor a través de la vida útil del QCC.	66
Figura 10. Categorías del color a través de la vida útil del QCC.	67
Figura 11. Categorías de la textura a través de la vida útil del QCC.	68
Figura 12. Categorías del sabor a través de la vida útil del QCC.	69
Figura 13. Comparación de texturas del QSC vs QCC el día 21 de vida útil de tres lotes elaborados en planta.	70

Figura 14. Horno de convección forzada modelo DK-500 y la balanza analítica modelo AS220.R2.	96
Figura 15. QSC y QCC rallados para realizar la prueba de humedad.	96
Figura 16. Análisis de pH de los quesos.....	96
Figura 17. Texturómetro marca Stable Micro Systems modelo TA.XT Plus.....	97
Figura 18. Materiales entregados a los panelistas para el análisis sensorial.	97
Figura 19. Cubículos del aula de tecnología de alimentos de la UTN.	97
Figura 20. Evaluación sensorial en el laboratorio de docencia de la UNA.	98
Figura 21. Gráfico de monitoreo de la temperatura de almacenamiento de los lotes 1 y 2.	98
Figura 22. Gráfico de monitoreo de la temperatura de almacenamiento de los quesos producidos en el laboratorio.	98

RESUMEN EJECUTIVO

La creciente demanda de productos más saludables ha ocasionado el desarrollo de nuevas tecnologías de conservación que no implican riesgos para la salud, pero que, a su vez, no alteran las características organolépticas del alimento. Por consiguiente, se ha desarrollado la biopreservación, la cual se define como la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad de los alimentos utilizando cultivos microbianos que inhiben patógenos y otros microorganismos por medio de la producción de metabolitos, sin modificar las características sensoriales de los alimentos.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto biopreservante de la bacteria *Lactobacillus curvatus* B-LC-48, por medio de análisis físico-químicos y sensoriales sobre la vida útil del queso fresco. Para ello, se realizaron tres lotes de producción en la planta de lácteos de la UTN, en la cual se elaboraron 2 tipos de queso (uno con y otro sin cultivo), para compararlos a través de la vida útil promedio de un queso fresco. Para los análisis fisicoquímicos, se estudió por triplicado el pH, la humedad y la textura del queso por medio de un TPA en los días 1, 7, 15 y 21 de vida útil. Los principales resultados en el pH, la humedad y la textura muestran que no hubo una diferencia significativa entre los QSC vs los QCC, lo cual determina que no hubo una influencia significativa del cultivo B-LC-48 en las tendencias de los parámetros fisicoquímicos entre quesos producidos bajo las mismas condiciones.

Para la evaluación sensorial, se llevó a cabo con panelistas no entrenados entre 18 y 67 años de edad, consumidores de queso fresco y que gozaban de buena salud en los días de almacenamiento 8, 15 y 22. Para dichos días, se realizó una evaluación hedónica no verbal para el QCC del color, olor, textura y sabor. En general, los panelistas tuvieron una buena percepción y aceptación del queso a través de la vida útil de este producto. Para verificar si los panelistas detectaban una diferencia significativa a nivel sensorial entre los dos tipos de queso, se realizó una prueba triangular en la cual la mayoría detectó una diferencia entre el QCC y

el QSC, pero se recomienda realizar más ensayos para determinar si la tendencia es siempre la misma o es un evento poco usual.

En términos generales, con las variables estudiadas, no se observa una diferencia significativa sobre el alargamiento de la vida útil o mejora del queso fresco, no obstante, hay una buena aceptación a nivel sensorial por parte de los consumidores. Además, el efecto biopreservante de la bacteria *Lactobacillus curvatus* B-LC-48 se ve influenciado por muchos factores intrínsecos y extrínsecos en la fabricación del queso fresco. Una evidencia de ello son las diferencias entre lotes que se dieron por otros factores ajenos al cultivo biopreservante. Es por esto que se recomienda mantener bajo control todos los puntos críticos de control a lo largo de toda su cadena productiva.

I. INTRODUCCIÓN

Costa Rica ha sido el país del área centroamericana con mayor procesamiento industrial de leche fresca y, además, uno de los países con el mayor consumo *per cápita* de Latinoamérica. Al respecto Barquero (2016) menciona lo siguiente:

De acuerdo con datos de la Cámara Nacional de Productores de Leche, Costa Rica destina 466 millones de litros anuales de leche a la elaboración de quesos. Un 80% (355 millones de litros anuales) de la leche que llega a las pequeñas y medianas empresas (pymes) procesadoras se hace en quesos. En el caso de las grandes industrias, se calcula que un 10% de la leche que procesan (111 millones de litros anuales) se utiliza para elaborar quesos.

Según el presidente de la Cámara Nacional de Productores de Leche, José Antonio Madriz, el queso es el producto más conocido de los derivados lácteos en Costa Rica y ocupa el segundo lugar en comercialización de lácteos en el país, lo que indica la alta producción y consumo de este tipo de alimento (Barquero 2016).

La producción de queso fresco en el país, al igual que en el resto de América Latina, se debe a factores socioculturales que han marcado su preferencia por el consumidor costarricense en comparación con el consumo de quesos maduros (Fallas-Rodríguez, 2015). Este argumento es reforzado por los datos del año 2001, ya que el consumo *per cápita* de productos lácteos en Costa Rica, mencionado por Chavarría et al. (2006), fue estimado en 192,2 kg ELF / habitante (expresado en unidades equivalentes de leche fluida), en el cual 35 % es de queso, 27,5 % de leche fluida, 19,1 % de natilla y yogurt, 12,7 % de leche en polvo y el restante 5,6 % por leches evaporadas y condensadas, helados y mantequilla, lo cual refuerza que el mayor derivado lácteo consumido por el costarricense es el queso.

En la actividad quesera participa tanto el sector artesanal como industrial, pero con la diferencia que el artesanal destina el 89 % de la leche en producir

quesos (Barrantes, 2013, citado en Fallas-Rodríguez, 2015). En el sector artesanal, aún mantienen el uso de leche cruda como materia prima para la producción del queso, lo cual preocupa por el riesgo microbiológico que esto conlleva y, además, sumado a la falta de controles durante su procesamiento y capacitación de los productores y/o comerciantes en temas de inocuidad alimentaria agrava más la situación.

Debido a lo anterior y dado que en el país el consumo de este lácteo es tan importante, la vigilancia en cuanto a su calidad microbiológica se vuelve un tema indispensable para las instituciones vinculadas al Sistema de Vigilancia de la Salud, así como para los consumidores y productores. Es por ello que se buscan diferentes controles y métodos de conservación para controlar los microorganismos responsables de enfermedades y el deterioro de la vida útil del queso.

Estudios realizados en el país han señalado que los lácteos son uno de los alimentos con mayor riesgo de adquirir una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA) para el consumidor, ya que la cantidad, forma de consumo y riesgo de contaminación microbiológica lo hace un candidato ideal para enfermar a la población costarricense (Blanco et al., s.f.). En el caso del queso fresco o no madurado es un producto que, por su naturaleza nutricional y materia prima, es muy susceptible a la contaminación con microorganismos no deseables que pueden causar un problema de salud en las personas y/o pueden disminuir la vida útil de estos productos, trayendo pérdidas económicas para los fabricantes.

De acuerdo con lo mencionado por Acuña et al. (2004), citado en Blanco et al. (s.f.) y Kopper (2009), en Costa Rica el queso fresco es muy frecuente que pueda tener bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y coliformes fecales en niveles por encima de los límites aceptables establecidos por la normativa vigente, lo que representa un riesgo para la salud del consumidor. Algunos de los factores que favorecen este riesgo microbiológico es la elaboración del queso con leche cruda no pasteurizada,

deficiencias en la manipulación y almacenamiento del queso (se mantienen a temperaturas superiores a los 6 °C y posibilidades de contaminación cruzada), falta de capacitación y seguimiento a los productores para mejorar la calidad del producto, falta de controles y registros por parte de las autoridades responsables, ya que muchos de estos productos se vendían al consumidor en ferias del agricultor, pulperías, minisuper y supermercados sin registro sanitario del Ministerio de Salud, además de desconocimiento por parte de los vendedores sobre la procedencia de los quesos, lo cual impediría la trazabilidad del producto en el caso de brotes de ETA.

Lo mencionado anteriormente refuerza la necesidad de mejorar y controlar todos los factores de riesgo de contaminación microbiológica a un producto de alto consumo en el país, como lo es el queso fresco. Es por ello por lo que la vigilancia y control en cuanto a la calidad microbiológica se vuelve un tema indispensable tanto para el productor como para el consumidor, ya que ambos necesitan vender o adquirir quesos frescos que mantengan la calidad e inocuidad a través del tiempo.

Para solucionar dicho problema, aparte de implementar medidas de control durante la producción, también se agregan aditivos químicos que contribuyen a mantener la calidad y a conservarlos por más tiempo, lo cual favorece a proteger la seguridad e inocuidad de los mismos. Debido a ello, surgen las necesidades de crear y/o utilizar alternativas innovadoras para su conservación, pues el mercado actual demanda productos naturales, tradicionales y sin aditivos químicos (productos mínimamente procesados), lo cual obliga al desarrollo de nuevas estrategias para prolongar la vida útil de los alimentos.

Las consideraciones anteriores y las tendencias actuales están conllevando a que los fabricantes de alimentos busquen innovar y desarrollar productos que faciliten su preservación, lo cual implica al reto de reformular dichos productos y/o probar métodos alternativos de conservación, pero tratando de dejar a un lado los aditivos químicos. De ahí, surge la necesidad de utilizar cultivos biopreservantes que ayuden de forma más natural al control de la microflora presente en los quesos,

dando un valor agregado que le asegura al consumidor la adquisición de un alimento inocuo y sin deterioro, pero, además, le da al fabricante un posicionamiento en el mercado local y global al complacer las tendencias actuales por tener productos con más etiquetas limpias.

La biopreservación de alimentos es una alternativa como método de conservación que viene a ayudar a alargar la vida útil de los alimentos usando sustancias naturales y/o microorganismos nobles, como lo son las bacterias ácido lácticas (BAL) y sus metabolitos, lo cual, a su vez, garantiza la seguridad microbiológica y reduce el uso de conservantes sin modificar las características sensoriales y nutricionales de los productos (Vásquez, Suárez y Montoya, 2009).

Según Vásquez et al. (2009), “las BAL son usadas en la biopreservación como cultivos bioprotectores y se han destacado por ser microorganismos que mediante la producción de ácido láctico y otros metabolitos contrarrestan el crecimiento de bacterias no deseadas” (p. 228). Son un grupo de microorganismos amplio y se caracterizan por ser Gram positivos no esporulados, anaeróbicos, aerotolerantes y acidotolerantes. Entre los géneros se incluyen los *Lactococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Leuconostoc sp.* y bacilos de los géneros *Carnobacterium sp.* y *Lactobacillus sp.* (Jácome, et. al, 2013). El poder conservante de estas bacterias se debe, en gran medida, al efecto antagonista que presentan al generar sustancias antimicrobianas, como por ejemplo, las bacteriocinas y, además, compiten con otros microorganismos por nutrientes y hábitats.

La bacteria *Lactobacillus curvatus* se ha utilizado como cultivo bioprotector de productos alimenticios, se ha visto su capacidad de suprimir el desarrollo de bacterias dañinas y patógenas, crece dentro de un amplio rango de temperaturas que va desde los 4 hasta los 40 °C y sobrevive a la congelación. Su poder bioprotector se debe, principalmente, a la producción de curvatina, péptido generado durante su metabolismo, que tiene la propiedad de funcionar como bacteriocina y bacterioestático contra microorganismos Gram + y Gram - (Chr. Hansen, 2014).

Debido a que un producto como el queso fresco es muy susceptible a la contaminación con patógenos y/o microorganismos de deterioro, ya sea durante su fabricación o su consumo, se pretende evaluar la acción de la BAL *Lactobacillus curvatus* en la vida útil del producto analizando sus características sensoriales y físico-químicas. Con ello, se reforzaría la calidad de un producto muy consumido por los costarricenses, ya que se ofrece una alternativa de conservación innovadora a la industria láctea de Costa Rica, además de ser un aditivo natural y GRAS.

1.1. Objetivo general

Determinar el efecto biopreservante de la bacteria *Lactobacillus curvatus* B-LC-48, por medio de análisis físico-químicos y sensoriales sobre la vida útil del queso fresco.

1.2. Objetivos específicos

- a) Realizar análisis físico-químicos de pH, humedad y textura al día 1, 7, 15 y 21 desde su fabricación (durante la vida útil promedio del queso fresco), inoculado con o sin la bacteria *Lactobacillus curvatus* B-LC-48.
- b) Evaluar el efecto de la bacteria *Lactobacillus curvatus* B-LC-48 sobre las características sensoriales del queso fresco al día 8, 15 y 22 desde su fabricación por medio de un panel sensorial no entrenado.

1.3. Hipótesis

Basándose en las investigaciones en torno a la bioprotección que genera la bacteria *Lactobacillus curvatus*, se quiso utilizar un inóculo de 25 g de cultivo liofilizado en 1300 L de leche durante la fabricación de queso fresco y verificar si, a lo largo de su vida útil, mantiene en mejores condiciones las características físico-químicos y sensoriales en comparación con un queso fresco que no tenga incorporado estas bacterias. Se plantean las siguientes hipótesis a un nivel de confianza de 95 % para cada una de las variables por analizar.

1.3.1. Hipótesis de análisis fisicoquímicos

De acuerdo con las variables físicoquímicas, tanto para el queso con cultivo (QCC) como para el queso sin cultivo (QSC), se pretende determinar si los resultados de las muestras son diferentes, por lo tanto, se plantean las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula (H_0):

- a) No existe diferencia en el pH obtenido en la fabricación del QSC (patrón) vs el QCC a lo largo de la vida útil promedio en los días 1, 7, 15 y 21 desde su producción.
- b) No existe diferencia en la humedad obtenida en la fabricación del QSC vs el QCC a lo largo de la vida útil promedio en los días 1, 7, 15 y 21 desde su producción.
- c) No existe diferencia en la textura obtenida en la fabricación del QSC vs el QCC a lo largo de la vida útil promedio en los días 1, 7, 15 y 21 desde su producción.

Hipótesis alternativa (H_A):

- a) El pH obtenido en la producción del QCC es menor que el pH del QSC a través de los diferentes días de muestreo a lo largo de la vida útil promedio del queso fresco.
- b) La humedad obtenida en la producción del QCC es mayor que la resultante del QSC a través de los diferentes días de muestreo a lo largo de la vida útil promedio del queso fresco.
- c) La textura obtenida en la producción del QCC es mejor que la resultante del QSC a través de los diferentes días de muestreo a lo largo de la vida útil promedio del queso fresco.

1.3.2. Hipótesis de análisis sensoriales

Para las variables de las características sensoriales se comparan los dos tipos de quesos para determinar el contraste de las hipótesis que se detallan a continuación:

Hipótesis nula:

- a) No existe diferencia en el aroma detectado del QCC a través de la vida útil en los días 8, 15 y 22 desde su fabricación.
- b) No existe diferencia en la apariencia detectada del QCC a través de la vida útil en los días 8, 15 y 22 desde su fabricación.
- c) No existe diferencia en la textura al tacto del QCC a través de la vida útil en los días 8, 15 y 22 desde su fabricación.
- d) No existe diferencia en la textura detectada en la boca del QCC a través de la vida útil en los días 8, 15 y 22 desde su fabricación.
- e) No existe diferencia en el sabor detectado del QCC a través de la vida útil en los días 8, 15 y 22 desde su fabricación.

Hipótesis alternativa:

- a) El aroma evaluado del QCC es diferente a través de la vida útil en los días 8, 15 y 22 desde su fabricación.
- b) La apariencia evaluada del QCC es diferente a través de la vida útil en los días 8, 15 y 22 desde su fabricación.
- c) La textura al tacto del QCC es diferente a través de la vida útil en los días 8, 15 y 22 desde su fabricación.
- d) La textura en la boca del QCC es diferente a través de la vida útil en los días 8, 15 y 22 desde su fabricación.
- e) El sabor evaluado del QCC es diferente a través de la vida útil en los días 8, 15 y 22 desde su fabricación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bacterias ácido lácticas y su importancia en la industria alimenticia

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos muy utilizados durante mucho tiempo en fermentaciones industriales, ya que producen diversas sustancias de interés para la industria tanto farmacéutica como de alimentos. Por ejemplo, son productoras de ácido láctico, espesantes, bacteriocinas, etanol, son la base de la mayoría de las preparaciones probióticas en la industria farmacéutica, etc. Además, aportan valor nutritivo a los productos alimenticios y su producción tiene un bajo costo energético (Cabeza-Herrera, 2006).

En la industria de alimentos, estas bacterias son indispensables para la producción de alimentos fermentados y, según su función, puede clasificarse de acuerdo con la finalidad que se quiere conseguir, las cuales son como cultivos iniciadores para inducir cambios en el sabor, aroma, color y textura al metabolizar las proteínas, azúcares y lípidos de los alimentos, cambiar la digestibilidad y palatabilidad de las materias primas. Esto permite la obtención de productos finales con características reológicas y organolépticas diferentes (Vásquez et al., 2009, citado en Fernández-Villa et al. 2014; Gómez-Sala, 2013).

Algunos de estos productos pueden ser cultivos protectores para garantizar la calidad higiénico-sanitaria y seguridad de los alimentos, así como para incrementar su vida útil, o cultivos adjuntos que pueden acelerar la maduración mediante la lisis celular de los cultivos iniciadores durante la fabricación de algunos tipos de quesos, lo cual produce el sabor y aroma deseado por el fabricante (O'Sullivan et al., 2002, citado en Gómez-Sala, 2013).

Las BAL se caracterizan por ser Gram positivas, no esporuladas, con formas en bastones o cocos, catalasa-negativas, carentes de citocromos, microaerófilos o anaerobios facultativos, ácido-tolerantes y con un metabolismo estrictamente fermentativo, ya sea fermentando los azúcares para producir ácido láctico como

producto mayorista de la fermentación vía Embden-Meyer-glucólisis (fermentación láctica homofermentativa) o etanol, acetato y CO₂ por la vía del ácido-6-fosfogluconico (fermentación láctica heterofermentativa) (Cabeza-Herrera, 2006).

Las BAL de importancia en la industria de alimentos pertenecen a los géneros *Carnobacterium sp.*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Paralactobacillus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Streptococcus sp.* y *Weissella sp.* En la industria láctea el género *Lactobacillus sp.* es una de las más importantes, ya que se usa para la producción de leches fermentadas. Además, se utilizan otras BAL que pertenecen a las familias Streptococcaceae y Lactobacillaceae como cultivos iniciadores para la obtención de yogurt y diversos quesos tanto frescos como madurados (Cabeza-Herrera, 2006). Por otro lado, este género también se emplea para producir vegetales fermentados (como encurtidos, ensilaje, chucrut), bebidas (como zumos, cerveza, vino), masa agria y embutidos (Mora-Peñaflor y García-Guerrero, 2007).

Por otra parte, las bacterias lácticas tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos alterantes y/o patógenos presentes en los alimentos. Este efecto antagónico se debe principalmente a la competencia por los nutrientes del sustrato y a la formación de ácidos orgánicos, como ácido láctico y ácido acético, que provocan una disminución del pH. También, dichas bacterias producen otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo (producto de fermentación), acetaldehído, peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno, isómeros D de los aminoácidos, compuestos no proteicos de bajo peso molecular (reuterina, reuterociclina y ácido piroglutámico) “y otros compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular y, por último, sustancias proteicas de síntesis ribosomal denominadas bacteriocinas” (Gómez-Sala, 2013, p.81; Jácome, et. al, 2013).

De acuerdo con un estudio realizado por Topisirovic et al. (2006), citado en Cabeza-Herrera (2006), se observó que varias cepas de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas tenían un efecto antimicrobiano contra bacterias no-patógenas y patógenas, por lo que concluyen que “la presencia de este grupo de

bacterias en los alimentos además de modificar sus propiedades físicoquímicas, sensoriales y de textura, puede contribuir a un efecto protector de los mismos e incrementar su vida útil” (p. 3).

Por esta razón, son microorganismos muy útiles en la salud humana para prevenir infecciones e intoxicaciones alimentarias, pues inhiben la adhesión de patógenos por exclusión competitiva y, en consecuencia, disminuyen la posibilidad de transmisión de patógenos a través de alimentos (Fernández-Villa et al. 2014).

Por otra parte, también las BAL han demostrado ser inmunoestimulantes, al mejorar el sistema inmune de las personas que las consumen, además, ayudan a mantener el equilibrio bacteriano normal del intestino, mejoran la digestión, controlan infecciones intestinales, facilitan la digestión de la lactosa, reducen los niveles de colesterol sanguíneo, mejoran la absorción del calcio, aumentan la síntesis de vitaminas y mejoran la predigestión de las proteínas, contribuyen a inhibir el desarrollo de algunos tipos de cáncer, poseen actividad antimutagénica e, incluso, regulan la respuesta emocional a través de alteraciones de la expresión de receptores del ácido γ -amino butírico (GABA), por lo que modulan el estrés y mejoran los síntomas de ansiedad (Galdeano y Perdigon, 2006 citado en Fernández-Villa et al. 2014; Gómez-Sala, 2013).

2.2. Aplicación de las BAL como cultivos bioconservantes en la industria de alimentos

La conservación de los alimentos son un conjunto de métodos y procesos de elaboración para mantener los productos alimenticios durante más tiempo y de forma inocua para ser consumidos. Es un tema muy importante para los productores, ya que permite mantener la existencia de productos y suplir su carencia en épocas en que no pueden ser producidos o necesitan ser transportados a lugares donde no se pueden conseguir.

La clave de la conservación es evitar al mayor tiempo posible el proceso de descomposición de cada tipo de alimento, pues durante su estado natural se dan

transformaciones físicoquímicas, bioquímicas y microbiológicas, que incluyen cambios de color, aroma y sabor, fermentaciones, transformaciones de azúcares, desarrollo de mohos, alteraciones en la textura, entre otras.

Actualmente, el consumidor se ha vuelto más exigente en cuanto a la calidad, frescura y expectativas de un producto beneficioso para la salud. Es por ello que la creciente demanda de productos más saludables ha ocasionado el desarrollo de nuevas tecnologías de conservación que no impliquen riesgos para la salud, pero que, a su vez, no alteren las características organolépticas del alimento.

Para ello, los fabricantes de alimentos han tenido que modificar o buscar alternativas de conservación que sustituyan los métodos de conservación químicos, como el uso de preservantes por métodos de tipo biológico, por ejemplo, la utilización de microorganismos beneficiosos, lo cual se denomina bioconservación.

La bioconservación se define como la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad de los alimentos utilizando cultivos microbianos o protectores que inhiben patógenos y otros microorganismos por medio de la producción de metabolitos, sin modificar las características sensoriales del alimento al que se agregan (Álvarez et al., 2014).

Puede ser aplicada en los alimentos de forma *in situ*, inoculando la cepa bioprotectora directamente al alimento o *ex situ*, donde la bacteriocina es producida fuera del alimento bajo condiciones controladas y, luego, introducida al alimento. A continuación, se detallan los métodos *in situ* y *ex situ* mencionados por Vásquez, Suárez y Zapata, (2009):

- 1- Se agrega un cultivo puro BAL viables productoras de bacteriocina. Su efecto depende de su capacidad para crecer y producir la bacteriocina en el alimento bajo condiciones ambientales y tecnológicas como la temperatura, aditivos, pH, entre otros.

2- Se agrega las BAL mesófilas como una protección contra el abuso de temperatura. En este caso bajo condiciones frías, la cepa bioprotectora se mantendrá en una concentración inicial pero cuando haya un abuso de temperatura, la cepa crecerá competitivamente frente a la bacteria patógena o podría actuar como microorganismo de deterioro predominante, asegurando así que el alimento no sea consumido o manteniendo la inocuidad del producto alimenticio.

3- Se adicionan preparaciones de bacteriocina cruda (extracto crudo), licor fermentado o concentrados resultado del crecimiento de BAL productoras de bacteriocina en un sustrato complejo.

4- Se añaden sustancias antagónicas puras o semipuras como las bacteriocinas producidas por BAL. Este método ayuda a controlar la dosis de bacteriocina pero su aplicación se limita conforme a la regulación de aditivos para alimentos de cada país.

La biopreservación es una técnica que trae muchas ventajas, ya que es una solución segura y con menos limitaciones que los conservantes químicos, porque se produce de forma natural en la matriz de los alimentos, no se conocen resistencias y el impacto ambiental es mínimo, porque se eliminan rápidamente por la cadena alimentaria.

Además, tienen un espectro de inhibición específico, son estables a un amplio rango de valores de pH, su actividad se ve potenciada por el pH y la sinergia con otras sustancias metabólicas antimicrobianos, presentan estabilidad en condiciones extremas como las que tienen lugar durante la fermentación de los productos cárnicos y lácteos o al calor, tienen actividad antimicrobiana a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo, presentan resistencia a la renina y son compatibles con las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores. Igualmente, su utilización ayuda al etiquetado de producto ecológico libre de preservantes químicos de síntesis. Las desventajas que podrían ocurrir es la

posible alteración de las propiedades sensoriales de los alimentos (Jácome, et. al, 2013; Gómez-Sala, 2013).

El uso de la biopreservación es, sin duda, una forma de control adicional a las buenas prácticas de manufactura durante el procesamiento, almacenamiento y distribución de los alimentos. Por consiguiente:

[...] las bacteriocinas no deben ser consideradas como inhibidores por sí mismas ya que actúan sinérgicamente como una barrera adicional con otros métodos de preservación, en la que los efectos combinados del pH, la temperatura y disponibilidad de oxígeno en forma simultánea sirven para preservar el alimento (Castellano et al. 2008 citado en Vásquez et al. 2009, p. 69).

Las bacteriocinas son un grupo de péptidos antimicrobianos sintetizados en los ribosomas, producto del metabolismo primario y/o secundario, que tienen acción bactericida o bacteriostática sobre microorganismos sensibles de la misma especie o estrechamente relacionados, son termoestables, ya que algunas soportan hasta 121 °C durante 15 minutos y son resistentes a la acción de muchas proteasas (Madigan et al. 2004; Doyle y Beuchat, 2007 citado en Mora-Peñaflor y García-Guerrero 2007).

Asimismo, las bacteriocinas son solubles en agua, activas en amplios valores de pH, no aportan sabor ni aromas, inocuas y tienen un corto espectro de acción antibacteriana. En el caso de la termoestabilidad, esta disminuye cuando los tratamientos térmicos se realizan con las bacteriocinas purificadas parcialmente (Cristóbal-Delgado, 2008).

Uno de los grupos bacterianos productores de bacteriocinas más estudiados es el de las bacterias ácido lácticas, las cuales se clasificaron en 5 clases, según la propuesta de Kemperman et al. (2003), citado en Monroy-Dosta, Castro-Barrera, Fernández-Perrino y Mayorga-Reyes, (2009). Su clasificación se debe principalmente a sus características bioquímicas y genéticas como su tamaño

molecular, composición aminoacídica y estructura química, estabilidad frente a pH y termorresistencia (Cristóbal-Delgado, 2008). Estas se mencionan a continuación:

Clase I: son péptidos con aminoácidos modificados llamados lantibióticos, son bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<5 KDa) y tienen poca estabilidad al calor.

Clase II: no lantibióticos son bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Son péptidos de pequeño tamaño molecular (<10 KDa), termoestables y que actúan a nivel de la membrana citoplasmática.

Clase III: bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 KDa) caracterizadas por ser termolábiles (se inactivan con tratamientos térmicos de 60-100°C durante 10 a 15 minutos). La mayoría de estas bacteriocinas son producidas por *Lactobacillus* sp.

Clase IV: bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones glucocídicos y/o lipídicos necesarios para su actividad biológica.

Clase V: bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente.

Muchas bacteriocinas de bacterias lácticas “desestabilizan y permeabilizan la membrana citoplasmática por medio de la formación de poros transitorios o canales iónicos que causan la disipación o reducción de la fuerza motriz de la célula debido a la interacción con polímeros aniónicos que constituyen la pared celular” (Grande et al, 2005 citado en Rojas y Vargas, 2008, p. 11). Al ocurrir la formación de poros y la eliminación de la fuerza motriz protónica que es la fuente de energía celular, causan la salida rápida de metabolitos de pequeño tamaño (como aminoácidos y nucleótidos), lo cual impide los procesos de biosíntesis de la célula. Además de lo antes mencionado, algunas bacteriocinas provocan la lisis celular como modo de acción secundario (Cristóbal-Delgado, 2008).

La eficiencia de la asociación de la bacteriocina con el citoplasma va a depender de la composición y distribución de los fosfolípidos de la membrana celular, ya que influye en su inserción y la formación del poro (Cintas et al., 2001 citado en Rojas y Vargas, 2008). Además, “la unión inicial de las bacteriocinas a las membranas citoplasmáticas está gobernada por interacciones electrostáticas entre sus residuos cargados positivamente y los grupos negativos de los fosfolípidos de las membranas bacterianas (ácidos teicoicos, lipoteicoicos y teicurónicos)” (Gómez-Sala, 2013, p. 106). La figura 1 muestra cómo los diferentes tipos de bacteriocinas interactúan con las células, primeramente, la formación de poros en la membrana, mediada o no por una molécula receptora o docking como se muestra en 1a y 1b, respectivamente, segundo se da la inhibición de la síntesis de la pared celular (2) y tercero se da la hidrólisis de la pared celular (3).

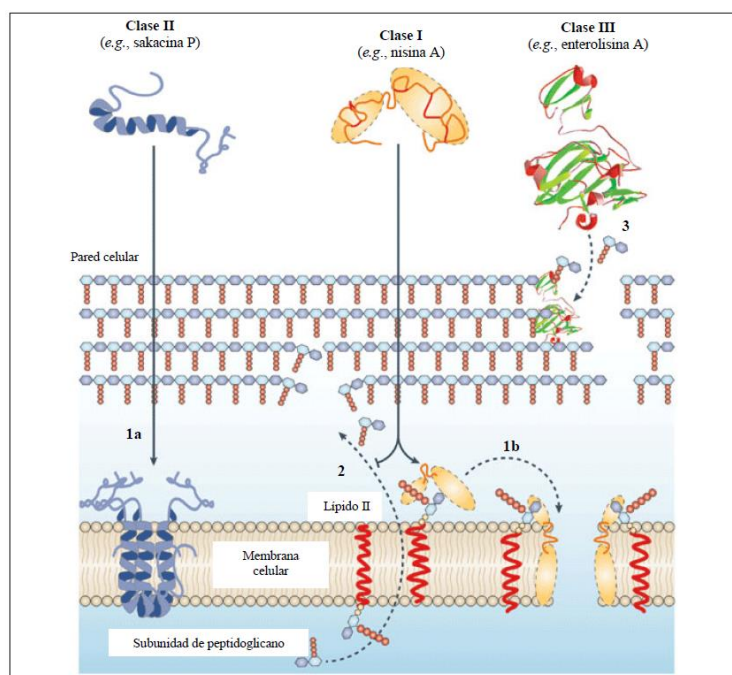


Figura 1. Principales modos de acción propuestos para las bacteriocinas.

Fuente: Cotter et al. (2005) citado en Gómez-Sala, (2013).

2.3. Utilización de *Lactobacillus curvatus* para la bioconservación de alimentos

En el grupo de bacterias ácido lácticas destaca el género *Lactobacillus sp.* que comprende cerca de 80 especies reconocidas y se caracterizan por su metabolismo homofermentativo y/o heterofermentativo facultativo u obligado, además son bacilos Gram positivos, no esporulados, sin motilidad, anaerobio facultativo, acidúricos o acidófilos (pH entre 1.0 y 5.0). Es común la producción de bacteriocinas, no reducen el nitrato, catalasa y oxidasa negativa y de requerimiento nutricionales complejos. Se desarrollan en temperaturas que van de 2 a 53°C siendo la óptima entre 30-40°C (Cristóbal-Delgado, 2008; Peñaflor y García-Guerrero 2007).

Uno de los principales nichos ecológicos en los que se pueden encontrar las cepas del género *Lactobacillus sp.* son la leche y los productos lácteos fermentados como el yogur, el queso o las leches fermentadas, pues estas bacterias se pudieron adaptar a estos sustratos que contienen caseínas como fuente de proteínas, lactosa como principal fuente de carbono, vitaminas y minerales (Gómez-Sala, 2013).

En el caso de los quesos, estas bacterias forman parte del microbiota normal, contribuyendo a la maduración del queso por su actividad proteolítica y su implicación en la producción de aromas. Por otro lado, estas bacterias se utilizan como cultivos iniciadores, cuya principal función es producir ácido láctico a partir de lactosa como resultado se da la acidificación del medio y la coagulación de las proteínas de la leche (Gómez-Sala, 2013).

Actualmente, la bioconservación en la industria alimentaria se basa en las bacteriocinas producidas especialmente por el género *Lactobacillus sp.*, las cuales se han aislado a partir de una gran variedad de alimentos lácteos, cárnicos, vegetales y cereales frescos y/o fermentados, el vino y licores. También, se han aislado de otras fuentes como preparaciones probióticas, contenido

gastrointestinal de humanos, vagina y heces infantiles humanas (Gómez-Sala, 2013).

La especie *Lactobacillus curvatus* se caracteriza por tener un metabolismo heterofermentativo facultativo, ya que fermentan la glucosa a través de la ruta de las pentosas fosfato, obteniendo, además de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y ácido acético (Gómez-Sala, 2013). Esta especie es productora de varios tipos de bacteriocinas de clase II como la sakacina P y sakacina Q (cepa LTH1174, fuente carne fermentada), curvaticina L442 (cepa L442, fuente embutido curado), curvalicina 28a, 28b y 28c (cepa CWBI-B28, fuente carne), lactocina 705 (Lac705 α y Lac705 β) (cepa CRL705, fuente embutido curado), curvaticina 13 (cepa SB13, fuente salchichas) y la curvaticina FS47 (cepa FS47, fuente carne) (Gómez-Sala, 2013).

Es una de las bacterias bioprotectoras que se han utilizado en diferentes aplicaciones cárnicas, principalmente en embutidos fermentados por sus buenos resultados. Por ejemplo, en un estudio realizado por Vignolo et al. (1996), citado en Vásquez et al. (2009), se encontró que la *Lactobacillus curvatus* CRL705 puede ser empleado como cultivo bioprotector en la carne, porque después de ensayar diferentes cantidades de inóculo inicial de *Listeria monocytogenes* y del cultivo biopreservante, observaron que a la carne inoculada sólo con *L. monocytogenes* mostró un rápido crecimiento pasando de 3×10^3 a 8×10^7 UFC/mL en 24 horas a 20°C y en la carne inoculada con la cepa bacteriocinogénica, el número viable del patógeno se mantuvo más o menos constante en 10^3 UFC/mL a lo largo de la incubación.

La cepa *Lactobacillus curvatus* SafePro® B-LC-48 de la empresa Chr. Hansen fue diseñada para utilizarse como cultivo bioprotector para la superficie de productos cárnicos cocidos como salchichas tipo Viena, mortadelas feteadas, jamones cocidos, pero también se recomienda su uso para otros tipos de alimentos que han sido empacados al vacío o bajo una atmósfera modificada y almacenados en refrigeración.

Se caracteriza por ser una bacteria psicrotrópica (tolerante a bajas temperaturas), productora de una bacteriocina llamada curvatina que es capaz de suprimir el crecimiento de bacterias dañinas y patógenas, como las bacterias BAL y *Listeria monocytogenes*. Crece en un rango de temperaturas que va de 4 a 40°C siendo el óptimo 37 °C y puede sobrevivir a la congelación, es microaerófilo (requieren niveles de oxígeno inferiores a los que hay en la atmósfera terrestre). Este cultivo no fermenta la lactosa ni la sacarosa, por lo que en presencia de estos azúcares la producción de ácido será limitada (Chr. Hansen, 2014 y Chr. Hansen A/S, 2014).

Estudios preliminares han demostrado que esta cepa bioprotectora también puede prevenir la proliferación de patógenos de alto riesgo en quesos de alta humedad como el queso fresco tipo Panela, así como en quesos madurados tipo Cheddar (Chr. Hansen, 2014), lo cual abre la posibilidad para nuevas aplicaciones en productos lácteos.

2.4. Queso fresco

El queso blanco-fresco es un producto sin madurar que se obtiene por la separación del suero después de la coagulación enzimática de la leche cruda o reconstituida, pasteurizada, entera, parcialmente descremada, o una mezcla de estos productos, la cual forma un gel más o menos deshidratado que retiene la grasa láctea en una matriz continua de proteínas de la leche (Gutiérrez- Espinoza, 2012; Fallas-Rodríguez, 2015).

En Costa Rica, por ejemplo, un tipo de queso fresco es el tipo Turrialba, el cual se caracteriza por ser natural, fresco, semi-duro, bajo en grasa, de color blanco a amarillo cremoso, de aroma suave, elaborado con leche de vaca cruda o pasteurizada, a través de métodos de fabricación tradicionales o industrializados. Entre las características químicas se determina un alto contenido de humedad (menores al 55 %), porcentaje de grasa mínima del 18,5 %, de proteínas mínimo de 14,5 %, la sal entre 1,5 y 2 % y su pH esta entre 6,2 y 6,4 (acidez de 0,1 y 0,3 %) (Anónimo, 2008; Fallas-Rodríguez, 2015).

Algunas de las características sensoriales definidas por la denominación de origen para este tipo de queso se encuentran una textura que no tiene una corteza diferenciada, la pasta es de textura blanda ligeramente cremosa y compacta, de buena apariencia, con pocos ojos y poros, irregulares y desigualmente repartidos. Al corte, da poco brillo, sin ser totalmente opaco, parte bien y no se desborona. En el caso del color, debe ser de crema a amarillo cremoso, dependiendo de la raza lechera dominante empleada en su fabricación. En cuanto al olor, tiene que ser de aroma suave, poco ácido, con recuerdo a la leche de procedencia y el sabor debe ser agradable y liviano, lácteo y algo maduro o cremoso, de salado suave (Anónimo, 2008).

2.5. Control de vida anaquel en quesos frescos

En Costa Rica, la calidad de los quesos se encuentra regulada por medio del Decreto No. 18462 MEIC Norma oficial para queso, en el cual se establece las condiciones de la leche empleada para su elaboración, el contenido de aditivos como los colorantes y cloruro de calcio, se describen las características sensoriales, físicoquímicas y microbiológicas (Chavarría et al., 2006). Además, el RTCA sobre “Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos” establece los parámetros microbiológicos de la inocuidad del queso y sus límites de aceptación para la vigilancia durante su proceso y en los puntos de comercialización, herramienta que puede ser utilizada para controlar la vida útil e inocuidad de estos productos.

Según lo establecido por López-Orozco (2004), el control de la vida útil de los quesos depende de múltiples factores que sumados resultan en un tiempo de vida anaquel largo o corto. El primero es la calidad microbiológica de la leche cruda que va a depender de la manipulación previa a su procesamiento y a las condiciones de almacenamiento. Los principales grupos de microorganismos que la constituyen son las bacterias psicrótrofas, coliformes, lácticas, posibles patógenos (como *Bacillus cereus*, *Mycobacterium sp.*, *Brucella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Clostridium perfringens*, *Coxiella burnetii*, *Escherichia coli*, *Listeria*

monocytogenes, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus aureus* y *Yersinia sp.*) y hongos.

La leche ordeñada está a una temperatura de unos 37 °C y resulta un excelente caldo de cultivo para la reproducción de los microorganismos tanto patógenos como de deterioro, por lo cual se debe enfriar de 4 a 6 °C lo más rápido posible, lo cual retardará el desarrollo de esos microorganismos y se tendrá un producto de buena calidad microbiológica (Madrid, 1996, citado en López-Orozco, 2004). La eficacia del enfriamiento va a depender de varios factores como la temperatura de conservación, período de almacenamiento, contaminación inicial y la velocidad de enfriamiento.

En segundo lugar, están los tratamientos de pasteurización, el cual va a variar en tiempo y temperatura según lo que se requiera para el proceso posterior de esa leche. Las condiciones de ese tratamiento tienen que destruir el bacilo tuberculoso, todos los microorganismos patógenos, así como una proporción adecuada de gérmenes generadores de la descomposición (más del 99 %) para que la leche pasteurizada cumpla con los parámetros microbiológicos establecidos. Ese proceso debe ser a 63 °C durante 30 minutos o 72 °C durante 15 o 20 segundos. La temperatura y la duración del calentamiento y su efectividad va a depender de la calidad microbiológica inicial de la leche, ya que una leche con una carga alta de microorganismos no va a ser suficiente para la destrucción de estos, por lo cual, a partir del ordeño es cuando empieza a contar la inocuidad alimentaria.

Por otro lado, el uso de aditivos antimicrobianos ayuda a controlar la microbiota en los quesos como algunos antifúngicos como el sorbato de calcio y potasio, antibióticos como la natamicina que se utiliza para evitar los mohos sobre la corteza en quesos maduros o frescos de pastas blandas, propionato de sodio o calcio que previene el desarrollo de hongos y bacterias al interferir en el metabolismo por la inhibición de enzimas (Villalta-Moreno, 2010) y la nisina que se utiliza para prevenir la germinación de esporas por parte de bacterias Gram-positivas.

Otros factores importantes son la limpieza y saneamiento del equipo, así como las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) que se aplican para fabricar los quesos. Son herramientas que evitan el riesgo de intoxicaciones a los consumidores y pérdidas económicas, al proteger el producto contra contaminaciones microbianas, lo cual contribuye a formar una imagen de calidad a los consumidores y se previenen sanciones legales por parte de las autoridades sanitarias. Además, el almacenamiento refrigerado e ininterrumpido del queso es indispensable para mantener la inocuidad de este producto, ya que es un método de conservación muy utilizado para disminuir el crecimiento y reproducción de los microorganismos presentes, así como retrasar las reacciones químicas y enzimáticas. La temperatura adecuada para lograr un máximo en la vida de anaquel en quesos esta entre 4 a 6 °C.

2.6. Microbiología del queso fresco y su contaminación

La calidad microbiológica de un queso fresco deriva de una serie de factores que determinan la presencia y cantidad de un tipo de microorganismo. Algunos de ellos son la contaminación microbiana normal de la leche, las condiciones del procesamiento de la leche y el queso, la adición de cultivos lácticos, las condiciones extrínsecas del proceso y conservación como tiempos, temperaturas, etc. (Palacios-Vargas, 2009).

Por otro lado, el control del crecimiento de los microorganismos en el queso depende de varios factores físicos y biológicos como la cantidad de sal, la concentración de humedad, la presencia de ácidos orgánicos, el aw, la temperatura de conservación, el pH, la adición de nitratos y el potencial redox, así como la disponibilidad de nutrientes necesario para el metabolismo microbiano y la interacción entre los microorganismos presentes en el queso (Beresford et al., 2001, citado en Palacios-Vargas, 2009). También, la disponibilidad del oxígeno que tienen los microorganismos en el queso hace que su ubicación varíe, por lo cual en el interior del queso sólo van a estar anaerobios o anaerobios facultativos y los aerobios se van a ubicar en la superficie del queso como por ejemplo *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.* y mohos.

Entre los principales grupos microbianos que tienen los quesos están las bacterias lácticas que tienen la función principal de producir ácido láctico en el proceso de elaboración del queso, bacterias esporuladas que están asociadas a la formación de gas por la fermentación de lactato a acetato, butirato, hidrógeno y dióxido de carbono; los mohos y levaduras, psicrótrofos que son bacilos Gram negativos como *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Aeromonas sp.*, etc. y son los responsables de la alteración de quesos frescos como el cottage y otros quesos frescos en superficie; coliformes que se utilizan como indicadores de contaminación pos-pasteurización (ya que no sobreviven a dicho proceso), y puede producir hinchazón del queso así como generar aromas atípicos, entre otros (Palacios-Vargas, 2009).

De acuerdo con Gutiérrez-Espinoza (2012), el deterioro microbiológico del queso es una de las razones por las cuales el queso puede ser un alimento potencial para infectar o intoxicar a cualquier persona, pues en él pueden crecer bacterias y hongos perjudiciales para la salud. El deterioro bacteriano está constituido principalmente por bacterias psicótrofas Gram negativas de los géneros *Alcaligenes sp.*, *Achromobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.* y coliformes, las cuales son responsables de daños físicos, cambios de color, textura y oxidación de los quesos. Especies como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fragi* se les atribuye que causan putrefacción, amargura, licuefacción, olor a rancio, formación de moco en la superficie del queso y gelatinización de la cuajada. Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae como lo es *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, así como en algunas ocasiones las del género *Bacillus sp.* pueden causar daños físicos como hoyos pequeños y/o hendiduras por la producción de gas a nivel interno del queso.

El género *Pseudomona sp.* se caracterizan por ser bacilos rectos o ligeramente curvados, se desplazan por uno o dos flagelos polares y generalmente realizan una respiración aerobia pero algunas veces utilizan nitrato como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia. Es un grupo de bacterias que

pueden crecer en un rango amplio de temperaturas, pero lo que las hace particulares es que pueden crecer a temperaturas de refrigeración (4 °C) degradando lípidos y proteínas de los alimentos donde se encuentren como por ejemplo los quesos y leche (Willey, Sherwood y Woolverton, 2009).

Un factor que ayuda a potenciar la presencia de *Pseudomonas sp.* en el queso es durante la conservación en refrigeración de la leche, ya que por su alto contenido en nutrientes y su elevado pH las *Pseudomonas sp.* crecen como flora predominante y ocasionan en pocos días defectos en la leche, como la aparición de malos olores y pérdida de rendimiento en el queso. Eso se debe principalmente por fenómenos proteolíticos y lipolíticos asociados a su crecimiento (Frank, 1997 citado en Palacios-Vargas, 2009). Las enzimas proteolíticas y lipolíticas producidas por estos microorganismos resisten la pasteurización, aunque las pseudomonas no, en consecuencia, la elevada presencia de estas bacterias en la leche podría ocasionar defectos la textura y en el aroma del queso, además de una pérdida de rendimiento de la leche para hacer queso (Ellis y Marth, 1984, Shah, 1994, citado en Palacios-Vargas, 2009).

Por otro lado, en Costa Rica, así como en otros países, se ha detectado en el queso fresco la presencia de bacterias patógenas en niveles inaceptables y que pueden representar un riesgo para la salud de los consumidores. Por sus características nutricionales, este tipo de alimento es muy susceptible a contaminarse y resguardar este tipo de bacterias, ya sea por condiciones deplorables de higiene o por una mala manipulación durante su comercialización.

III. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Materiales y métodos

El desarrollo del proyecto se llevó a cabo en diferentes lugares y diversas etapas. En cuanto a la fabricación de los quesos frescos, se realizaron en una planta de lácteos artesanal, en la provincia de Alajuela. La producción se efectuó en dos tinas diferentes con el mismo lote de leche pasteurizada y bajo las mismas condiciones. Uno de los quesos se utilizó como muestra patrón y el otro se inoculó con la bacteria láctica *Lactobacillus curvatus* B-LC-48 en una dosis de 25 g por cada 1300 L de leche (0,125 g de bacteria por Kg de queso fresco) 15 minutos antes de la coagulación durante la fabricación del producto de acuerdo con lo recomendado por el fabricante.

Para homogenizar el cultivo, se diluyó el sobre de 25 g en 1,3 L de leche pasteurizada, de los cuales se tomó 1 mL (aproximadamente $6,15 \times 10^8$ UFC/mL de la bacteria) por cada litro de leche que se utilizó para la fabricación, por ejemplo, para los 60 L de leche que se utilizaron en el primer y segundo lote fueron 60 mL de la mezcla y para el tercero que se utilizaron 150 L se agregaron 150 mL.

En total, se realizaron tres lotes de producción diferentes, el primero y el segundo tuvieron una diferencia de una semana en el mes de octubre del 2018 y el tercero con respecto al segundo se realizó cinco semanas después en noviembre del 2018. Para la producción de cada lote, se utilizaron dos tinas iguales de doble chaqueta y moldes de 5 Kg para cada uno de los quesos. Ambos quesos se empacaron en bolsas al vacío en presentaciones de 250 g aproximadamente. Los detalles de la descripción del proceso y flujogramas tanto del queso sin cultivo como el queso con cultivo se detallan en el apéndice 1 y 2.

Los quesos, una vez listos, se almacenaron en el Laboratorio de Calidad Agroalimentaria de la Universidad Nacional (UNA) para su posterior análisis, en una cámara de frío marca Alaska modelo CR-20P-E1P que tiene un rango de enfriamiento entre 4 a 10 °C. El monitoreo de dicha temperatura se realizó con la

ayuda de un datalogger marca Extech modelo TH10, ya que a una temperatura ≤ 5 °C es la ideal para la refrigeración del producto, de acuerdo con lo establecido en el reglamento técnico quesos no madurados, incluidos los quesos frescos del MEIC-MAG (2008).

Los quesos que se utilizaron para el análisis sensorial se realizaron en el Laboratorio de análisis de la empresa ASEAL, en una tina de acero inoxidable de 20 L de capacidad y con moldes de plástico de 1 kg de capacidad. Los detalles de la descripción del proceso y flujogramas tanto del queso sin cultivo como el queso con cultivo se detallan en el apéndice 3 y 4. Las diferencias en el proceso, con respecto a los quesos producidos en la planta de lácteos, fueron los parámetros de la pasteurización de la leche (65 °C por 30 minutos) y no hubo estandarización de la leche, por lo cual se utilizó leche entera para la fabricación.

3.2. Diseño experimental

El diseño experimental se basó en determinar el efecto biopreservante de la bacteria *Lactobacillus curvatus* B-LC-48 de la empresa Chr-Hansen por medio de análisis fisicoquímicos y sensoriales para determinar su resultado general sobre la vida útil del queso fresco. Es por ello que se realizó un análisis comparativo del queso patrón y el queso con el cultivo, para comprobar dicho efecto a través de los 15 días como promedio de tiempo de la vida útil de este tipo de alimento, por lo cual se basó en un método de observación, descripción y comparación.

Los análisis fisicoquímicos de ambos tipos de quesos en los tres lotes de producción diferentes se realizaron en el laboratorio de Biotecnología de Docencia (LABID) y el Laboratorio de Calidad Agroalimentaria (CIAGRO) de la Universidad Nacional (UNA), donde se muestrearon los días antes, durante y después de la vida útil declarada para el queso fresco en dicha planta. Como apoyo complementario a los resultados, se realizaron análisis microbiológicos en un laboratorio externo acreditado por el ECA (Ente Costarricense de Acreditación) de las bacterias establecidas para su monitoreo en el RTCA 67.04.50:08 Criterios

microbiológicos para la inocuidad de alimentos y de algunos grupos bacterianos de importancia para la vida útil del queso.

En el caso de los análisis sensoriales, se realizaron en dos sitios, el primero fue con estudiantes de la carrera de Tecnología de Alimentos de la Universidad Técnica Nacional (UTN), sede Atenas, en el aula de tecnología de alimentos, que está acondicionada para realizar análisis sensoriales, y en un laboratorio de docencia de la escuela de Ciencias Biológicas de la UNA.

3.3. Análisis fisicoquímicos de los quesos frescos

De acuerdo con el RTCR 422: 2008 Reglamento técnico quesos no madurados, incluidos los quesos frescos, los métodos para los análisis fisicoquímicos deben ser los que establece la Norma CODEX – STAN 234-1999 (Humedad ISO 5534 / IDF 4:2004). Ambos quesos se les va a realizar por triplicado análisis fisicoquímico en los días 1, 7, 15 y 21 desde el día de su fabricación para analizarlos a través de su vida útil.

Los equipos utilizados en los laboratorios de la UNA están calibrados por el departamento PROCAME (Programa de Estudios en Calidad, Ambiente y Metrología) de la UNA.

3.3.1. Análisis de humedad

El análisis de humedad se va a realizar por métodos gravimétricos por medio del secado en horno o estufa, el cual se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. El método de secado en horno es el más común (AOAC 948.12, 2005; ISO 5534: 2004 Queso y queso procesado - Determinación del contenido total de sólidos) implica el secado de la muestra en el horno convencional a 102 °C por un tiempo determinado, y la diferencia de la pérdida de peso de la muestra fresca con respecto a la muestra seca sirve para calcular el contenido de humedad (Subramanian y Rodríguez-Saona, 2010).

La Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) establece que la cápsula de humedad debe medir aproximadamente 5,5 cm de diámetro con una tapa de inserción. Además, para la preparación y manejo de las cápsulas, se deben secar de 3 a 15 h, ya sea en un horno de aspiración o de tiro forzado a 100 °C y colocarlos posteriormente en un desecador que contenga algún deshidratante. Entre los cuidados del método está utilizar pinzas para manejar cualquier cápsula, ya que las huellas dactilares tienen peso (Nielsen, 2010).

De acuerdo con Nielsen (2010), el método de secado por horno puede variar si es de convección, de aspiración forzada o al vacío. En el caso de los hornos de aspiración forzada, la muestra de queso se debe hornear a 100 ± 2 °C por un tiempo de 16.5 ± 0.5 horas y tiene la ventaja de que tienen el menor diferencial de temperatura en el interior del horno en comparación con un horno de convección, por lo general no mayor a 1 °C. Esto se debe a que el aire circula por un ventilador que fuerza un movimiento de aire en toda la cavidad del horno, lo cual ayuda a una distribución homogénea de aire a través de la estantería sin importar cuantas muestras tenga el horno, el secado va a ser el mismo para cada una.

En cuanto a lo antes mencionado, se utilizó como base la normativa de COVENIN 1077-97 que refieren normas de la AOAC, lo descrito por Nielsen (2010) y la metodología descrita por Revilla (2009). En el ensayo, se utilizaron crisoles de porcelana con su tapa de 4,5 cm de diámetro y de fondo plano, los cuales se secaron en una estufa de convección forzada modelo DK-500 marca Digisystem Lab. Instruments Inc. Taiwán R.O.C. a $99^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante un periodo no menor a 3 horas o por toda la noche. Luego, se colocaron en un desecador por 30 minutos aproximadamente para enfriarlos y pesarlos en una balanza analítica modelo AS220.R2 marca RADWAG con apreciación de 0,1 mg para determinar la tara inicial (ver figura 14 en anexos).

Para la preparación de las muestras, se rallaron 50 g aproximadamente de cada uno de los quesos con ayuda de un rallador casero, con el fin de obtener una pasta homogénea (como se observa en la figura 15 en anexos).

En cada uno de los crisoles previamente tarados, se colocaron 3 g de cada una de las muestras homogenizadas y se anotaron los pesos exactos junto con la cápsula y su tapa. Seguidamente, los crisoles tapados se colocaron en la estufa a $100^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 17 horas. Una vez pasado ese tiempo se volvieron a colocar en el desecador por 30 minutos o hasta que los crisoles con los quesos secos llegaran a temperatura ambiente antes de pesarlos. Una vez pesados, se obtuvo la diferencia de pesos y se calculó cuanto fue la humedad que perdieron las muestras. Para ello, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

$$\% \text{ Total de sólidos} = \frac{P_f}{P_i} \times 100$$

Siendo: P_i = masa inicial de la muestra en gramos y P_f = masa final de la muestra seca en gramos.

Este análisis se realizó por triplicado cada siete días durante el periodo de vida útil del producto.

3.3.2. Análisis de pH

De acuerdo con Subramanian y Rodríguez-Saona (2010), no hay métodos estándar disponibles para medir el pH del queso y son pocos los métodos en la literatura. Uno de los métodos involucra preparar una papilla de 10 g de queso rallado en agua y medir el pH potenciométricamente, no obstante, este método puede alterar el equilibrio entre el fosfato de calcio coloidal y soluble y, por lo tanto, es preferible medir el pH del queso directamente, ya que puede variar la lectura y subir el pH en 0,3 unidades.

Para la determinación de este parámetro químico y siguiendo las recomendaciones de lo encontrado en la literatura, se realizó la medición siguiendo la metodología descrita por Revilla (2009). Para ello, se utilizó la pasta homogénea (partículas finas) de cada uno de los quesos que previamente se prepararon para el análisis de humedad. Seguidamente, se encendió 5 minutos antes del análisis el pHmetro de marca JENWAY modelo 3510 y se calibró con los buffers 4 y 7. Para

la lectura se introdujo el electrodo dentro del queso junto con el sensor de temperatura, como se ve en la figura 16 de los anexos, de forma tal que tuviera contacto con las pequeñas partículas del producto y una vez estable la lectura se anotó. Se repitió dicho proceso seis veces enjuagando y secando el electrodo y el sensor entre cada lectura y colocándolo en áreas diferentes dentro de la muestra en el recipiente. El resultado final fue producto del promedio de todas las mediciones para cada uno de los quesos.

3.3.3. Análisis de textura

La textura del queso es un grupo de características físicas que están definidas por sus elementos estructurales (filamentos de caseína y glóbulos grasos) que, al ser sometidas a un esfuerzo, su desintegración, flujo y deformación se miden en un tiempo, distancia y masa determinada. Dichos parámetros se pueden medir tanto a nivel sensorial como instrumental, ambos son un complemento para valorar la calidad de un alimento y sus preferencias hacia los consumidores, aunque el instrumental provee resultados más objetivos y reproducibles (Castro, Novoa, Algecira y Buitrago, 2014).

El análisis de perfil de textura (TPA) se trata de una prueba basada en imitar el proceso de masticación, en el cual ocurre una doble compresión sobre las muestras de queso, ya sean cilíndricas o cúbicas, por medio de platos de mayor diámetro que las muestras. La compresión se da hasta el punto de fractura del queso y el resultado obtenido relaciona la fuerza dada en función del tiempo, mediante una curva que permite definir una gran variedad de parámetros texturales (ver figura 2) como la dureza, adhesividad, elasticidad, gomosidad, etc. (Castro et al. 2014).

cohesividad y gomosidad (Buriti et al. 2005 y Guzmán et al. 2015), los cuales se van a obtener mediante el uso del software Exponent Connect. La masticabilidad, de acuerdo con los contenidos de la guía de aplicación del software del equipo, es incorrecto cuantificarla e informarla junto con la gomosidad en TPA, ya que la masticabilidad es para sólidos y la gomosidad para semisólidos.

3.4. Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos se realizaron en laboratorios privados cuyos análisis están acreditados ante el ECA bajo la norma INTE-ISO/IEC 17025:2005. A todos los lotes de producción de planta y laboratorio, se le realizaron los análisis establecidos en el RTCA 67.04.50:08 sobre criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos mencionado en el reglamento técnico quesos no madurados, incluidos los quesos frescos. Además, como información complementaria, se les quiso dar seguimiento a grupos de bacterias como las bacterias lácticas, enterobacterias (si presentaban) y *Pseudomonas* sp.

3.5. Análisis sensorial de los quesos frescos

La evaluación sensorial, de acuerdo con el Instituto de Alimentos de EEUU (IFT), es “la disciplina científica utilizada para evocar, medir analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído” (Hernández-Alarcón, 2005).

Es una herramienta que se utiliza para medir la calidad de los alimentos mediante el rechazo o aceptación de parte de evaluadores según sean percibidos por medio de los sentidos, y ayudan a mejorar la satisfacción de los deseos de los consumidores. Estas pruebas sensoriales se dividen en tres grandes grupos: descriptivos, discriminatorios o de diferencia y de preferencia o afectivas. La escogencia de alguna de estas va a depender de los objetivos que requiere el estudio.

Para poder evaluar sensorialmente la aceptación o rechazo para el uso de *Lactobacillus curvatus* B-LC-48 como cultivo biopreservante, se realizó un panel piloto de consumidores o panel interno, el cual evaluó tanto el QSC como el QCC. La idea es que los panelistas de tipo consumidores pudieran detectar de forma general si esta bacteria ayuda a mantener por más tiempo las características organolépticas de frescura en el queso fresco. Para ello se utilizaron pruebas discriminativas de tipo triangular y pruebas afectivas por medio de una escala hedónica verbal.

En general, las pruebas discriminativas se utilizan para determinar si los consumidores pueden percibir diferencias no muy notorias al comparar dos o más muestras de alimentos y se utilizan cuando se sustituyen ingredientes o hay un cambio en el procesamiento. La prueba triangular consiste en presentar al mismo tiempo a los panelistas no entrenados tres muestras codificadas en diferente orden para cada uno, las cuales son dos iguales y una diferente, por lo cual los evaluadores deben identificar la muestra diferente asociando las muestras iguales de acuerdo con las características sensoriales detectadas. Dicha elección se debe realizar aun si ellos no encuentran ninguna diferencia entre las muestras. Estas pruebas se utilizan cuando la identificación de la o las diferencias es muy pequeña entre dos productos alimenticios y también para panelistas que no están bien entrenados (Hernández-Alarcón, 2005).

Las pruebas afectivas o de preferencia se definen por ser “pruebas en donde el panelista expresa el nivel de agrado, aceptación y preferencia de un producto alimenticio, puede ser frente a otro. Se utilizan escalas de calificación de las muestras” (Hernández-Alarcón, 2005). En este caso, la escala hedónica verbal consiste en solicitarle a los panelistas que informen sobre el grado de satisfacción que tienen del queso que se les presento, por medio de una escala hedónica o de satisfacción donde determinan si les gustó muchísimo, un punto medio de si ni les gustó ni les disgustó o hasta si les disgustó muchísimo (ver anexo 5).

En dicha evaluación, el grupo de panelistas utilizó la escala hedónica para calificar el olor, color, textura y sabor que detectaron en los días 8, 15 y 22 después de la fabricación de los QCC.

3.5.1. Selección de los jueces

La selección de los panelistas no entrenados se realizó por medio de un cuestionario donde se les consulta su edad, sexo, frecuencia de consumo de quesos, estado de salud y hábitos que influyan en un análisis sensorial como lo es el fumado, la ingesta de medicamentos o drogas que puedan alterar su paladar. Además, si desean participar en un panel sensorial, si se caracterizan por ser personas ordenadas, analíticas y que les guste seguir instrucciones y cumplirlas (ver anexo 2).

3.5.2. Orientación de los jueces

De acuerdo con Fallas-Rodríguez (2015), antes de iniciar con las evaluaciones se les explicó a los panelistas aspectos generales sobre la forma correcta de realizar una evaluación sensorial y qué lineamientos debían seguir antes, durante y después de realizar las pruebas.

En el caso de antes, se les va a indicar lo siguiente:

- a) No consumir alimentos, mascar chicle y lavarse los dientes por lo menos media hora antes de la prueba.
- b) No fumar por lo menos 1 hora antes.
- c) Ser puntuales.
- d) No usar cosméticos y perfumes o colonias muy fuertes.
- e) Estar en buen estado de salud.

Durante:

- a) No hablar durante las evaluaciones.
- b) No usar celular, computadora u otro dispositivo mientras desarrolla las pruebas.
- c) Realizar las pruebas con calma (tomarse su tiempo).
- d) Leer atentamente las instrucciones.
- e) Probar las muestras en el orden de izquierda a derecha siempre.
- f) En caso de duda utilizar de guía la hoja de características sensoriales para la evaluación de queso fresco (anexo 3).
- g) Evaluar cada atributo de forma separada.
- h) Verificar que los códigos en las muestras las coloquen en las boletas correspondientes.

Después:

- a) No realizar comentarios una vez finalizada la sesión del panel para evitar influir sobre la opinión de otros panelistas.
- b) Si quisiera comentar los resultados solamente lo hagas con la encargada del panel.

3.5.3. Preparación de las muestras y materiales

Para la preparación de las muestras, se partieron cubos de queso de aproximadamente 2 cm³, los cuales se colocaron en recipientes plásticos desechables con tapa, de color blanco y cada muestra se codificó con números de tres dígitos elegidos aleatoriamente de la tabla de números aleatorios en el libro de Watts et al. (1992) para cada tipo de queso (QSC queso control y QCC queso con *Lactobacillus curvatus*). Los utensilios utilizados no impartieron olores o

sabores extraños a las muestras y cada panelista contó con sus propios materiales, entre ellos fueron servilletas y platos desechables, lápiz, una copia del cuestionario para la participación del panel sensorial, copias de las diferentes evaluaciones para las pruebas y la hoja guía de características sensoriales para la evaluación de queso fresco, como se muestra en la figura 18 del anexo 1.

Las muestras de los quesos se mantuvieron en temperatura de refrigeración (5 ± 2 °C) y se sacaron del refrigerador 15 a 20 minutos antes de la evaluación para que alcanzaran una temperatura cercana a 10 °C. Dicho procedimiento se basó en lo realizado por Fallas-Rodríguez (2015).

3.5.4. Evaluación de las muestras

Para la realización del panel sensorial, se utilizó el aula de tecnología de alimentos de la UTN, la cual cuenta con un área para la preparación de las muestras conocida como planta seca y cinco cubículos individuales que cuentan con luz blanca para la evaluación de las muestras. A cada panelista se le entregó una bandeja con todos los implementos incluyendo las muestras para realizar el análisis y, antes de comenzar, se les dio las instrucciones necesarias para el desarrollo adecuado de la degustación (ver figura 19 del anexo 1). En este lugar, solo se realizó una prueba piloto con los quesos fabricados en la planta de lácteos y el día 8 de almacenamiento del único lote que se fabricó a nivel de laboratorio.

En el caso de la evaluación en la UNA, se utilizó un laboratorio de docencia para montar el panel y se les acomodó los materiales de forma personalizada en una de las mesas (ver figura 20 del anexo 1). En este lugar, se realizaron los días 15 y 22 de vida útil del lote fabricado en el laboratorio.

De acuerdo con los resultados obtenidos y observados, las pruebas de escala hedónica se aplicaron solo al QCC los días 8, 15 y 22 pero la prueba triangular solo se realizó el día 22, ya que al principio de la vida útil el QSC y el QCC no presentaban diferencias a nivel del olor, apariencia y textura, ya que el sabor no fue parte de las características sensoriales evaluadas para esta prueba.

El orden de la evaluación de las muestras, en general, se realizó de la siguiente manera: características olfativas, visuales, táctiles en mano, gustativas y táctiles en la boca.

En el caso del orden de las muestras para la prueba triangular, y de acuerdo con Watts et al. (1992), la forma en que se ordenan las muestras para la evaluación puede influir sobre los juicios de los panelistas y generalmente la primera muestra evaluada resulta ser preferida o con un mayor puntaje que la segunda. Es por ello que las muestras se presentaron en diferentes posiciones o tres arreglos diferentes (ABA, AAB y BBA) a cada panelista para reducir los errores por posición al mínimo. No se utilizaron las posiciones BBA, BAB y ABB por la cantidad de queso disponible para realizarlo, siendo A el QSC y B el QCC. Además, a cada panelista se le entregó una boleta donde seleccionaban la muestra diferente y se les consultó si para ellos fue fácil o difícil detectar la o las diferencias (anexo 4).

Las pruebas de escala hedónica verbal van a medir el grado de satisfacción de los panelistas ante el QCC con cinco números de categorías que van desde “me gusta mucho” hasta “me disgusta mucho”. Este análisis se realizó por atributo y ayudó a medir el tiempo de vida útil de este tipo de queso. A los panelistas también se les solicitó que, de acuerdo con el análisis sensorial que realizaron, seleccionaran las características sensoriales que mejor se ajustaran a las sensaciones percibidas, por ejemplo, si el olor era lácteo o ácido, si en la apariencia del queso tenía huecos, el tipo de color o si la textura era dura o elástica, húmeda, etc. Para ello, se les dio una guía de las características olfativas, visuales, táctiles y gustativas que se les pudo haber presentado al momento de la evaluación (anexo 3 y 5).

3.6. Análisis de datos

El análisis estadístico de diseños experimentales conlleva la recopilación de los datos producto de la investigación de campo, así como la organización, análisis, interpretación y validación de estos, para obtener conclusiones que influyan en una toma de decisiones.

La evaluación de los datos obtenidos a nivel estadístico, tanto de los análisis fisicoquímicos como sensoriales, permitió determinar si hubo una diferencia significativa en la vida útil del queso fresco por la incorporación de la bacteria *L. curvatus* al compararlo con un queso que no tiene el cultivo y que se fabricó bajo las mismas condiciones. Además, se determinó cuál de los factores físicos, químicos y/o sensoriales fueron los de mayor relevancia o no en un cambio a través de diferentes días de vida útil.

Para dicho análisis, se utilizaron las herramientas estadísticas de análisis de varianza, prueba de chi-cuadrado de Pearson y prueba binomial, las cuales se detallan a continuación.

3.6.1. Análisis de varianza (ANOVA)

El ANOVA analiza y prueba si hay una diferencia entre las medias de los tratamientos de un experimento realizado y el método de Tukey ayuda a ajustar el nivel de confianza de cada intervalo individual, es decir, compara el promedio de dos grupos de datos y realiza comparaciones múltiples para determinar cuáles grupos son significativamente diferentes (Berenson, Levine y Krehbie, 2006).

Los datos de los análisis fisicoquímicos se evaluaron mediante un análisis de varianza de tres vías para los siguientes factores: tipo de queso (QCC vs QSC), lote de producción (L1, L2, vs L3) y tiempo (0, 7, 15, 21 días después de la producción), con una comparación *a posteriori* entre las medias con la prueba HSD de Tukey, $p > 0.05$. Los tipos de queso y factores experimentales constituyen réplicas al azar triplicadas con medidas repetidas en cuatro puntos de tiempo. Para el análisis de estos datos, se utilizó el software R.

Las hipótesis planteadas para el análisis de la prueba anterior se mencionan a continuación:

- a) H_0 : No existen diferencias significativas entre los promedios de las características fisicoquímicas a lo largo de la vida útil en los días 1, 7, 15 y 21 desde la producción del QSC y/o QCC, $p > 0.05$.

- b) H_A : Existe al menos una diferencia significativa entre los promedios de las características físicoquímicas a lo largo de la vida útil en los días 1, 7, 15 y 21 desde la producción del QSC y/o QCC, $p < 0.05$.

3.6.2. Análisis de chi cuadrado (X^2) de contingencia

Es una prueba de hipótesis que compara la distribución observada de los datos con respecto a una distribución esperada de ellos, es decir, se trata de probar la independencia de dos variables entre sí por medio de tablas de contingencia. Los resultados de X^2 cuanto más cercanos a cero estén son más iguales entre sí, por lo que la hipótesis H_0 es correcta (Moore, 2005).

Para la prueba de escala hedónica verbal y su análisis, las categorías se convirtieron en letras del A al E, donde A representa "me gusta mucho" y E representa "me disgusta mucho". Los datos o categorías se evaluaron mediante un análisis de X^2 para determinar si existen diferencias significativas en la clasificación asignada por los panelistas al QCC en los diferentes días después de la producción (8, 15 y 22). El análisis fue basado en 2000 replicaciones basadas en el cálculo de los valores de probabilidad mediante la simulación del método de Montecarlo ($\alpha = 0.05$), el cual se realizó también con el software R.

Las hipótesis planteadas para el análisis de la prueba anterior, se mencionan a continuación:

- a) H_0 : Las categorías de la escala hedónica son independientes o no están asociados con los días de almacenamiento del queso fresco, $p > 0.05$, lo cual significa que los resultados son no significativos.
- b) H_A : Las categorías de la escala hedónica son dependientes o están asociados con los días de almacenamiento del queso fresco, $p < 0.05$, lo cual significa que los resultados son significativos.

3.6.3. Prueba binomial

En el caso de la prueba triangular y para evaluar la significancia de los resultados, se utilizó una prueba binomial de una cola por el hecho de que hay una sola posibilidad de respuesta correcta al saber que existe solo una muestra que es diferente, por lo tanto, la probabilidad de elegir por casualidad la muestra correcta es un tercio. En esta prueba, se suman los panelistas “que han identificado correctamente la muestra diferente y el total se somete a la prueba de significancia utilizando” (Watts et al., 1992, p. 90). Además, una tabla de distribución binomial de una cola con diferentes niveles de probabilidad (Liria-Domínguez, 2007), donde se muestra el mínimo número de panelistas que deben identificar de forma asertiva la muestra diferente de acuerdo con el número total de panelistas participantes en la prueba. En este caso, se va a utilizar a un nivel de significancia de $p=0.05$.

Las hipótesis planteadas para el análisis de la prueba anterior, se mencionan a continuación:

- a) H_0 : La probabilidad de que los panelistas reconozcan la muestra diferente cuando no existe diferencia entre las muestras es de uno en tres, es decir los productos no son diferentes.
- b) H_A : La probabilidad de que los panelistas reconozcan la muestra diferente cuando si existe diferencia entre las muestras es de uno en tres, es decir los productos son diferentes.

IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el siguiente capítulo, se muestran y evalúan los resultados obtenidos sobre las características fisicoquímicos (pH, humedad y textura) y sensoriales (olor, apariencia, textura y sabor) tanto de los QSC como de los QCC en diferentes momentos de la vida útil del queso fresco. Con ello, se concluye si el cultivo láctico de la bacteria *Lactobacillus curvatus* (B-LC-48) tiene un efecto biopreservante en el este producto lácteo.

4.1. Análisis fisicoquímicos

Para los parámetros de pH, humedad y textura se analizan los tres lotes (L1, L2 y L3) de queso fresco, con y sin cultivo, en los días 1, 7, 15 y 21. Por temas de cierre institucional en la UNA, no se pudo analizar la textura de día 21 del lote 3.

De forma general, continuación se muestran a los resultados del análisis estadístico de todos los factores fisicoquímicos (tabla 1), en el cual se observa que el valor p en todos es estadísticamente significativo en al menos uno de los análisis.

Tabla 1. ANDEVA de tres vías para los parámetros fisicoquímicos en dos tipos de queso (sin y con cultivo) proveniente de tres diferentes lotes de producción (L1, L2 y L3) en cuatro fechas de medición (0, 7, 15 y 21 días).

Variable	Tipo	Lote	Tiempo	Tipo:Lote	Tipo:Lote:Tiempo	F	R ²	p. value
<i>pH</i>	**	***	***	***	***	163.23	0.93	***
<i>Humedad</i>	n.s.	***	***	***	*	8.88	0.60	***
<i>Dureza</i>	**	***	***	***	***	50.67	0.81	***
<i>Adhesividad</i>	n.s.	**	n.s.	*	n.s.	2.80	0.19	**
<i>Elasticidad</i>	n.s.	***	***	**	***	99.64	0.89	***
<i>Cohesividad</i>	n.s.	***	***	***	***	39.52	0.77	***
<i>Gomosidad</i>	**	***	***	***	***	81.03	0.87	***

ANDEVA de tres vías para los parámetros fisicoquímicos en muestra de queso (factor: tipo de queso, lote, tiempo y las interacciones tipo:lote y tipo:lote:tiempo)

n.s.: no significativo; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; F: valor de Fisher; R^2 : coeficiente de determinación; P: probabilidad del modelo.

En el caso de la comparación entre los diferentes tipos de queso, el pH tuvo una diferencia significativa de $p < 0.01$, lo cual se explica por las diferencias entre los lotes en cuanto a los valores de acidez que presentó el lote 1. Por otro lado, la dureza también presenta una diferencia significativa principalmente por los quesos del lote 3, que sufrieron una deshidratación en cámara y por ende influye en otros parámetros de textura como la gomosidad.

En general, las comparaciones de los resultados de cada uno de los parámetros por lote y tiempo muestran diferencias significativas, lo cual demuestra las variaciones entre los datos de cada lote y como estos varían a lo largo del tiempo de vida útil. Debido a ello, se evidenció que entre las limitaciones del estudio fue trabajar con lotes de leche y procesos productivos de queso fresco no estandarizados que dan por resultado esas variaciones significativas entre lotes. Dicha situación no se pudo contemplar con antelación y resultó ser un problema imprevisto.

A continuación, se va a detallar y explicar los resultados de cada uno de los parámetros para poder comprender que fue lo que sucedió. En cuanto al contenido de los gráficos que se detallan de cada parámetro fisicoquímico, se muestra los datos a largo del tiempo (0, 7, 15 y 21 días de vida útil), para dos tipos de queso (QCC y QSC, respectivamente) proveniente de tres lotes de producción (L1: azul; L2: rojo; y L3: gris) y las barras verticales representan el error estándar de cada dato. Las letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencia significativa a lo largo del tiempo para un mismo tipo de queso dentro del mismo lote, mientras que las letras minúsculas iguales indican que no hay diferencia significativa entre los tipos de queso dentro del mismo lote o diferente en una misma fecha de medición, de acuerdo con prueba de Tukey's HSD, $p > 0.05$. Ver detalles del modelo de ANDEVA en la tabla 1.

En el caso del L2, se realizó una medición extra el día 28 de su almacenamiento en ambos quesos, con el fin de detallar su comportamiento, sin embargo, fue excluido del modelo estadístico y de su análisis, ya que no era parte del objetivo planteado monitorearlo hasta ese día.

4.1.1. Variable de pH

El análisis del pH se realizó por tipo de queso a través del tiempo de almacenamiento de cada lote, ya que cada uno tuvo su tendencia particular al ser eventos diferentes no estandarizados, por lo tanto, su análisis se realizó por día dentro de cada lote y no comparando los resultados de los días ensayados entre los tres lotes como se planeaba realizar.

A pesar que el lote 1 desde el día 1 ya presentaba valores de pH más ácidos en ambos quesos (5.8) en comparación del lote 2 y 3 que comenzaron con valores de 6.5, se observa que no existe una diferencia biológicamente significativa entre los valores de pH del QCC y el QSC a lo largo del tiempo, así como en el lote 3 (ver figura 3). Por lo cual, independientemente del dato de pH con que iniciaba el queso, el cultivo de *L. curvatus* no mostró una diferencia entre los quesos de este parámetro a lo largo del tiempo de almacenamiento.

En el caso de los quesos del lote 2, no hay diferencias significativas en los días 1 y 7, pero, a partir del día 15 y 21, sí tuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$), donde el QCC tenía un valor ligeramente menor que el QSC, pero su tendencia difiere de los otros lotes, por lo cual se necesitaría más estudios para poder determinar si fue un evento inusual que influyeron otros factores como por ejemplo la producción de sustancias químicas microbianas que modifican el pH por parte de otros microorganismos ajenos al cultivo incorporado de *L. curvatus*.

En general, en ambos quesos del lote 2 y 3, se observa que, a partir del día 15, el pH se vuelve más ácido, en cambio en el lote 1 el pH de ambos quesos se puso más ácido desde el día 7, pero es por las condiciones particulares que ya presentaba desde el inicio este lote. La descendencia de los valores de pH es

normal por la producción de ácidos producto del metabolismo de los microorganismos presentes en los quesos frescos.

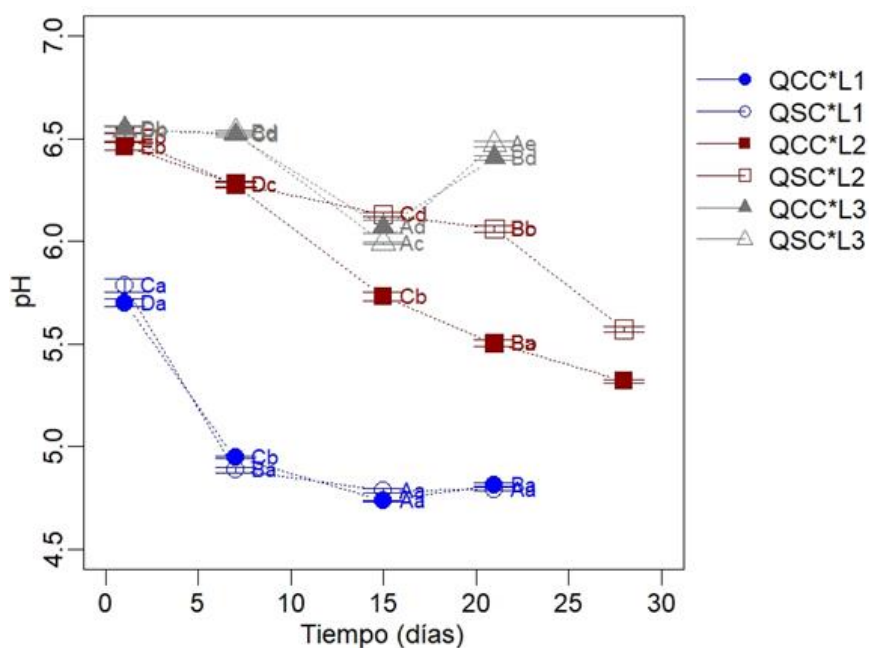


Figura 3. Comportamiento del pH a través de la vida útil del queso fresco.

El pH, de acuerdo con Palacios-Vargas (2009), cuando está a niveles menores a 5 el crecimiento de muchos microorganismos cesa y se da poco. Las BAL son las que se ven beneficiadas en su crecimiento y se da la selección predominante de este grupo de bacterias al formar sustancias inhibitoras como el ácido láctico, propiónico y acético, por lo que se podría suponer que gran parte de la microbiota total del lote 1 es muy diferente al presente en el lote 2 y 3, por lo cual sus diferencias generales en todos los parámetros fisicoquímicos y sensoriales.

4.1.2. Variable de humedad

El queso fresco se caracteriza por tener una humedad variable entre los 53 hasta 69 %, por lo cual su variabilidad puede depender de muchos factores dentro del proceso productivo. En los quesos frescos de los tres lotes hechos, la humedad estuvo entre los 57-66 % a través del monitoreo que se realizó durante su vida útil, pero en promedio fue de un 62 %, lo que indica que estuvieron dentro de los rangos

de humedad esperados para este tipo de producto a pesar de haber tenido diferencias entre los lotes.

En general, no hubo una diferencia significativa entre los QSC vs los QCC en los diferentes lotes muestreados. Por ejemplo, en el lote 1 el QSC se mantiene con una humedad muy homogénea de $(62,9 \pm 0,5) \%$ a $(63,4 \pm 0,5) \%$ del día 1 al día 21 de vida útil y en el caso del QCC sus valores tienden hacia la misma homogeneidad, teniendo un valor de $(63,6 \pm 1,0) \%$ el día 21. En el lote 2, tanto el QSC como el QCC tienen a bajar su porcentaje del día 1 al día 15 pero luego se mantiene, solo en el QCC se registró una pequeña diferencia entre los quesos del día 15 y 21, esto puede deberse a pequeñas variantes de humedad entre las mismas muestras y no por el cultivo. En el día 21 de vida útil ambos quesos se mantuvieron en un $(62 \pm 2,0) \%$ de humedad (ver figura 4).

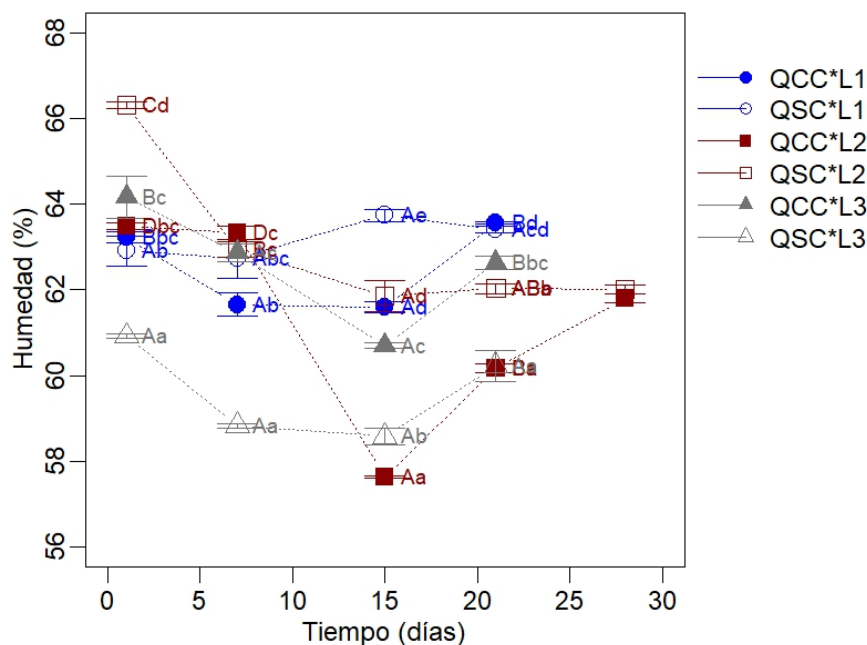


Figura 4. Comportamiento de la humedad a través de la vida útil del queso fresco.

En el caso del lote 3, la humedad de los quesos durante el almacenamiento en el proceso de desuerado sufrió un problema de deshidratación, ya que hubo una falla en la cámara de frío que provocó dicha pérdida principalmente en la

superficie del QSC. Debido a ello, el QSC siempre tuvo una diferencia significativa en porcentaje de humedad y, en consecuencia, el día 21 tuvo el menor valor registrado de humedad de los lotes y los quesos con un $(60,2 \pm 1,1)$ %, lo cual influye directamente en el desempeño del cultivo agregado y en el comportamiento de los demás microorganismos.

El contenido de humedad en los quesos se ve influenciada por muchos factores. Por ejemplo, el comportamiento del desuerado de los quesos obtenidos por una coagulación de tipo enzimática no tiene una deshidratación rápida de las micelas de fosfoparacaseinato de calcio, sin embargo, con el tiempo es normal que se contraigan y expulsen el suero que estaba atrapado mecánicamente. Este proceso se incrementa por medio del troceado del queso que libera parte de ese suero, además del control de la temperatura durante su producción y almacenamiento (López-Orozco, 2004).

Asimismo, durante el proceso de almacenamiento de los quesos, aparte de haber sufrido un abuso de temperatura que incrementa varios procesos enzimáticos que generan proteólisis, también hubo una disminución del pH a lo largo del tiempo que afecta la estructura proteica del producto e induce una mayor sinéresis, por lo tanto influye en el aumento de iones H^+ concentrados en el queso, lo cual provoca fuerzas iónicas e hidrófobas entre las micelas de caseínas y como resultado se da el desuerado, afectando por consiguiente la humedad final del queso. (Lu et al., 2008 y Zambrano, 2010, citado en Antezana-Vásquez, 2015). Sin embargo, en este estudio no hubo una pérdida muy significativa de la humedad a lo largo del tiempo entre los diferentes quesos.

4.1.3. Variable de textura

El TPA es un atributo de múltiples parámetros que juntos se convierten en una simulación de la sensación de textura en la boca de un consumidor o panelista, el cual se midió al inicio y final de la vida útil de un producto alimenticio como el queso fresco. La medida de la textura del queso se realizó por medio de una pequeña muestra homogénea (simulando el tamaño de un bocado) que se

comprimió en el texturómetro dos veces en un movimiento recíproco que imita la acción de la mandíbula, la cual se traduce en curvas de fuerza-tiempo (Stable Micro Systems, 2007). El análisis de perfil de textura para cada tipo de queso y de cada lote de producción se detalla a continuación.

El primer parámetro textural en el TPA es la dureza, la cual se define como la fuerza máxima necesaria para provocar una cierta deformación en el queso durante el primer ciclo de compresión, siendo el pico máximo registrado (Stable Micro Systems, 2007, Chacón-Villalobos y Pineda-Castro, 2009).

Al analizar la figura 5, se observa que no hay diferencias significativas entre los QCC y QSC tanto del lote 1 como del lote 2 a través de los días de vida útil, lo cual coincide con la humedad encontrada en ambos tipos de quesos que fue muy similar con el paso del tiempo, por lo tanto, la *L. curvatus* no influyó en este parámetro.

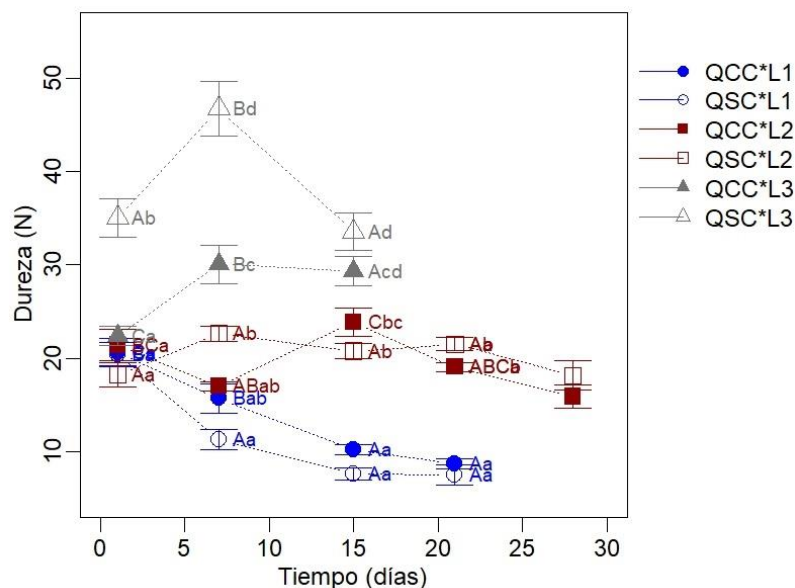


Figura 5. Comportamiento de la dureza a través de la vida útil del queso fresco.

En el caso del lote 3, al haberse deshidratado ambos quesos durante su almacenamiento en la cámara de frío antes de su empaque, desde el día 1 la

dureza iba a ser diferente y mayor que en los otros dos lotes a lo largo del tiempo, por lo cual es una producción que no se toma en cuenta para este parámetro.

El lote 1 fue el que tuvo la menor firmeza en la textura y bajaba con el tiempo. Dicha peculiaridad pudo deberse a su menor pH y a la firmeza resultado de la red proteica inestable.

La elasticidad define el comportamiento del alimento al tratar de regresar a su forma original con el tiempo, está relacionada con la altura que recupera durante el tiempo que pasa entre el final de la primera mordida y el comienzo de la segunda mordida (Stable Micro Systems, 2007). Dicho parámetro se asocia con el contenido de grasa del queso y la humedad, ya que cuando están en alto porcentaje brindan una mayor elasticidad y una menor firmeza (Chacón-Villalobos y Pineda-Castro, 2009).

Como se observa en el siguiente gráfico (figura 6), en el lote 1 estos quesos no se relacionaron con una menor firmeza y mayor elasticidad, ambos tipos de queso tuvieron la menor elasticidad de los lotes y disminuyó con el paso del tiempo, solo el QCC presentó una elasticidad mejor que el QSC, la cual coincide con la dureza.

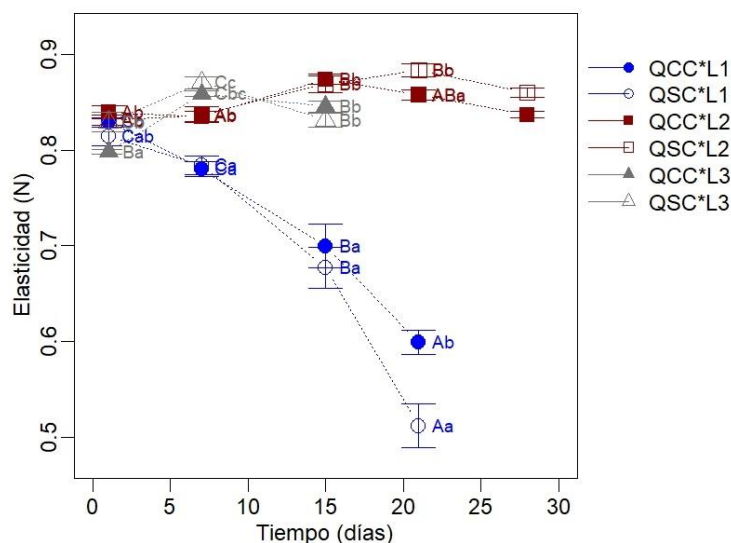


Figura 6. Comportamiento de la elasticidad a través de la vida útil del queso fresco.

Para el lote 2 y 3, la elasticidad estuvo muy homogénea entre los tipos de quesos y entre ellos. Por lo cual, en términos generales, el cultivo tampoco mostró alguna diferencia significativa entre un mismo lote y entre lotes.

Otro parámetro textural es la cohesividad, la cual se define “como la relación entre el área de fuerza positiva durante la segunda compresión y la de la primera compresión” (Stable Micro Systems, 2007), es decir, se determina comparando la relación entre ambas compresiones y representa “el punto límite hasta el cual puede deformarse el material antes de romperse (Osorio et al. 2004, mencionado en Chacón-Villalobos y Pineda-Castro, 2009). En el día 1 y 7 de vida útil todos los lotes y tipos de quesos tuvieron una cohesividad similar, pero en los días 15 y 21 se observaron diferentes principalmente por los quesos del lote 1 que se rompieron más fácilmente en comparación con los quesos de los otros lotes. En el lote 2 y 3 la cohesividad no tuvo diferencias significativas entre el QCC y el QSC.

Por otro lado, la gomosidad se define como el producto de la dureza por la cohesión y se utiliza para describir una característica de los alimentos semisólidos con un bajo grado de dureza y un alto grado de cohesión (Stable Micro Systems, 2007). En otras palabras, es la energía necesaria para masticar el queso de acuerdo con su dureza, elasticidad y cohesividad. De acuerdo con los resultados mostrados en la gráfica siguiente (ver figura 7), al ser el resultado de la relación entre la dureza y la cohesión tuvieron exactamente la misma tendencia, donde los quesos del lote 1 al ser más suaves se necesitaba menos fuerza para degradarlos, al contrario de los resultados de los quesos del lote 3.

Y el último parámetro textural es la adhesividad que se define como “la fuerza necesaria para superar la de atracción entre la superficie del alimento y aquellos materiales con los que entra en contacto” (Chacón-Villalobos y Pineda-Castro, 2009), como en este caso la sonda del texturómetro.

De acuerdo con lo argumentado por Chacón-Villalobos y Pineda-Castro (2009), “si la adhesividad es baja en comparación con la cohesividad, es probable que la sonda permanezca limpia, ya que el producto tiene la capacidad de

mantenerse unido". Dicho comportamiento se vio con los quesos de los lotes 2 y 3 en comparación con los quesos del lote 1.

Por otro lado, conforme aumenta la elasticidad de un alimento también aumenta la resistencia a la deformación de este por la flexibilidad de los enlaces internos (Muller, 1977 mencionado en Chacón-Villalobos y Pineda-Castro, 2009), por lo que es de esperar que también aumente la cohesividad. Esta tendencia se vio reflejada en los quesos tanto del lote 2 como del lote 3 principalmente en los días 15 y 21 de vida útil.

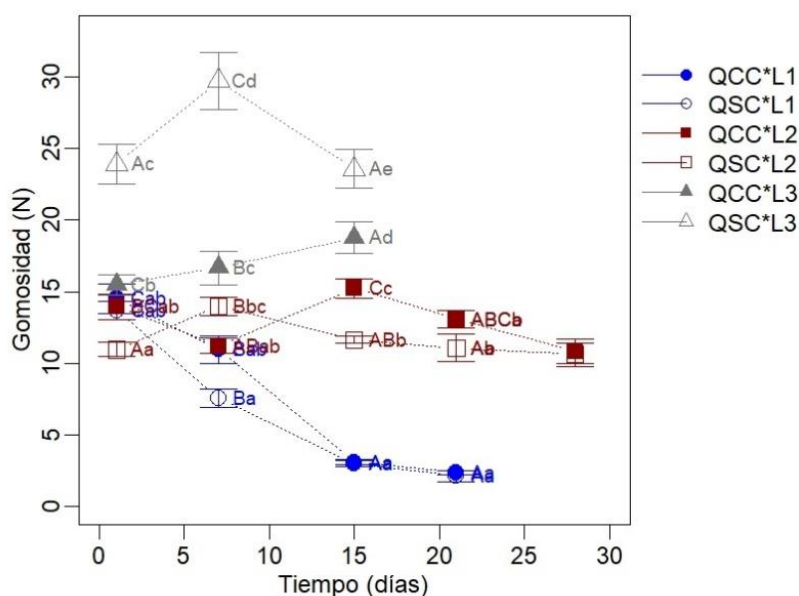


Figura 7. Comportamiento de la gomosidad a través de la vida útil del queso fresco.

En general, las características de textura de los quesos se ven influenciadas por múltiples factores como la composición de la leche, la cual depende de la raza de las vacas, la etapa de la lactancia y la estacionalidad, los parámetros en los procesos de producción y estandarización de la leche. Además, estas también cambian con el envejecimiento debido a la proteólisis, la pérdida de humedad, la captación de sal, el cambio de pH y la lenta disolución del Ca residual asociado con la interacción de las moléculas de caseína (Lucey, Johnson, y Horne, 2003).

Debido a lo anterior y por temas imprevistos durante la producción y almacenamiento, cada lote tuvo su peculiaridad con los parámetros fisicoquímicos y no son eventos comparables entre sí, a pesar de realizarse en la misma planta, bajo las mismas condiciones y en fechas cercanas entre una producción y la otra.

4.2. Problemas en planta, proceso y análisis microbiológicos

En el estudio realizado por Gutiérrez-Espinoza (2012), se evidenció que los principales grupos bacterianos de deterioro que se encuentran en los quesos frescos producidos en diferentes industrias del área metropolitana son las pseudomonas, enterobacterias y las bacterias lácticas. El crecimiento de estos grupos bacterianos se acelera con el aumento de la temperatura de almacenamiento, lo cual evidencia la importancia de utilizar siempre temperaturas de refrigeración bajas como método de conservación para este tipo de producto.

Desafortunadamente, al obtener los resultados de la temperatura de almacenamiento del lote 1 y 2 que estuvieron al mismo tiempo almacenados, el datalogger monitoreó la temperatura por minuto obteniéndose a lo largo de casi 30 días un promedio de 9.1 °C, donde el mínimo general llegó a 4 °C y el máximo general a 11.5 °C (ver figura 21 del anexo 1). Del total en el tiempo, el 97 % de las veces los quesos estuvieron almacenados a una temperatura mayor a 5 °C, por lo cual tuvieron un abuso de temperatura al no estar en temperaturas ≤ 5 °C. Este factor junto con la contaminación microbiana presente en los quesos (ver resultados en el anexo 6), evidencia por qué dichos quesos presentaron una degradación desde el día 15 y que fue percibido por un grupo de panelistas no entrenados durante una evaluación sensorial piloto en los días 12 y 19 de almacenamiento del lote 2 y 1.

La presencia de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y la *E. coli* es un típico indicador de que durante la producción del queso fresco en la planta hubo algún problema de control microbiológico, ya sea por una pasteurización deficiente o una contaminación por el agua y/o biofilms en las superficies de contacto, mangueras, etc. A pesar de que se veló por una limpieza y desinfección exhaustiva de la planta

y todos los equipos e instrumentos que se utilizan en la producción del queso fresco, se verificó que el problema de contaminación microbiológica tenía otra fuente de origen.

Durante el proceso de elaboración de los quesos tanto en planta como en laboratorio, no se pudo tener el control desde el ordeño y el almacenamiento de la leche cruda, en detalles como la filtración, temperatura, tiempo de almacenamiento y la velocidad de enfriamiento. Además, por la disponibilidad de recursos, no se pudo contar con un análisis de carga microbiológica inicial de la leche cruda y la leche pasteurizada, para comprobar si el proceso de pasteurización fue eficiente para eliminar los microorganismos patógenos y la mayoría de los de deterioro, de acuerdo con los parámetros microbiológicos que establece el RTCA sobre criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos para la leche pasteurizada (COMIECO, 2009).

Por otro lado, tampoco se pudieron realizar análisis de residuos de antibióticos y la prueba de fosfatasa alcalina residual, la cual ayuda a verificar si el proceso de pasteurización fue efectivo al comprobar la inactivación de las enzimas fosfatasas al ser sensibles a altas temperaturas (por lo menos las temperaturas y tiempos que se utilizan para una pasteurización baja) y las cuales están presentes como producto metabólico de las células mamarias de la vaca (Cristales-George, 2009).

En el caso de la contaminación por bacterias patógenas como la *E. coli*, pudo haber sido por dos factores, como por ejemplo el agua que se utilizó durante las producciones, ya que hubo problemas con el proceso de cloración y segundo la eficiencia del proceso de pasteurización de la planta que no se pudo comprobar, ya que no se contaba con un plan HACCP (análisis de peligros y puntos críticos de control) implementado que permitiera controlar todos los puntos y límites críticos del proceso productivo donde tiene el riesgo de contaminarse el producto final. En un plan de estos, se contaría con medidas preventivas para evitarlos.

De acuerdo con Luquet (1991), mencionado en Cristales-George (2009), los microorganismos psicrófilos mueren con temperaturas mayores a 25 °C, luego los mesófilos aerobios como los coliformes mueren a temperaturas superiores de los 42 °C y para arriba de los 60 °C mueren los microorganismos termorresistentes, como el género *Salmonella sp.*, por lo cual ni *Pseudomonas sp.* ni la *E. coli* debieron haber estado presentes, ya que se pasteurizó por 72 °C por 15 segundos y no sobrevivirían a estas temperaturas (Palacios-Vargas, 2009).

El proceso de pasteurización elimina una parte de la microbiota que venía en la leche principalmente microorganismos patógenos, termosensibles, pero no las esporas, algunos microorganismos termorresistentes como las bacterias lácticas, las cuales son fermentativas, enzimas proteolíticas y lipolíticas de algunos microorganismos como las de *pseudomonas* y la enzima lactoperoxidasa (Cristales-George, 2009 y Palacios-Vargas, 2009).

Es por ello que, al no saber cómo estaba la carga inicial y final de la leche, el comportamiento de todos esos microorganismos sobrevivientes y sus enzimas, pudieron dar lugar a las diferencias de resultados fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales entre los diferentes lote de producción, lo cual evidencia que un cultivo bioprotector puede verse perjudicado o favorecido según estén todos esos factores, incluyendo además las interacciones entre las diferentes poblaciones microbianas de antagonismo o de simbiosis según estén los recursos disponibles, temperatura de almacenamiento, disponibilidad de oxígeno, el pH, el aw, la humedad, entre otros.

4.3. Análisis sensoriales

Los quesos producidos a nivel de laboratorio estuvieron almacenados a una temperatura promedio de 5 ± 2 °C a lo largo de los 22 días de almacenamiento, donde el 70 % del total del tiempo estuvieron en temperaturas menores a 5 °C (ver figura 22 del anexo 1). En el caso de los paneles sensoriales de estos quesos para el primer panel participaron 31 evaluadores entre 20 y 35 años de edad (promedio de 25 años), 21 mujeres y 10 hombres, para el segundo panel fueron 34 entre 18

y 40 años de edad (promedio 23 años) e igual proporción de hombre y mujeres (17 cada uno) y finalmente en el tercer panel los participantes fueron 29 personas entre 18 y 67 años de edad (promedio 24 años), de los cuales 15 mujeres y 14 hombres. En general, fueron personas jóvenes que evaluaron los quesos frescos, la mayoría no fumaban, gozaban de buena salud y eran consumidores de este lácteo.

Además, se les realizó análisis microbiológicos para comprobar su inocuidad solo el QCC estuvo libre de bacterias patógenas, por lo tanto, fue el único que se analizó a nivel de sabor.

4.3.1. Resultados del análisis de escala hedónica

Los resultados de los análisis de escala hedónica del QCC se encuentran en la figura 8, en la cual se muestra que tanto la evaluación sensorial del olor, la textura como del sabor las opiniones no fueron significativas con el paso del tiempo (se rechaza la hipótesis alternativa).

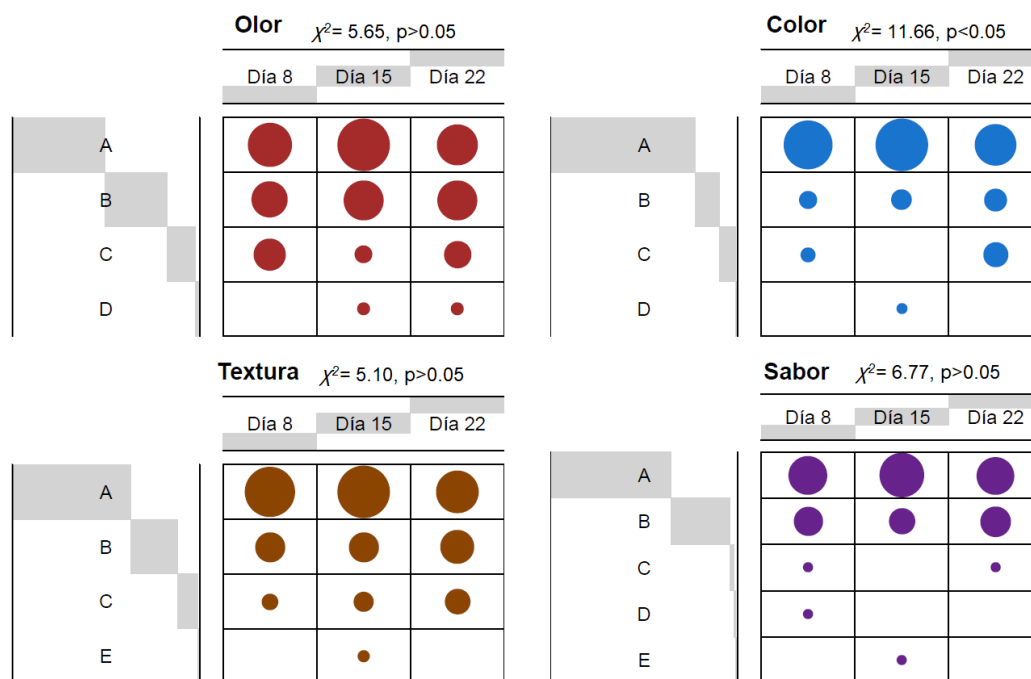


Figura 8. Opinión de los panelistas no entrenados a través de la vida útil del QCC.

En la figura anterior A significa “me gusta mucho”; B, “me gusta moderadamente”; C, “ni me gusta ni me disgusta”; D, “me disgusta moderadamente” y E, “me disgusta mucho”.

Debido a lo anterior, se demuestra que las categorías de la escala hedónica son independientes o no están asociados con los días de almacenamiento del QCC a diferencia del color, que si fue significativo, ya que los días 8 y 15 las opiniones fueron muy parecidas pero el día 22 varió más en la opinión “me gusta moderadamente” y “ni me gusta ni me disgusta”.

La evaluación del olor en general tuvo muy buenas calificaciones para la mayoría de los consumidores, ya que en el día 8 el 77 % del total de los panelistas les gustó mucho y moderadamente, en el día 15 fue el 91 % del total opinaron igual y en el día 22 fue el 79 % (ver figura 9). El día 8 de envejecimiento, de 31 personas que realizaron la evaluación 24 opinaron que el aroma era lácteo (olor a leche fresca), 1 lo detectó ácido y 6 dulce, para el día 15 de 34 personas 29 lo detecto lácteo, 1 ácido y 4 dulce y finalmente para el día 22 de 29 personas 19 lo detectaron lácteo, 9 ácido y 2 dulce. Finalizando su vida útil, se detectó un poco más un olor acidificado, pero aun agradable para la mayoría de los panelistas.

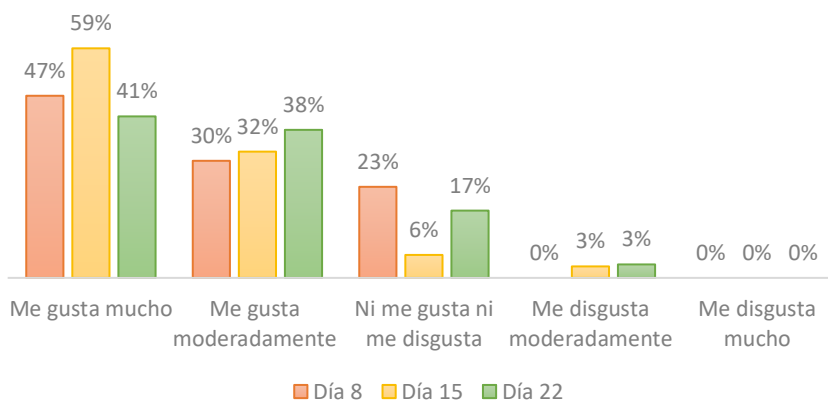


Figura 9. Categorías del olor a través de la vida útil del QCC.

Para el caso del color, tuvo excelentes calificaciones para la mayoría de los consumidores las 2 primeras semanas, obteniéndose un 93 % y 97 % del total de

los panelistas con la opinión de que les gustó mucho y moderadamente para el día 8 y 15 respectivamente, en cambio para el día 22 fue el 79 % al haber más opiniones neutras (ni les gustó ni les disgustó) (ver figura 10).

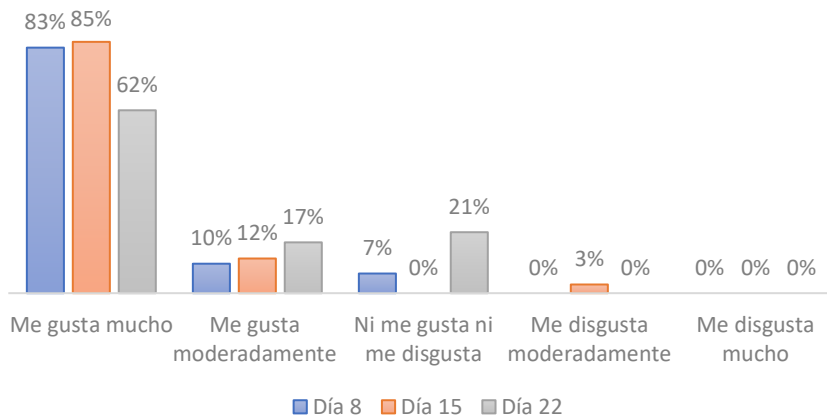


Figura 10. Categorías del color a través de la vida útil del QCC.

Entre las características de apariencia más destacadas en los tres días de evaluación, fueron de un queso húmedo, color blanco crema y con huecos pequeños amorfos, solo aumento la opinión de huecos grandes, pero en 5 personas de 29 el día 22. Dichos resultados y al aceptarse la hipótesis alternativa, evidencia que el queso tuvo una percepción de cambió en su apariencia por lo menos durante los 22 días de vida útil.

Para la mayoría de los panelistas, la textura también tuvo buenas calificaciones las tres primeras semanas, obteniéndose un 93 %, 89 % y 83 % respectivamente del total de las opiniones de que les gustó mucho y moderadamente, en el caso del día 22 hubo más opiniones neutras (ni les gustó ni les disgustó), disminuye el porcentaje de la categoría A y aumenta la B y C (ver figura 11).

Entre las características de textura al tacto, el día 8 fue muy parecido la opinión de que el queso era duro (15 opiniones de 31) o elástico (16 opiniones) pero conforme avanzan las semanas de vida útil hay más opiniones de que se vuelve más elástico (día 22 de 29 panelistas 6 opinaron que era duro y 19 que era

elástico), lo cual es de esperar por el proceso de proteólisis y lipólisis producto del metabolismo de microorganismos y enzimas presentes en el queso. En el caso de la sensación húmeda, fue mayor en segunda y tercera semana de almacenamiento, lo cual es de esperar por la expulsión del suero o sinéresis durante el almacenamiento, al haber procesos de contracción de la red y la pérdida de humedad de las micelas de fosfoparacaseinato de calcio (López-Orozco, 2004). Ningún panelista clasificó el queso como baboso.

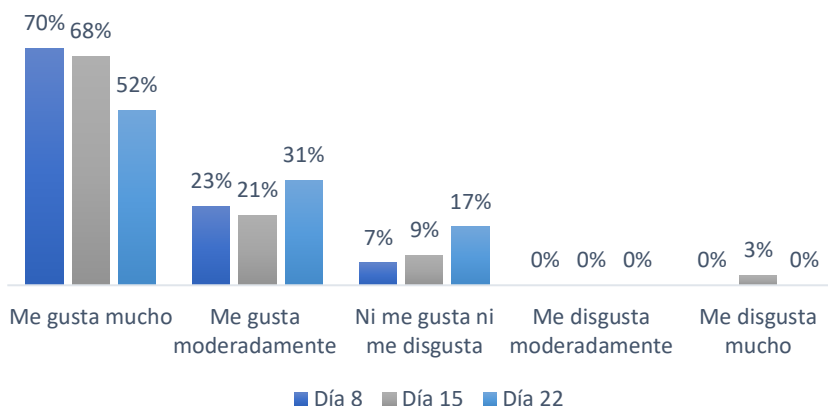


Figura 11. Categorías de la textura a través de la vida útil del QCC.

A nivel de sabor, las opiniones fueron muy buenas porque la mayoría de los panelistas opinaron entre la categoría A y B las tres semanas evaluadas, obteniéndose un 93 %, 98 % y 97 %, respectivamente del total de los panelistas (ver figura 12). Entre las características de sabor el salado siempre se detectó a través de las semanas y fue el predominante (26 opiniones las dos primeras semanas y 24 la última semana), el sabor ácido se detectó más en el día 22 pero fueron sólo 4 panelistas, el sabor a crema fue una opinión muy homogénea independientemente de los días de almacenamiento, lo cual indica que no cambio con el tiempo y se caracterizó por haberse fabricado con leche entera. No se detectó ningún sabor residual o fuera de lo normal para un queso fresco, ni nadie detectó un sabor rancio.

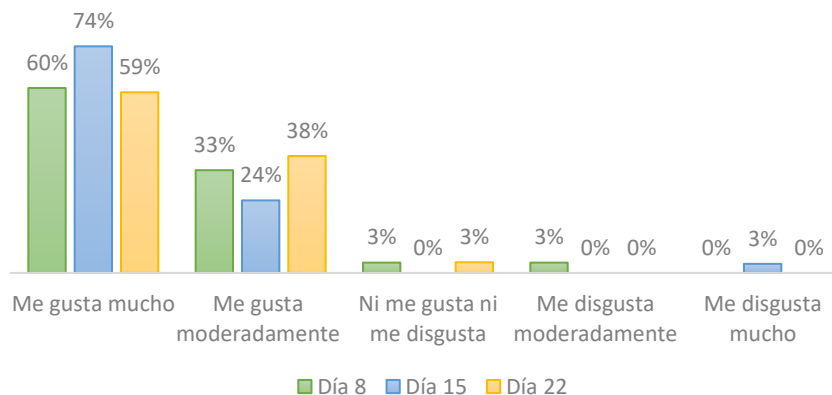


Figura 12. Categorías del sabor a través de la vida útil del QCC.

En el caso de la textura en la boca, las características censadas fueron las siguientes: más de la mitad de los panelistas opinaron que es jugoso en las tres semanas evaluadas, la opinión de un queso duro disminuyó con el tiempo (7, 5 y 4 panelistas opinaron eso el día 8, 15 y 22, respectivamente), lo cual coincide con la textura táctil analizada, la sensación hulosa pocas personas la detectaron (sensación de morder un hule), pero más al día 22 y grumoso fue muy homogéneo con el tiempo (12, 18 y 14 consumidores lo opinaron en los días 8, 15 y 22 respectivamente). Fueron pocas personas las que opinaron que tenía sensación cremosa.

En general, a muchos de los panelistas les gustó el QCC, ya en todas las características sensoriales dieron buenas calificaciones. Entre los comentarios recibidos fueron “muy rico, bastante bueno, lo comprarían, apariencia fresca y agradable, me gustó mucho, sabor fresco, buen sabor, textura y color, delicioso”, etc. En el día 22 después de la fabricación, hubo comentarios desde que el queso tenía un sabor suave y bueno, textura y olor agradables.

En el caso de los lotes procesados en planta (ver figura 13), los resultados de las características sensoriales variaban mucho en el día 21 de vida útil entre quesos y lotes.

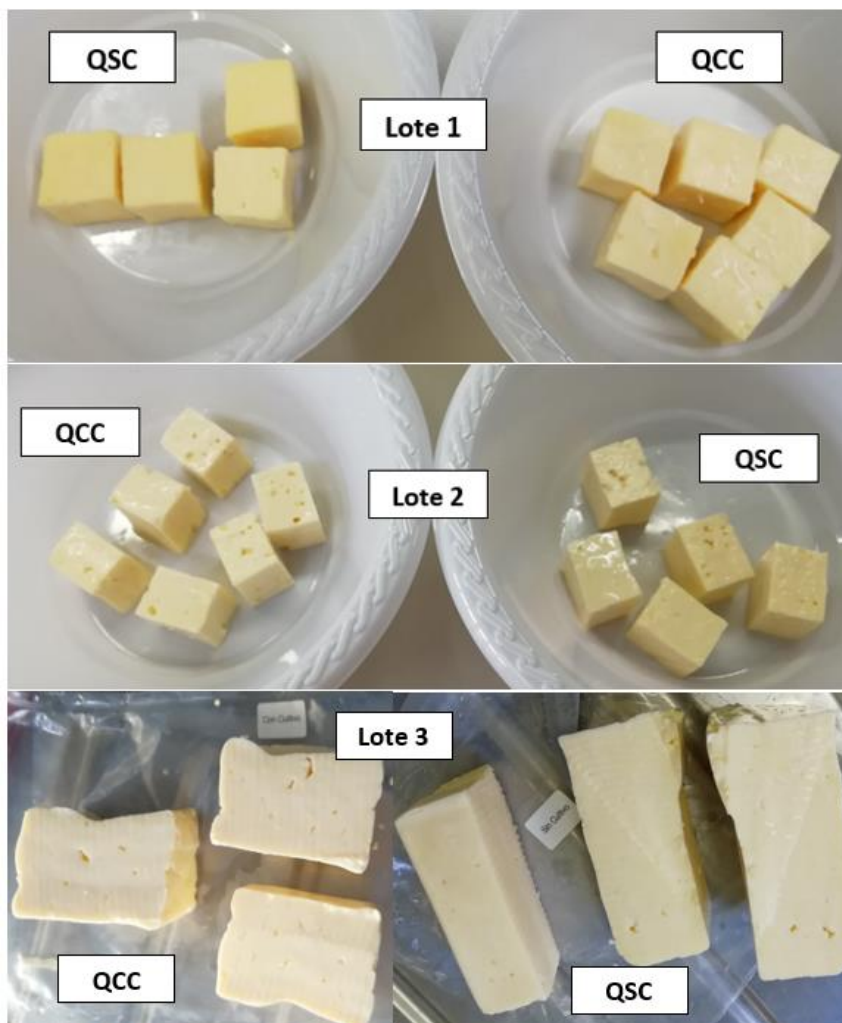


Figura 13. Comparación de texturas del QSC vs QCC el día 21 de vida útil de tres lotes elaborados en planta.

En el caso del lote 1, ambos tenían un olor acidificado, lo cual se evidencia con los resultados del pH, pero el QCC tenía una textura más firme y ninguno de los quesos tenía huecos en su apariencia. En el lote 2, el QCC olía ligeramente más ácido que el QSC, lo cual coincide con los resultados del pH, y en su textura no estaba baboso ninguno de los dos, ambos tenían similar número de huecos, se sintieron firmes y más duros que el lote 1. Finalmente, en el lote 3 ninguno de los quesos tenía huecos o cámaras de aire, no estaban babosos, tenían un aroma a leche fresca y el QCC mantenía una textura más suave que el QSC por la

deshidratación que sufrió este último, dichos resultados coinciden con lo visto en los análisis fisicoquímicos.

4.3.2. Resultados de la prueba triangular

En la prueba triangular, el panel de consumidores total fue de 29 panelistas, los cuales evaluaron cada uno de los quesos a nivel de aroma, apariencia y textura táctil el día 22 de vida útil, ya que fue el momento en que se iban notando diferencias entre ellos. A cada panelista se le entregaron simultáneamente tres muestras codificadas de queso, dos de QSC y uno de QCC, 11 panelistas recibieron las muestras en uno de los tres órdenes mencionados en el marco metodológico (AAB), en cambio los otros 18 las recibieron nueve veces cada uno de las otros órdenes restantes (ABA y ABB).

Los resultados obtenidos fueron que, de 29 panelistas, solo 24 detectaron la diferencia y 5 no, además los 24 afirmaron que fue fácil detectar la diferencia y 4 no, solo 1 no contestó dicha pregunta. El análisis de la prueba binomial permitió determinar si los resultados de la evaluación fueron por la probabilidad o si realmente se percibió una diferencia entre las muestras de queso.

Después de aplicar la prueba y a un nivel de probabilidad de 0.05, se encontró que 24 de los panelistas no entrenados identificaron correctamente el producto diferente, por lo tanto, se concluye que el QCC y el QSC son diferentes a nivel sensorial en este lote producido en el laboratorio, pues para 29 panelistas se requería que al menos 16 de ellos identificaran el producto diferente, por lo que se acepta la hipótesis alternativa. Evidentemente, se necesitan realizar más pruebas con diferentes lotes para comprobar si la tendencia a nivel sensorial es siempre tan marcada entre ambos quesos como sucedió con esta producción, además se deben realizar pruebas de preferencia de varias corridas para poder determinar si son igualmente aceptados y elegidos por la mayoría de los consumidores o hay alguna tendencia.

En general, el efecto biopreservante de la bacteria *Lactobacillus curvatus* B-LC-48 se ve influenciado por múltiples factores internos y externos que intervienen en la fabricación del queso fresco. La evidencia de ello fue las diferencias de los resultados entre lotes tanto de planta como de laboratorio

De acuerdo con lo antes mencionado, las BAL contribuyen, además de la producción de ácido láctico, a producir aromas y sabores particulares, algunas producen una excesiva cantidad de gas lo que provoca la ruptura de la textura y participan de forma activa en proceso de lipólisis y proteólisis (Palacios-Vargas, 2009), por lo cual su presencia y cantidad poblacional pudo haber influido en las características sensoriales observadas. Además, se refuerza que las BAL son un grupo predominante de deterioro en días avanzados de la vida útil del queso de acuerdo con el estudio obtenido por Gutiérrez-Espinoza (2012).

Por otro lado, las bacterias de la familia Enterobacteriaceae como los coliformes (*E. coli*), también están asociadas a la formación de gas e hinchazón del queso después de varias semanas de almacenamiento como producto de la fermentación de la lactosa en acetato, hidrógenos, CO₂ y butirato. Este defecto depende de la cantidad de bacterias presentes en el queso, el pH del queso y el aw (Palacios-Vargas, 2009).

En general, el control de las condiciones de procesamiento juega un papel fundamental en el resultado del efecto preservante del cultivo de la bacteria *Lactobacillus curvatus* B-LC-48, además, su comportamiento en el queso puede variar según la cantidad de poblaciones microbiana presentes, que juegan un papel competitivo por recursos para su reproducción y supervivencia, adicionalmente de todos los parámetros físicos y químicos que influyen en el queso.

Por otro lado, el modo de acción de las bacteriocinas que pueden ser bactericida o bacteriostático sobre las células sensibles, depende de varios factores como la cantidad producida según la fase de crecimiento de los microorganismos que las producen, si al agregar el cultivo este logra crecer en el alimento, el estado fisiológico de las células sensibles (fase de crecimiento) a las

cuales se ven expuestas y las condiciones experimentales del ensayo como el pH, la temperatura, presencia de compuestos antimicrobianos y de otros agentes que puedan alterar la integridad de la pared celular de las bacterias (Gómez-Sala, 2013), es por ello que se complica su efectividad constante a lo largo del tiempo.

En el proceso de producción de los quesos, en términos generales, el principal control relacionado con la disminución de gran parte de los microorganismos es la pasteurización de la leche que es al inicio del proceso, por lo cual es un punto indispensable para el control de la vida útil del queso.

Además, la leche pasteurizada queda susceptible a ser nuevamente contaminada a lo largo de su transformación en queso, lo cual implica un aumento de la microbiota en el producto final, y si sumado a ello sufre un abuso en la temperatura de almacenamiento a lo largo de la cadena de abastecimiento, conllevaría inevitablemente a una reducción de la vida de anaquel. Por lo tanto, el almacenamiento refrigerado e ininterrumpido es parte importante de los métodos de conservación que, en conjunto con los otros aspectos anteriormente mencionados, deben de ser aplicados de forma estricta (López-Orozco, 2004), lo cual en cierta parte del experimento no sucedió.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- a) En los análisis fisicoquímicos se encontró que en los valores de pH para los diferentes tipos de quesos de los tres lotes muestreados fueron descendiendo su valor con el tiempo. El añadir el B-LC-48 como cultivo biopreservante no modificó este parámetro al compararse los resultados de ambos quesos con el tiempo dentro de un mismo lote, sin embargo, hacen falta realizar más estudios con quesos frescos producidos en fábricas que tienen procesos estandarizados.
- b) En el caso de la humedad no hubo una diferencia significativa entre los diferentes tipos de quesos de un mismo lote (se excluye el lote 3 por influencia de un factor externo), por lo cual el cultivo no influyó con esta característica física. Todos los quesos, en general, tuvieron rangos de humedades normales y esperadas para este tipo de producto a lo largo del tiempo.
- c) En términos generales e independientemente de las diferencias puntuales y particulares en las características de cada lote, el análisis de perfil de textura de los QCC y los QSC no presentaron diferencias significativas, por lo cual se demuestra que el cultivo biopreservante no influyó sobre la textura a través del monitoreo de la vida útil promedio del queso fresco.
- d) En el análisis sensorial de la escala hedónica del QCC elaborado en el laboratorio, en general, los panelistas tuvieron una buena aceptación y percepción del queso a través de la vida útil de este producto, por lo cual al día 22 desde su producción aún tenía todas las características sensoriales que lo encasillaban en ser un queso fresco agradable para su consumo.
- e) Después de 22 días de almacenamiento del queso fresco elaborado a nivel de laboratorio, los QCC eran diferentes sensorialmente a los QSC de acuerdo con el análisis de prueba triangular; sin embargo, se debe realizar más ensayos para determinar si la tendencia es la misma siempre o es un evento poco usual, ya que factores como el salado o presencia de cierto

grupo de microorganismos pueden generar variaciones sensoriales significativas.

- f) En términos generales con las variables estudiadas, no se observa una diferencia significativa sobre el alargamiento de la vida útil o mejora del queso fresco, no obstante, hay una buena aceptación a nivel sensorial por parte de los consumidores. Las diferencias entre lotes se dieron por otros factores ajenos al cultivo biopreservante.

5.2. Recomendaciones

- a) Los resultados de la bioconservación por medio de la bacteria *Lactobacillus curvatus* B-LC-48 en el queso fresco se ve influenciado por muchos factores intrínsecos y extrínsecos en la fabricación del queso fresco. Es por ello que se recomienda mantener bajo control todos puntos críticos de control a lo largo de toda la cadena de procesos como la recepción de materias primas, procesamiento, distribución y almacenamiento del producto terminado, ya que, como cualquier conservante, no funciona como inhibidor por sí mismo, sino que actúan sinérgicamente como una barrera complementaria a la suma de otros métodos de conservación y prácticas que controlen la cantidad de microorganismos en el producto final, pues ellos influyen en las características finales de la vida útil de este producto.
- b) A partir de la experiencia generada en el estudio, hay que mejorar el control de diferentes variables para poder observar resultados que mantengan una misma tendencia con el tiempo. Es por ello que se recomienda en futuros estudios realizar las pruebas en plantas con procesos más estandarizados, donde implementen siempre las BPM y tengan programas de calidad como el HACCP. Además, por la contaminación microbiológica con bacterias patógenas presentada en los 3 lotes de producción en planta, no se pudieron realizar más análisis sensoriales.
- c) En futuras investigaciones, es importante tomar en cuenta con antelación los ciclos de enfriamiento de las cámaras de frío donde se van a almacenar

los quesos para evitar que este factor influya en los resultados que se esperan obtener.

- d) En los análisis microbiológicos realizados del lote 1 y 2, las BAL se comportaron igual en crecimiento independientemente si el queso tenía o no la inoculación de la bacteria láctica B-LC-48, por lo cual se recomienda en futuras investigaciones conocer específicamente cómo se comporta la bacteria *L. curvatus* dentro del queso fresco a través del tiempo bajo determinadas condiciones (si su población crece, se mantiene o decrece con el tiempo). Se debería hacer el monitoreo por medio de técnicas moleculares, así como las otras poblaciones microbianas presentes por medio de metagenómica. Igualmente, sería importante monitorear la producción de la bacteriocina según se indica en y su concentración a través del tiempo, así como de otras sustancias antimicrobianas.
- e) Se recomienda en investigaciones futuras realizar un estudio con varios análisis sensoriales donde se efectúen pruebas comparativas de QSC y QCC, ya sean de escala hedónica y/o de preferencia para determinar si a nivel sensorial hay alguna mejora del queso fresco por parte de cultivo B-LC-48.

VI. REFERENCIAS

- Anónimo, (2008). *Pliego de condiciones de la denominación de origen del “Queso Turrialba”*. Recuperado de <http://www.fao.org/fileadmin/templates/olq/documents/costarica/ppp/Miercoles/documentacion/PliegoCondicionesDOTurrialba.pdf/> [Consulta 8 mar. 2017].
- Antezana-Vásquez, C.I. (2015). *Efecto de la hidrólisis enzimática de la lactosa en el perfil de textura de queso fresco normal y bajo en grasa*. (Tesis de Ingeniera de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria la Molina, Perú). Recuperado de http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1789/Q04_A558_T%20BAN%20UNALM.pdf?sequence=1&isAllowed=y [Consulta 1 de may. 2019].
- Álvarez O., Herman C., Castro M., Cayré, M. E. y Garro, O. (2014). Evaluación de la capacidad bioprotectora de *Lactobacillus sakei* en productos cárnicos cocidos. Por A. G. López y E. Salvucci (Ed.) *Investigaciones y avances en microbiología de los alimentos*. (4-12). Córdoba: Ministerio de Industria, Comercio, Minería y Desarrollo Científico Tecnológico. Recuperado de <http://cicytac.cba.gov.ar/edicionesAnt/2014/6-Trabajos%20completos%20Microbiolog%C3%ADa%20-%20V%20CICYTAC%202014.-.pdf> [Consulta 8 mar. 2017]
- Barquero, M. (2016, 20 de octubre). Costa Rica produce cerca de 100 tipos de quesos. *Economía*. Recuperado de http://www.nacion.com/economia/agro/Costa-Rica-produce-tipos-quesos_0_1592440756.html [Consulta 17 mar. 2017]
- Berenson, M. L., Levine, D. M. y Krehbie, T. C. (2006). *Estadística para administración*. [Versión digital]. Recuperado de <https://books.google.co.cr/books?isbn=9702608023/> [Consulta 28 mar. 2019]
- Blanco-Metzler, A., Acuña-Calvo, M. T., Montero-Campos, M. A., Bolaños-Acuña, H. y Campos-Chacón, E. (s.f.). Vigilancia sanitaria de los alimentos en Costa Rica. Por Escuela de Salud Pública de la UCR (Ed.). *La salud pública en Costa Rica: estado actual, retos y perspectivas*. (311-337). San José: EUCR Recuperado de <http://www.saludpublica.ucr.ac.cr/index.php/repositorio-de-documentos/category/2-libro-la-salud-publica-en-costa-rica?download=23:Libro>

%20 %22La %20Salud %20P %C3 %BAblica %20en %20Costa %20Rica %22.
[Consulta 17 mar. 2017]

Buriti, F. C. A., Da Rocha, J. S., Assis, E. G. y Saad, S. M.I. (2005). Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT - Food Science & Technology*, 38(2), 173-180. doi:10.1016/j.lwt.2004.05.012

Cabeza-Herrera, E. A. (2006). Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. In Conferencia dada en: Simposio Regional de Microbiología "Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo", Universidad Libre, Barranquilla-Colombia (Vol. 15). Recuperado de file:///C:/Users/Daniela/Downloads/Bacteriascido-lcticas_BAL__aplicacio %20(1).pdf/ [Consulta 25 mar. 2017]

Castro, A. C., Novoa, C. F., Algecira, N. y Buitrago, G (2014). Reología y textura de quesos bajos en grasa. *RECyT*, 16 (22), 58–66. Recuperado de file:///C:/Users/Daniela/Downloads/121-256-1-SM.pdf

Chacón-Villalobos, A. y Pineda-Castro, M.L., 2009. Características químicas, físicas y sensoriales de un queso de cabra adaptado del tipo "Crottin de Chavignol". *Agronomía mesoamericana* 20(2):297-309.

Chavarría, J., Herrera, C. y Lutz, G. (2006). *Caracterización y determinación del potencial aterogénico de quesos producidos en Costa Rica*. Recuperado de <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/cienciaytecnologia/article/view/2653/> [Consulta 8 mar. 2017]

Chr. Hansen, (2014). *Bioprotección B-LC- 48*. México: Chr. Hansen de México, S.A.

Chr. Hansen A/S, (2014). *Información del producto del B-LC- 48* (4 PI-EU-EN 02-18-2014). Horsholm Dinamarca: Chr. Hansen Holding A/S.

- COMIECO (2009). RTCA 67.04.50:08 *Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos* (Nº 243-2009). Recuperado de http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=66277&nValor3=77870&strTipM=TC [Consulta 30 may. 2018].
- COVENIN (1997). COVENIN 1077-97: *Leche y sus derivados. Determinación de humedad*. Recuperado de <https://agroindustria-animal-2.jimdo.com/normas-covenin/> [Consulta 30 may. 2018].
- Cristales-George, S. E. (2009). *Recopilación de métodos de análisis oficiales y no oficiales más empleados para determinar fosfatasa alcalina y lactoperoxidasa en leche y quesos*. Recuperado de <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/2578/1/16101146.pdf> [Consulta 6 abr. 2019]
- Cristóbal-Delgado, R. L. (2008). *Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias*. (Tesis de Maestría en Microbiología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Recuperado de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/handle/cybertesis/235/> [Consulta 8 mar. 2017].
- Fallas-Rodríguez, P. (2015). *Caracterización sensorial del queso típico Turrialba fresco con sello de denominación de origen*. (Tesis de Licenciatura en Ingeniería de alimentos), Universidad de Costa Rica, Sede Rodrigo Facio.
- Fernández-Villa, K.J., Chanci-Echeverri, I.C., Wilches-López, L. y Cardona-Arias, J.A. (2014). Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibitor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. *Revista Biosalud*. 13 (1): 45-61.
- Gómez-Sala, B. (2013). *Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino: caracterización bioquímica y genética y producción heteróloga de las curvacinas G14 y G15 de "Lactobacillus curvatus" BCS35* (Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid). Recuperado de <http://eprints.ucm.es/23425/1/T34859.pdf> [Consulta 8 mar. 2017].

González-Arrieta, R. (2014). *Guía práctica para elaborar citas y referencias bibliográficas: adaptado al estilo APA*. San José: EUCR.

Gutiérrez-Espinoza, C. F. (2012). *Análisis de la variación de microorganismos de deterioro en queso fresco costarricense a través del tiempo de almacenaje a 4°C Y 10°C*. (Tesis de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica), Universidad de Costa Rica, Sede Rodrigo Facio.

Guzmán, L. E., Tejada, C., De la ossa, Y. J. y Rivera, C. A. (2015). Análisis comparativo de perfiles de textura de quesos frescos de leche de cabra y vaca. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(1), 139-147. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v13n1/v13n1a16.pdf> [Consulta 13 jul. 2018]

Hernández-Alarcón, E. (2005). Evaluación sensorial. [pdf]. Recuperado de <https://ecaths1.s3.amazonaws.com/.../767925145.4902Evaluacion%20sensorial.PDF/> [Consulta 01 may. 2017]

Jácome, S.L., Todorov S.D., Fonseca S.C., Pinheiro R., Guerreiro, J.S., Monteiro, V. et al. (2013). Bioconservación de alimentos tradicionales por adición de bacterias acidolácticas y de sus bacteriocinas. Por E. Fulladosa y M.D. Guàrdia, (Ed.) *Estrategias innovadoras para desarrollar alimentos más saludables*. (8-23). Monells: IRTA. Recuperado de <http://www.us2digital.com/pias/wp-content/uploads/2015/04/Estrategias-innovadoras-para-desarrollar-alimentos-mas-saludables.pdf> [Consulta 8 mar. 2017]

Kopper, G. (2009). Estudio de Caso – Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Costa Rica. Por Cadmo, R. y Mejía, D. (Ed.). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*. (13-46). Roma: FAO. Recuperado de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0480s/i0480s.pdf> [Consulta 17 mar. 2017].

Liria-Domínguez, M. R. (2007). *Guía para la Evaluación Sensorial de Alimentos*. Recuperado de <http://lac.harvestplus.org/wp-content/uploads/2008/02/Guia-para-la-evaluacion-sensorial-de-alimentos.pdf/> [Consulta 29 de mar. 2019]

- López-Orozco, M. (2004). *Mejoramiento de vida de anaquel en queso tradicional ranchero y queso de pasta hilada (Oaxaca)*. (Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Iberoamericana). Recuperado de <http://www.bib.uia.mx/tesis/pdf/014485/014485.pdf> [Consulta 17 mar. 2017].
- Lucey, J. A., Johnson, M. E. y Horne, D. S. (2003). Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. *Journal of Dairy Science*. 86 (9), 2725–2743. Recuperado de [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73869-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73869-7) [Consulta 21 abr. 2019].
- MEIC-MAG, (2008). *Decreto N° 18462. RTCR 422:2008 Reglamento técnico quesos no madurados, incluidos los quesos frescos*. Recuperado de https://members.wto.org/crnattachments/2008/sps/CRI/08_3993_00_s.pdf [Consulta 30 may. 2018].
- Monroy-Dosta, M. C., Castro-Barrera, T., Fernández-Perrino, F. J. y Mayorga-Reyes, L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Revista ContactoS* (73), 63–72. Recuperado de http://www.academia.edu/1534199/Revision_bibliografica_Bacteriocinas_producidas_por_bacterias_probioticas/ [Consulta 10 may. 2017]
- Mora-Peñaflor, N. y García-Guerrero, A. (2007). *Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos*. (Tesis de Licenciatura en Química de alimentos, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo). Recuperado de <https://www.uaeh.edu.mx/docencia/Tesis/icbi/licenciatura/documentos/Susceptibilidad%20de%20bacterias%20acido%20lacticas.pdf> [Consulta 17 mar. 2017]
- Moore, D. S. (2005). *Estadística aplicada básica*. [Versión digital]. Recuperado de <https://books.google.co.cr/books?isbn=8495348047> [Consulta 27 de mar. 2019]
- Nielsen, S. (Ed). (2010). *Food Analysis*. [Versión digital]. Recuperado de <https://student.cc.uoc.gr/uploadFiles/184-%CE%A7%CE%97%CE%9C-068/Compositional%20Analysis%20of%20foods%20-%20Food%20Analysis%20-%20S.S.%20Nielsen.pdf> [Consulta 8 de jul. 2018]

- Palacios-Vargas, S. (2009). *Caracterización microbiológica de diversos tipos de quesos elaborados en el Valle de Tulancingo Hidalgo*. (Tesis de Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo). Recuperado de [http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10866/Caracterizacion %20microbiologica %20de %20quesos.pdf?sequence=1/](http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10866/Caracterizacion%20microbiologica%20de%20quesos.pdf?sequence=1/) [Consulta 17 mar. 2017].
- Revilla, A. (2009). *Tecnología de la leche*. Francisco Morazán, Honduras: Zamorano Academic Press.
- Rojas, C. y Vargas, P. (2008). Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Revista Tecnología en Marcha*. 21(2), 9-16.
- Stable Micro Systems (2007). *Exponent* (Versión 6.1.11.0). [Software y CD]. Lugar: United Kingdom
- Subramanian, A. y Rodríguez-Saona, L. (2010). Chapter 5: Chemical and Instrumental Approaches to Cheese Analysis. En Taylor, S. L. (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (pp. 167-213). Valencia: Fidel Toldrá. doi.org/10.1016/S1043-4526(10)59005-3
- Torres-González, J. D., González-Morelos, K. J. y Acevedo-Correa, D. (2015). Análisis del perfil de textura en frutas, productos cárnicos y quesos. *ReCiTeIA* 14(2), 63-75. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/283352303>
- Vásquez, S. M., Suárez, H. y Montoya, O. I. (2009). Evaluación de bacteriocinas como medio protector para la biopreservación de la carne bajo refrigeración. *Revista Chilena de Nutrición*, 36 (3), 228-238. Recuperado de <http://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v36n3/art05.pdf/> [Consulta 8 mar. 2017]
- Vásquez, S. M., Suárez, H., y Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), 64-71. Recuperado de <http://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v36n1/art07.pdf/> [Consulta 8 mar. 2017]

- Villalta-Moreno, J. J. (2010). *Conservadores químicos utilizados en la industria alimentaria*. Recuperado de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/456/61581s.pdf?sequence=1> [Consulta 7 abr. 2019]
- Watts, B.M., Ylimaki, G.L., Jeffery, L.E., Elías, L.G. (1992). *Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos*. [Versión digital]. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10625/12666> [Consulta 12 de oct. 2018].
- Willey, J.M., Sherwood, L.M. y Woolverton, C. J. (2009). *Microbiología de Prescott, Harley y Klein* (I. Gibert, tr.) Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U.
- Zavala-Trías, S. (2012). *Guía a la redacción en el estilo APA, 6ta edición*. Recuperado de http://www.pincc.unam.mx/4tocongreso/DESCARGABLES/APA_2012.pdf [Consulta 15 de jul. 2018].

VII. GLOSARIO

AOAC: Association of Official Analytical Chemists.

ASEAL: Asesoría en Alimentos Alfa S. A.

Aw: Actividad de agua, es decir es la cantidad de agua libre en el alimento disponible para el metabolismo y crecimiento de microorganismos.

BPM: Buenas prácticas de manufactura

°C: Según el Sistema Internacional de Unidades se define como grados centígrados, una unidad de temperatura.

ECA: Ente Costarricense de Acreditación.

ETA: Enfermedades Transmitidas por los Alimentos.

g: Según el Sistema Internacional de Unidades se define como gramos.

GRAS: Siglas en inglés que significan Generalmente Reconocido Como Seguro.

h: Según el Sistema Internacional de Unidades se define como hora.

HACCP: Siglas en inglés que significan Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control.

ISO: International Standardization Organization.

Kg: Según el Sistema Internacional de Unidades se define como kilogramos.

L: Según el Sistema Internacional de Unidades se define como litros.

mL: Según el Sistema Internacional de Unidades se define como mililitros.

min: Según el Sistema Internacional de Unidades se define como minutos.

NMP: Número más probable al 95% de confianza. Unidad de medida para estimar el número de microorganismos en muestras de alimentos u otros.

pH: Concentración de iones de hidrógeno presentes en una sustancia, la cual indica el grado de acidez o alcalinidad de la misma.

QSC: Queso fresco sin cultivo B-LC-48.

QCC: Queso fresco con cultivo B-LC-48.

RTCA: Reglamento técnico centroamericano.

RTCR: Reglamento técnico de Costa Rica.

s: Según el Sistema Internacional de Unidades se define como segundos.

T: Significa la palabra temperatura.

t: Significa la palabra tiempo.

TPA: Siglas en inglés que significan Análisis de Perfil de Textura.

UFC: Unidades formadoras de colonias, es un recuento en placa de la cantidad de colonias bacterianas.

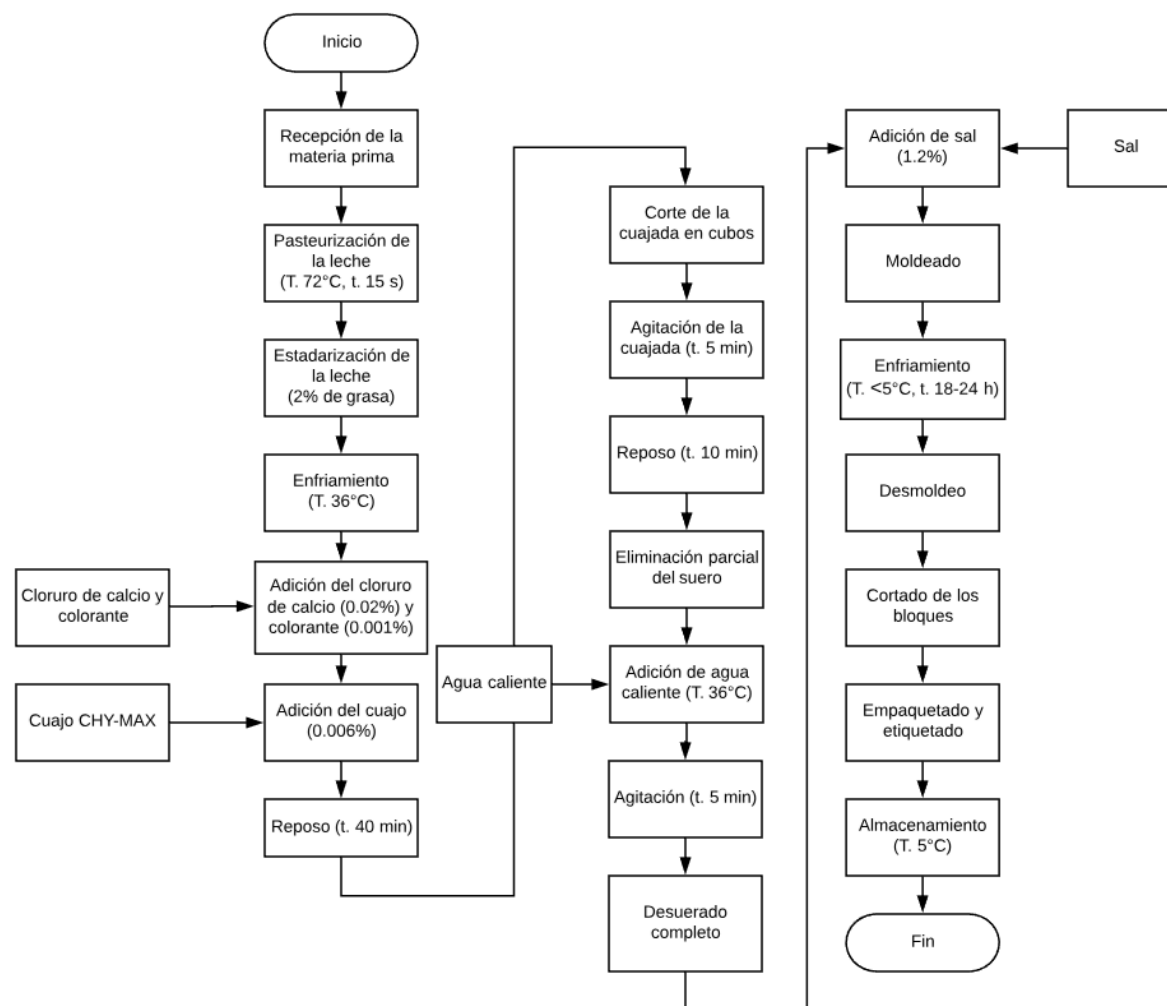
UNA: Universidad Nacional.

UTN: Universidad Técnica Nacional.

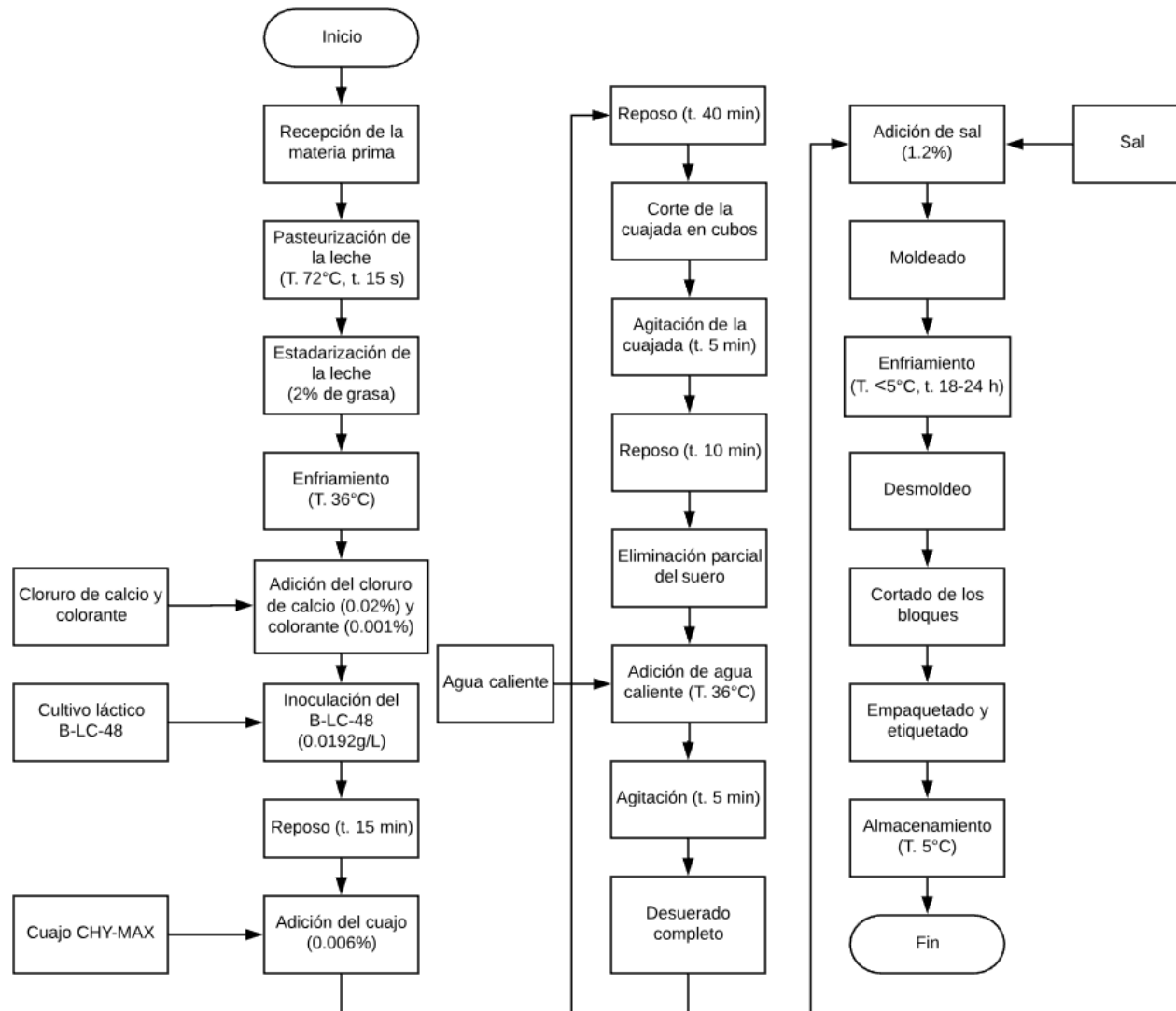
vs: Versus sinónimo de comparativo.

VIII. APÉNDICES

Apéndice 1. Procedimiento de elaboración del queso fresco sin el cultivo B-LC-48 en la planta de lácteos



Apéndice 2. Procedimiento de elaboración del queso fresco con el cultivo B-LC-48 en la planta de lácteos.



Descripción del proceso realizado en la planta de lácteos

Tanto para el queso sin cultivo como con el queso con cultivo se realizó el mismo proceso de producción, pero con la excepción del paso 6 y 7 que solo se ejecutaron con el QCC.

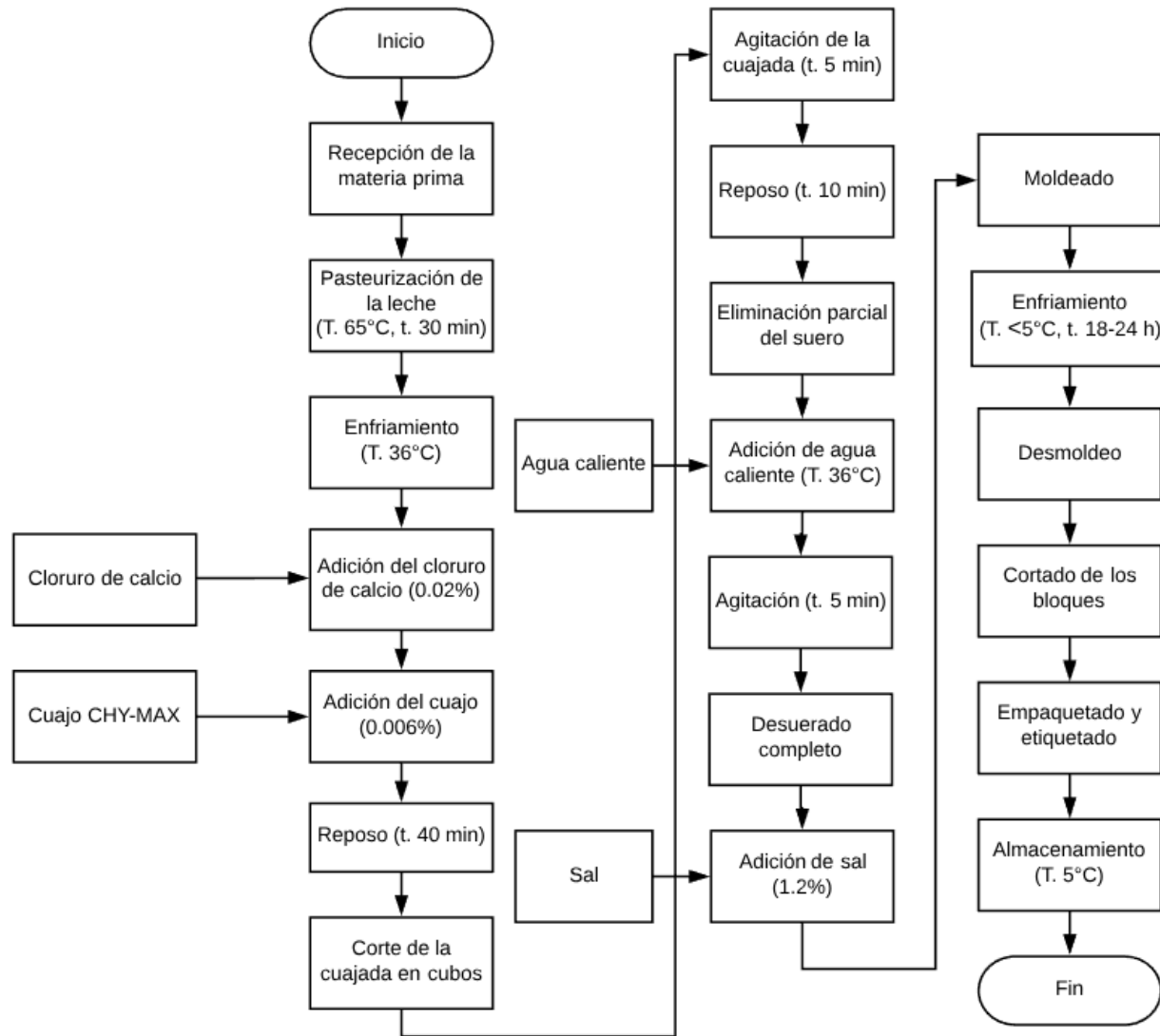
- 1. Recepción de la materia prima:** La leche es transportada por medio de tubería desde el tanque de almacenamiento de la lechería hasta la planta de proceso, la cual es introducida al pasteurizador.
- 2. Pasteurización de la leche:** Se realiza en un pasteurizador de placas previamente limpio y desinfectado a una temperatura de 72°C durante 15 segundos.
- 3. Estandarización de la leche:** Una vez pasteurizada la leche, se ajusta el contenido de grasa a un 2 % en la descremadora limpia y desinfectada, para lo cual se realiza un análisis de la misma con el método de Gerber. La leche descremada se va colocando directamente a las tinas que se van a utilizar para producir el queso.
- 4. Enfriamiento:** Se ajusta la temperatura de la leche a 36°C para lo cual se utiliza un termómetro digital. En algunas ocasiones si la temperatura estaba más baja, se procedía a inyectar vapor a la chaqueta de la tina para calentar y conseguir la temperatura deseada.
- 5. Adición del cloruro de calcio y el colorante:** Se disuelve el CaCl_2 al 0,02 % previamente pesado en un recipiente con poca agua a temperatura ambiente, luego se agrega a la leche y se agita uniformemente. Luego se mide el colorante Cheese color-double de CHR Hansen a una concentración 0,001 % y se agrega a la leche agitando para homogenizar.
- 6. Adición del cultivo B-LC-48:** Para agregar una alícuota homogénea, se tuvo que mezclar un paquete completo del cultivo (25 g) en 1,3 L de leche pasteurizada y agregar 1 mL por cada litro de leche que se estaba utilizando para la producción. En este caso se agregó 60 mL y para el tercer lote 150 mL del concentrado bacteriano (unos $6,15 \times 10^8$ UFC/ mL).

7. **Reposo del cultivo:** Se deja estabilizar el cultivo en la leche por unos 15 minutos antes de agregar el cuajo.
8. **Adición del cuajo:** Se agrega a una concentración de 0,006 % y se mezcla vigorosamente para distribuirlo en toda la leche.
9. **Reposo:** Se deja reposando la leche con el cuajo durante 40 minutos.
10. **Corte de la cuajada:** Para el corte de la cuajada se utilizó 2 liras de acero inoxidable limpias y desinfectadas. La primera que se utilizó fue la vertical desplazándola a lo largo y lo ancho de la tina al igual que la lira horizontal hasta obtener cubos de 1 cm² aproximadamente.
11. **Agitación de la cuajada:** Se realiza una agitación suave por 5 minutos con una paleta de acero inoxidable formando un ocho con el movimiento de la paleta. Se debe mantener la temperatura de la cuajada a 36°C y dicha agitación no se realizó ni rápida ni fuerte para evitar pérdidas en el rendimiento.
12. **Reposo:** Una vez finalizada la agitación se deja reposar durante 10 minutos para que el suero se libere lentamente de la cuajada.
13. **Eliminación parcial del suero:** Aproximadamente a un 50 % hasta el nivel de la cuajada. Dicho proceso se realizó abriendo la llave inferior de la tina y con ayuda de un colador se recuperan trozos de la cuajada.
14. **Adición de agua caliente:** Se reincorpora el 25 % del suero eliminado con agua a temperatura de 36°C, con el fin de ajustar la temperatura, diluir la lactosa y ácidos en la cuajada.
15. **Agitación:** Se realiza durante 5 minutos de forma vigorosa hasta obtener la textura deseada.
16. **Desuerado completo:** Se elimina casi al 100 % del suero de la cuajada abriendo la llave inferior de la tina y con ayuda de un colador se recuperan trozos de la cuajada.
17. **Adición de sal:** Se agrega la sal al 1,2 % de concentración (con respecto a la cantidad de leche inicial) de forma uniforme a lo largo y ancho de la tina, luego se mezcla con ayuda de la paleta de acero inoxidable.
18. **Moldeado:** Se coloca la cuajada en moldes cuadrados de acero inoxidable de 5 kg de capacidad, los cuales previamente se les colocó mallas para facilitar la

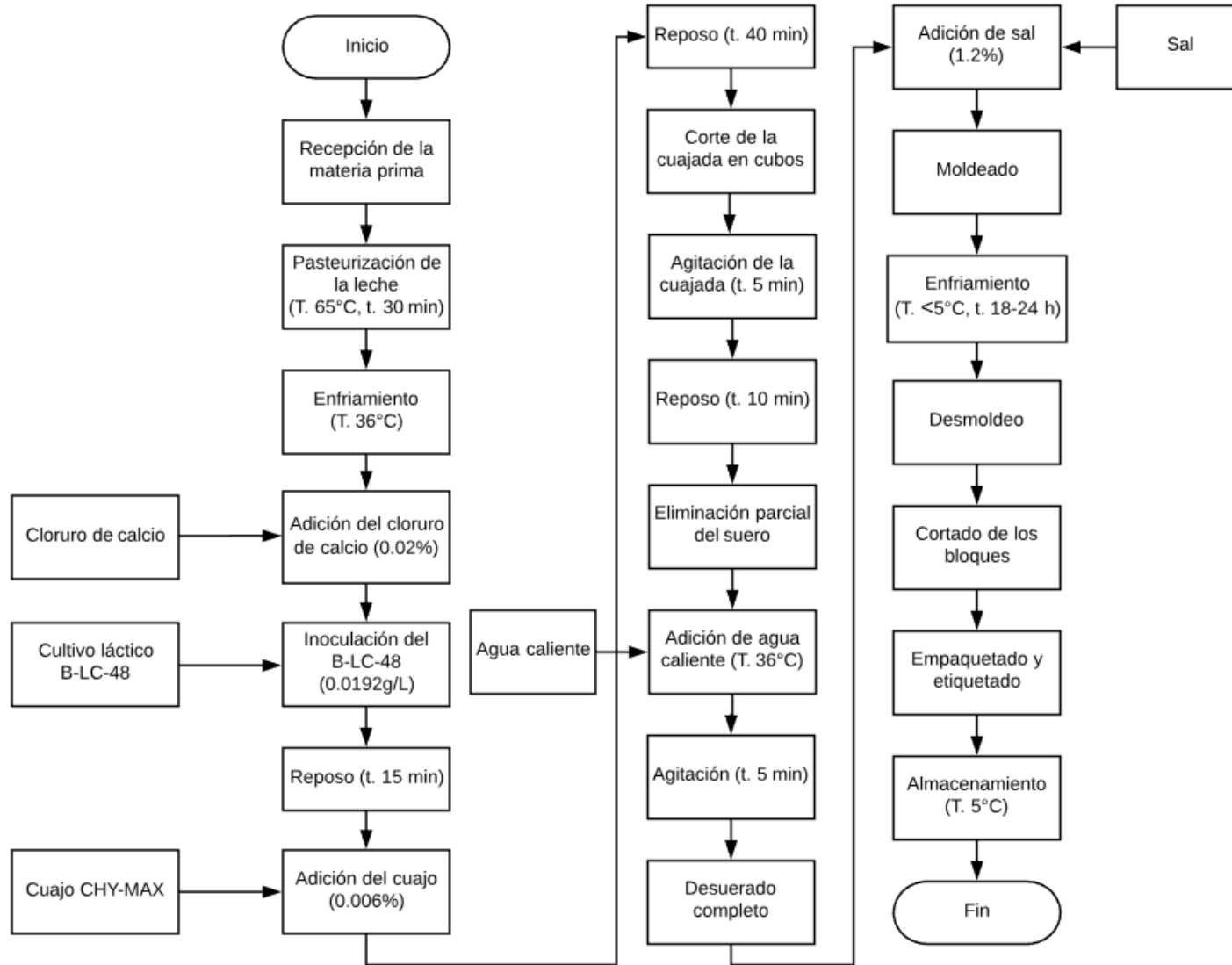
expulsión del suero y dar forma al queso. Se dejaron reposar aproximadamente 10 minutos sobre la mesa de acero inoxidable y luego se les dio vuelta para conseguir una forma homogénea en ambos lados.

- 19. Enfriamiento:** Seguidamente, los moldes se colocan en bandejas limpias y desinfectadas para que terminen de desueran y tomen forma, los cuales se colocan dentro de una cámara de frío a una temperatura de $<5^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas.
- 20. Desmoldeo:** Al día siguiente se sacan los quesos de la cámara de frío y de los moldes para dar paso a cortarlos.
- 21. Cortado de los bloques:** En una mesa limpia y desinfectada, se cortan los bloques de queso en trozos de 250 g aproximadamente y se colocan en bolsa de polietileno de baja densidad.
- 22. Empaquetado y etiquetado:** Se colocan todas las bolsas en la cámara de empaque al vacío para terminarlos de empacar y sellar. Se les coloca la etiqueta que los identifica como un queso sin cultivo o con cultivo y la fecha de producción.
- 23. Almacenamiento:** Finalmente, se transportan los quesos en hieleras con hielo y se almacenan en una cámara de frío a una temperatura de $<5^{\circ}\text{C}$.

Apéndice 3. Procedimiento de elaboración del queso fresco sin el cultivo B-LC-48 en el laboratorio.



Apéndice 4. Procedimiento de elaboración del queso fresco con el cultivo B-LC-48 en el laboratorio.



Descripción del proceso realizado en el laboratorio

Tanto para el queso sin cultivo como con el queso con cultivo se realizó el mismo proceso de producción, pero con la excepción del paso 5 y 6 que solo se ejecutaron con el QCC.

- 1. Recepción de la materia prima:** La leche cruda refrigerada es transportada de una planta productora de lácteos hacia el laboratorio en una lechera de 40 L de capacidad.
- 2. Pasteurización de la leche:** Se realiza en tandas de 7,5 L distribuidos en 3 Thermomixes® limpios y desinfectados a una temperatura de 65°C durante 30 minutos. Una vez pasteurizada la leche, se agregaba a la tina donde se iba a producir el queso fresco.
- 3. Enfriamiento:** Se ajusta la temperatura de la leche a 36°C para lo cual se utilizaron baños fríos a una parte de la leche y se verificaba con ayuda de un termómetro.
- 4. Adición del cloruro de calcio:** Se disuelve el CaCl_2 al 0,02 % previamente pesado en un recipiente con poca agua a temperatura ambiente, luego se agrega a la leche y se agita uniformemente.
- 5. Adición del cultivo B-LC-48:** Para agregar una alícuota homogénea, se tuvo que mezclar un paquete completo del cultivo (25 g) en 1,3L de leche pasteurizada y agregar 1 mL por cada litro de leche que se estaba utilizando para la producción. En este caso se agregó 60 mL y para el tercer lote 150 mL del concentrado bacteriano (unos $6,15 \times 10^8$ UFC/ mL).
- 6. Reposo del cultivo:** Se deja estabilizar el cultivo en la leche por unos 15 minutos antes de agregar el cuajo.
- 7. Adición del cuajo:** Se agrega a una concentración de 0,006 % y se mezcla vigorosamente para distribuirlo en toda la leche.
- 8. Reposo:** Se deja reposando la leche con el cuajo durante 40 minutos.
- 9. Corte de la cuajada:** Para el corte de la cuajada se utilizó 2 liras de acero inoxidable limpias y desinfectadas. La primera que se utilizó fue la vertical

desplazándola a lo largo y lo ancho de la tina al igual que la lira horizontal hasta obtener cubos de 1 cm² aproximadamente.

- 10. Agitación de la cuajada:** Se realiza una agitación suave por 5 minutos con una paleta de silicón formando un ocho con el movimiento de la paleta. Se debe mantener la temperatura de la cuajada a 36°C y dicha agitación no se realizó ni rápida ni fuerte para evitar pérdidas en el rendimiento.
- 11. Reposo:** Una vez finalizada la agitación se deja reposar durante 10 minutos para que el suero se libere lentamente de la cuajada.
- 12. Eliminación parcial del suero:** Aproximadamente a un 50 % hasta el nivel de la cuajada. Dicho proceso se realizó abriendo la llave inferior de la tina y con ayuda de un colador se recuperan trozos de la cuajada.
- 13. Adición de agua caliente:** Se reincorpora el 25 % del suero eliminado con agua a temperatura de 36°C, con el fin de ajustar la temperatura, diluir la lactosa y ácidos en la cuajada.
- 14. Agitación:** Se realiza durante 5 minutos de forma vigorosa hasta obtener la textura deseada.
- 15. Desuerado completo:** Se elimina casi al 100 % del suero de la cuajada abriendo la llave inferior de la tina y con ayuda de un colador se recuperan trozos de la cuajada.
- 16. Adición de sal:** Se agrega la sal al 1,2 % de concentración (con respecto a la cantidad de leche inicial) de forma uniforme a lo largo y ancho de la tina, luego se mezcla con ayuda de la paleta.
- 17. Moldeado:** Se coloca la cuajada en moldes redondos de plástico de 1 kg de capacidad, los cuales previamente se les colocó mallas para facilitar la expulsión del suero y dar forma al queso. Se dejaron reposar aproximadamente 10 minutos sobre una bandeja de acero inoxidable con hoyos y luego se les dio vuelta para conseguir una forma homogénea en ambos lados.
- 18. Enfriamiento:** Seguidamente, los moldes en la bandeja se colocan dentro de una cámara de frío a una temperatura de <5°C durante 18-24 horas para que terminen de desueran y tomen forma.

- 19. Desmoldeo:** Al día siguiente se sacan los quesos de la cámara de frío y de los moldes para dar paso a cortarlos.
- 20. Cortado de los bloques:** En una mesa limpia y desinfectada, se cortan los bloques de queso en trozos entre 500 y 300 g aproximadamente y se colocan en bolsa de polietileno de baja densidad.
- 21. Empaquetado y etiquetado:** Se sellan todas las bolsas con ayuda de una empacadora al vacío y una selladora térmica. Se les coloca la etiqueta que los identifica como un queso sin cultivo o con cultivo y la fecha de producción.
- 22. Almacenamiento:** Finalmente, se transportan los quesos en hieleras con hielo y se almacenan en una cámara de frío a una temperatura de $<5^{\circ}\text{C}$.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Instrumentos y desarrollo de algunas etapas del proceso de análisis.



Figura 14. Horno de convección forzada modelo DK-500 y la balanza analítica modelo AS220.R2.

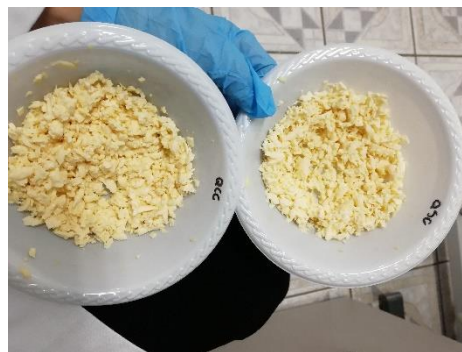


Figura 15. QSC y QCC rallados para realizar la prueba de humedad.

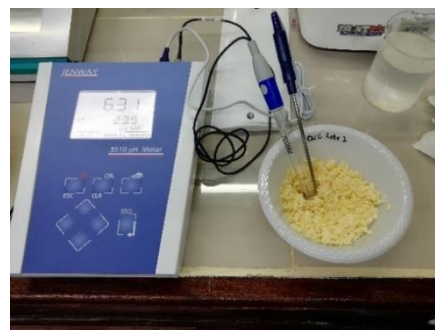


Figura 16. Análisis de pH de los quesos.

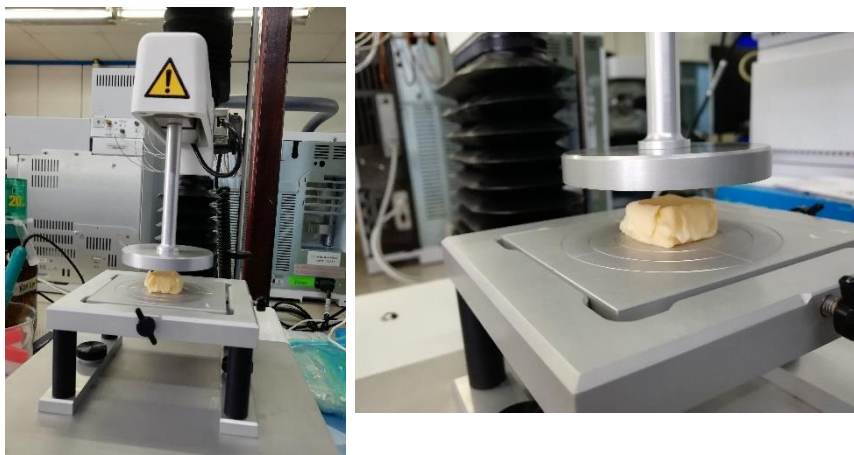


Figura 17. Texturómetro marca Stable Micro Systems modelo TA.XT Plus.

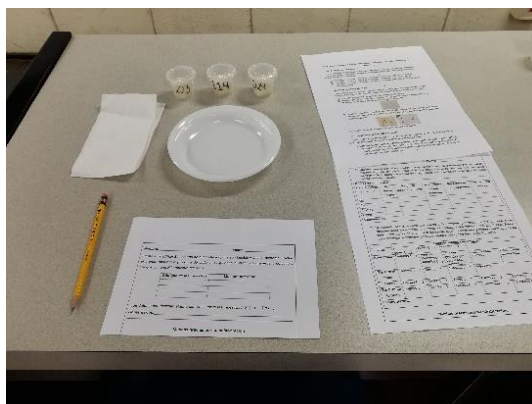


Figura 18. Materiales entregados a los panelistas para el análisis sensorial.



Figura 19. Cubículos del aula de tecnología de alimentos de la UTN.



Figura 20. Evaluación sensorial en el laboratorio de docencia de la UNA.

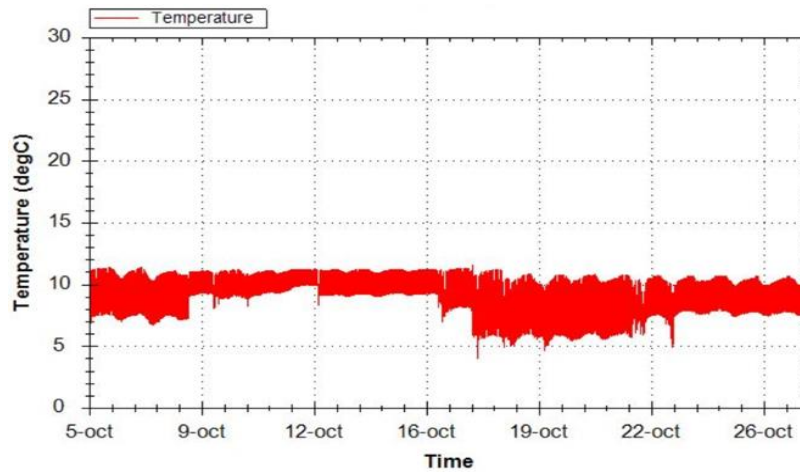


Figura 21. Gráfico de monitoreo de la temperatura de almacenamiento de los lotes 1 y 2.

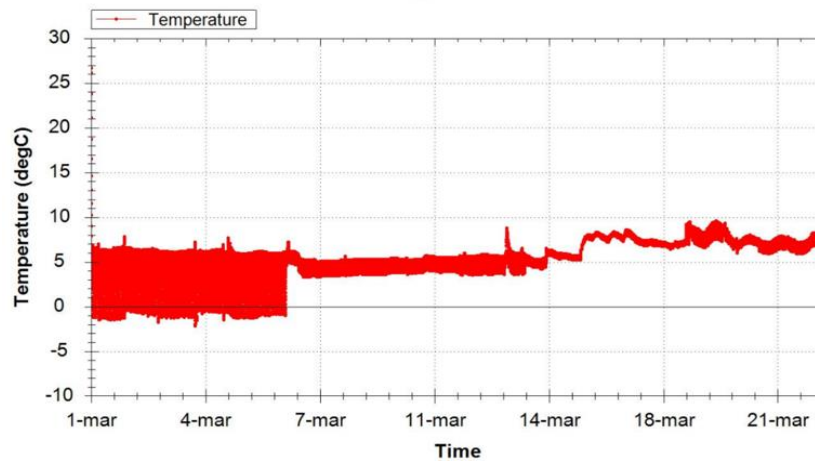


Figura 22. Gráfico de monitoreo de la temperatura de almacenamiento de los quesos producidos en el laboratorio.

Anexo 2. Cuestionarios para participar en el panel sensorial.

Nombre: _____ Fecha: _____

Edad: _____ Sexo: F () M ()

1- ¿Sabe usted qué es un panel sensorial? SI () NO () Pase a la pregunta 3

2- ¿Le gustaría formar parte de un panel sensorial? Pase a la pregunta 4

SI () NO ()

3- Le gustaría ser un evaluador de alimentos? SI () NO ()

4- ¿Es alérgico o intolerante a los lácteos? SI () ¿Cuál(es)? _____ NO ()

5- ¿Consume frecuentemente quesos? SI () NO ()

¿Qué tipo? ¿Y qué tan frecuente? _____.

6- ¿Es usted fumador(a)? SI () NO ()

7- ¿Toma algún medicamento que influya en sus sentidos del olfato, vista y/o gusto?

SI () ¿Cuál(es)? _____ NO ()

8- ¿Padece alguna de las siguientes enfermedades?

Daltonismo: SI () NO () Problemas respiratorios: SI () NO ()

Sinusitis: SI () NO () Hipertensión: SI () NO ()

Rinitis: SI () NO () Otra: _____.

9- ¿Tiene alguna lesión, perforación o está llevando algún tratamiento en la boca?

SI () NO ()

10- ¿Se considera usted una persona ordenada? SI () NO ()

11- ¿Le gusta ser una persona analítica? SI () NO ()

12- ¿Le agrada seguir instrucciones y cumplirlas? SI () NO ()

¡MUCHAS GRACIAS!

Anexo 3. Guía de características sensoriales para la evaluación de queso fresco.

a) Características olfativas

Para realizar dicho análisis se debe destapar el envase y oler de inmediato colocando la nariz cerca de la muestra e inhalando profundamente, luego identifique el tipo de olor los cuales son:

- 1) Olor lácteo: Olor que recuerda a la leche fresca, pura, recién ordeñada.
- 2) Olor ácido: Olor a queso acidificado por almacenamiento prolongado.
- 3) Olor dulce: Olor que recuerda a la leche cocinada, produciéndose una ligera caramelización.

b) Características visuales

Se debe observar el cubo detenidamente y en todas sus superficies, luego evaluar e identificar el tipo de características visuales que pueda detectar como:

- 1) Húmedo: Presencia de agua en la superficie del queso.
- 2) Huecos pequeños amorfos: Presencia de pocos huecos pequeños y sin forma en cualquiera de las caras del cubo de queso.



- 3) Huecos grandes o pequeños redondos: Presencia de muchos huecos pequeños-redondos y/o grandes sin forma en cualquiera de las caras del cubo de queso.



- 4) Color: Debe ser blanco crema o crema amarillento.

c) Características táctiles en mano

Esta evaluación se realiza a través del sentido del tacto, por lo que se debe efectuar diferentes acciones e identificar si el queso está:

- 1) Baboso: Queso que se adhiere al presionar la pasta dejando una sensación resbalosa. Para ello se debe deslizar el dedo índice sobre la superficie del queso y determinar si se adhiere ligeramente mientras realiza el movimiento dejando una sensación babosa.
- 2) Duro: No se deforma fácilmente la superficie del queso al presionar con el dedo.
- 3) Elástico: El queso regresa a su forma original luego de deformar la superficie por medio de la presión ejercida por el dedo índice.
- 4) Húmedo: Cuando se presiona con el dedo índice y sale suero del bloque.

Para estas últimas 3 características se debe realizar presionando con el dedo índice la cara superior de la muestra provocando una deformación de 1/3 de la altura de la muestra aproximadamente y medir el grado de dificultad para generar dicha deformación, el grado de recuperación de su forma original y la cantidad de suero liberado.

d) Características gustativas

Se debe probar la muestra y evaluar la intensidad de los diferentes sabores que se detallan a continuación:

- 1) Salado: Sabor a sal.
- 2) Dulce: Sabor que recuerda a la leche cocinada al provocarse la caramelización.
- 3) Ácido: Sabor a suero acidificado.
- 4) Crema: Sabor que recuerda a la crema láctea.
- 5) Rancio: Sabor a grasa láctea añeja.

e) Características táctiles en boca

Se detectan a través del sentido del tacto al masticar, por lo cual se pueden detectar las siguientes características:

- 1) Duro: Muy resistente al colocar y cortar la mitad de la muestra con los dientes frontales.
- 2) Jugoso: Luego de masticar la muestra con las muelas, medir después del segundo mordisco el grado de humedad que tienen los trocitos de la muestra.
- 3) Huloso: Luego de masticar la muestra con las muelas, medir la sensación de morder un hule y el sonido plástico generado por la muestra.
- 4) Grumoso: Sensación bucal generado al masticar el queso y, antes de tragar, percibir la forma de pedacitos de muestra y no de pasta.
- 5) Cremoso: Queda una sensación grasosa en el cielo de la boca y la lengua después de tragar.

Nota: Comparar entre ambos tipos de quesos las diferentes características sensoriales y tratar de detectar alguna diferencia entre ambos. Dicha guía está basada en lo establecido por Fallas-Rodríguez (2015).

Anexo 4. Prueba triangular

Nombre: _____ **Fecha:** _____.

Frente a usted hay 3 muestras de queso fresco, dos son iguales y una es diferente. Evalúe el aroma, apariencia y textura de cada una siguiendo el orden de izquierda a derecha y marque con una **X** la muestra diferente.

Códigos de las muestras	Muestra diferente

¿Se detecta con facilidad alguna diferencia entre las muestras? Si () No ()

Comentarios: _____.

Muchas gracias por su colaboración

Anexo 5. Prueba de escala hedónica para el QCC producido en el laboratorio.

Nombre: _____ Fecha: _____.

- 1) Observe, analice y pruebe la muestra de queso fresco que se le presenta a continuación. Indique el grado en que le gusta o le desagrade marcando con una X en la casilla correspondiente debajo de la frase que mejor describa su opinión sobre las características sensoriales de la muestra.

Código de la muestra:

Característica sensorial	Me gusta mucho	Me gusta moderadamente	Ni me gusta ni me disgusta	Me disgusta moderadamente	Me disgusta mucho
Olor					
Color					
Textura					
Sabor					

Comentarios:

- 2) De acuerdo con el análisis que realizó anteriormente, por favor marque con una X las características sensoriales que mejor se ajustan a las sensaciones percibidas. Puede seleccionar varias de una misma categoría, si así lo considera y puede utilizar la guía de características sensoriales para la evaluación de queso fresco.

	Características sensoriales				
Olor	Lácteo ()	Ácido ()	Dulce ()		
Apariencia	Húmedo ()	Huecos Pequeños amorfos ()	Huecos grandes y/o pequeños redondos ()	Color blanco crema ()	Color crema amarillento ()
Textura al tacto	Baboso ()	Duro ()	Elástico ()	Húmedo ()	
Sabor	Salado ()	Dulce ()	Ácido ()	Crema ()	Rancio ()
Textura en la boca	Jugoso ()	Duro ()	Huloso ()	Grumoso ()	Cremoso ()

Comentarios:

Muchas gracias por su colaboración

Anexo 6. Análisis microbiológicos

Los resultados de los análisis microbiológicos para el día 1 después de la producción de los tres primeros lotes se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Resultados microbiológicos del día 1 en ambos tipos de queso.

Análisis	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
	QSC	QCC	QSC	QCC	QSC	QCC
<i>Pseudomonas</i>						
<i>aeruginosa</i> (NMP/g)	2,8x10 ²	2,0x10 ²	1	2,8x10 ²	7,1x10 ³	7,0x10 ²
Enterobacteriaceae						
(UFC/g)	6,5x10 ³	3,4x10 ³	1,1x10 ³	1,8x10 ³	4,1x10 ⁵	2,8x10 ³
Bacterias lácticas						
(UFC/g)	2,1x10 ²	1,5x10 ³	9,1x10 ⁴	1,6x10 ⁶	6,0x10 ³	1,2x10 ⁴
<i>E. coli</i> (UFC/g)	5,8x10 ³	3,1x10 ³	1,1x10 ³	1,8x10 ³	1,9x10 ³	2,5x10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>						
(UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
<i>Listeria monocytogenes</i>						
/25g	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Salmonella sp.</i> /25g	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Los tres lotes y los 2 tipos de quesos salieron contaminados con coliformes fecales (*E. coli*) y por ello casi que la misma cantidad se ve reflejado en el total del grupo de las enterobacterias. Además, todos también tenían la presencia de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. En el caso de las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella sp.*, no estuvieron presentes en ninguno de los quesos. En el caso de las bacterias lácticas, se ve un número mayor en el QCC de todos los lotes, lo cual es lo esperado por la inoculación del cultivo de *Lactobacillus curvatus*.

En los días 8 y 15 de vida útil de los lotes 1 y 2, se monitoreó el crecimiento de las bacterias lácticas, la *Pseudomonas aeruginosa* y la *E. coli*. En el caso de las pseudomonas la mayoría de los resultados tendieron a disminuir con el tiempo, solo el QSC tuvo un conteo mayor el día 15 del lote 2 (ver tabla 3).

Tabla 3. Monitoreo de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* a través de la vida útil del queso fresco.

Lote 1			
Tipo de queso/día	Día 1	Día 8	Día 15
QSC	2,8x10 ² NMP/g	0 NMP/g	0 NMP/g
QCC	2,0x10 ² NMP/g	1,7x10 ² NMP/g	0 NMP/g
Lote 2			
QSC	1 NMP/g	0 NMP/g	2x10 ¹ NMP/g
QCC	2,8x10 ² NMP/g	0 NMP/g	0 NMP/g

En el caso del lote 1 las bacterias lácticas se observan en cantidad y crecimiento igual en ambos quesos, aunque se haya inoculado más bacterias en el QCC. Lo mismo se observa en el lote 2 (ver tabla 4), lo cual deja en duda lo que sucedió específicamente con la bacteria inoculada y su acción contra las otras poblaciones microbianas al no tener el conocimiento de si la población de *L. curvatus* creció, se mantuvo o decreció su población con el tiempo, ya que no se contaba con los recursos tecnológicos para realizar dicho monitoreo, y por ello su efecto se viera influenciado por la cantidad de UFC en el queso.

Realizando un análisis comparativo en ambos lotes las bacterias *E. coli* estaban en 10³ y pasaron a 10⁶ al día 15 de almacenamiento, por lo cual no se vio afectadas sus poblaciones por el cultivo B-LC-48 (ver tabla 4).

Tabla 4. Monitoreo de las BAL y *E. coli* a través de la vida útil del queso fresco del lote 1 y 2.

	Lote 1 QSC		Lote 1 QCC	
	BAL (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	BAL (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)
Día 1	$2,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$
Día 8	$1,4 \times 10^2$	$7,1 \times 10^4$	$1,4 \times 10^2$	$1,1 \times 10^5$
Día 15	$4,6 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	$5,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$
	Lote 2 QSC		Lote 2 QCC	
	BAL (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	BAL (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)
Día 1	$9,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	$1,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^3$
Día 8	$9,3 \times 10^5$	$7,1 \times 10^4$	$8,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
Día 15	$5,9 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6$	$8,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$

Anexo 7. Carta de constancia en la acreditación de los análisis microbiológicos realizados por Laboratorio SupliLab.



08 de Noviembre del 2018

A QUIEN INTERESE

El suscrito Mario Chaves Villalobos, código 542, en calidad de Director de Laboratorio SupliLab, código SJ 165 del Colegio de Microbiólogos, hago constar que cuenta con ensayos acreditados bajo la norma INTE-ISO/IEC 17025:2005, en una amplitud descrita en el alcance (www.eca.or.cr), en el cual se encuentran las matrices de agua, alimentos, superficies, entre otros.

Dada a solicitud del interesado en San José a los 8 días del mes de noviembre del 2018.


Doctor Mario Chaves
Director

Carta de aprobación filológica

San José, 10 de junio de 2019

Señores

Universidad Técnica Nacional

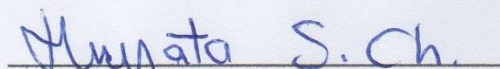
Sede Atenas

Estimados señores:

He revisado y corregido en todos los extremos filológicos: la redacción, la ortografía, la puntuación, la morfología, la sintaxis y los vicios del trabajo titulado **“Evaluación del efecto biopreservante de la bacteria *Lactobacillus curvatus* B-LC-48 en el queso fresco”**, presentado por la estudiante Daniela Arce Herrera, para optar por el grado académico de **Licenciatura en Ingeniería en Tecnología de Alimentos**.

Con las correcciones realizadas en este trabajo de investigación, este es un documento con valor filológico y cumple con los requisitos necesarios para ser presentada ante las autoridades universitarias correspondientes.

Atentamente,



Margarita Sirlene Chaves Bonilla

Filóloga

Cédula # 2 0717 0620

Carné afiliado # 83791 “COLYPRO”

