



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE  
CUAJADA CHEDDARIZADA Y SU EFECTO COMO MÉTODO  
DE CONSERVACIÓN EN QUESO CHIHUAHUA**

---

Por:

**Nidia Aracely Chacón Flores**

TESIS APROBADA POR LA:

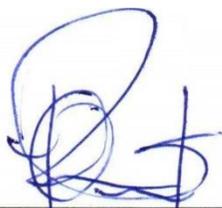
COORDINACIÓN DE FISIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE LA ZONA  
TEMPLADA

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

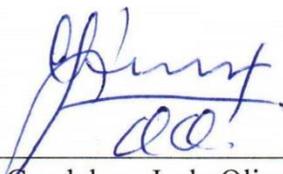
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Nidia Aracely Chacón Flores, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de doctora en Ciencias.



---

Dr. David Roberto Sepúlveda Ahumada  
Director de Tesis



---

Dra. Guadalupe Isela Olivas Orozco  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Carlos Horacio Acosta Muñiz  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Néstor Gutiérrez Méndez  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Cambios en la Estructura y Composición de Cuajada Cheddarizada y su Efecto como Método de Conservación en Queso Chihuahua" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Nidia Aracely Chacon Flores, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Graciela Caire Juvera", written over a horizontal line.

Dra. Graciela Caire Juvera  
Directora General

## **AGRADECIMIENTOS**

A Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), por el apoyo prestado durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Coordinación Cuauhtémoc por concederme la oportunidad de formar parte del programa de Maestría en Ciencias.

A mi equipo de trabajo liderado por el Dr. David Sepúlveda Ahumada, Dra. Isela Olivas Orozco y al Dr. Carlos Horacio Acosta Muñoz, Dr. Néstor Gutiérrez Méndez por su consejo, orientación, conocimiento y gran apoyo brindado durante este proceso compartido

A todo el personal del CIAD-Cuauhtémoc por brindarme sus conocimientos, apoyo y disponibilidad en cada momento.

A Luis Raúl, tus consejos y cariño me dieron la fortaleza para terminar con este proyecto.

## **DEDICATORIA**

Primeramente, a Dios, por guiarme a lo largo de mi vida, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad y por brindarme una vida con amor, aprendizaje, experiencias y felicidad.

A Luis Raúl, gracias por tu amor, paciencia, comprensión y bondad, me inspiras a ser mejor cada día.

Ainara y Melissa mis pequeñas princesas, gracias por el amor, alegría que me regalan a diario, las amo.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>CONTENIDO</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	8
<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. SINOPSIS</b> .....	13
1.1. Justificación.....	13
1.2. Antecedentes.....	13
1.3. Hipótesis .....	15
1.4. Objetivo General.....	15
1.5. Objetivos Específicos .....	16
1.6. Sección integradora del trabajo .....	16
<b>2. FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO DE MICRORGANISMOS     BENÉFICOS Y PATÓGENOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS</b> .....	18
<b>3. PROCESO DE MANUFACTURA DEL QUESO COMO MÉTODO DE     CONSERVACIÓN DE LA LECHE</b> .....	73
<b>4. EFFECT OF WATER ACTIVITY, PH, AND LACTIC ACID BACTERIA TO     INHIBIT <i>Escherichia coli</i> DURING CHIHUAHUA CHEESE MANUFACTURE</b> .....	91
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	103
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	104

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Estructura de la micela de caseínas. ....	23
2. Protocolo general para la fabricación de queso (Fox, <i>et al.</i> , 2000) .....	37
3. Diagrama general del proceso de elaboración del queso Chihuahua .....	45

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
1. Supervivencia de <i>E. coli</i> durante la elaboración de queso .....	15
2. Composición química de la leche de diferentes razas de vacas (%).....	19
3. Grupos microbianos de leche asociados a la producción de queso (adaptado de Cécile, 2011).....	46
4. Contenido de aw en alimentos .....	64
5. Valores de Aw para el crecimiento de microorganismos.....	65
6. Rangos de pH para el crecimiento de bacterias .....	68

## RESUMEN

La leche es un producto conocido por su alto valor nutricional, sin embargo, al igual que otros alimentos, puede provocar enfermedades. Los peligros microbiológicos son un importante problema de inocuidad de los alimentos en el sector lechero porque la leche es un medio ideal para el crecimiento de bacterias y otros microbios. Estos se pueden introducir en la leche a partir del medio ambiente o los mismos animales lecheros.

Afortunadamente también tenemos la microflora láctica que constituye microorganismos benéficos (bacterias ácido lácticas), que tienen numerosas ventajas, entre ellas se encuentra el aportar a la leche y sus derivados cualidades nutricionales y tecnológicas, así como la inhibición de microorganismos de deterioro. Adicionalmente existen otros factores que ayudan a disminuir el crecimiento de microorganismos, entre ellos se encuentran la actividad acuosa, el contenido de sal, el potencial redox, el pH, así como los ácidos orgánicos, los nitratos y la temperatura.

Diversos autores han estudiado la modificación de estos factores para controlar la proliferación de *E. coli* y durante el proceso de manufactura de diferentes variedades de queso. Encontraron que la proliferación de *E. coli* en leche y productos lácteos se da en las primeras etapas de elaboración y dependiendo de las condiciones de proceso puede ser mitigada, aunque en general se observa que una vez que la población bacteriana alcanza altas concentraciones, resulta difícil impedir su presencia continuada durante el almacenamiento (Adhikari *et al.*, 2018; Govaris, Papageorgiou, & Papatheodorou, 2002; Kornacki & Marth, 1982; Lekkas *et al.*, 2006; Leuschner & Boughtflower, 2002; Peng *et al.*, 2013; Raeisi *et al.*, 2012; Rash & Kosikowski, 1982; Schlessner *et al.*, 2006; Wahi, Bansal, Ghosh, & Ganguli, 2006).

Conocer la capacidad de los factores estudiados para inhibir el desarrollo microbiano, nos permite entender mejor como interactúan en procesos reales, no se conoce a gran detalle lo que cada uno de estos factores por separado y en conjunto tiene para producir estos efectos de inhibición.

El propósito de presente trabajo es evaluar la capacidad de cada uno de estos factores, de manera

individual o sinérgica para inhibir el crecimiento de *E. coli*; por este motivo se desarrolló un estudio que nos permitió crear un alimento modelo para controlar la actividad acuosa, el pH y la presencia de bacterias ácido lácticas, con el objetivo de cuantificar los efectos de cada uno de estos factores dentro de un proceso simulado de producción de productos lácteos.

**Palabras clave:** Queso, patógenos, pH, Actividad acuosa, bacterias ácido lácticas.

## ABSTRACT

Milk is a product known for its high nutritional value, however, like other foods, it can cause diseases. Microbiological hazards are a major food safety issue in the dairy sector because milk is an ideal medium for the growth of bacteria and other microbes. These can be introduced into milk from the environment or the dairy animals themselves.

Fortunately, we also have the lactic microflora that constitutes beneficial microorganisms (lactic acid bacteria), which have numerous advantages, among them is providing nutritional and technological qualities to milk and its derivatives, as well as inhibiting spoilage microorganisms. Additionally, there are other factors that help reduce the growth of microorganisms, including aqueous activity, salt content, redox potential, pH, as well as organic acids, nitrates and temperature.

Various authors have studied the modification of these factors to control the proliferation of *E. coli* and during the manufacturing process of different varieties of cheese. They found that the proliferation of *E. coli* in milk and dairy products occurs in the first stages of production and depending on the process conditions it can be mitigated, although in general it is observed that once the bacterial population reaches high concentrations, it is difficult prevent their continued presence during storage (Adhikari *et al.*, 2018; Govaris, Papageorgiou, & Papatheodorou, 2002; Kornacki & Marth, 1982; Lekkas *et al.*, 2006; Leuschner & Boughtflower, 2002; Peng *et al.*, 2013; Raesi *et al.*, 2012; Rash & Kosikowski, 1982; Schlessler *et al.*, 2006; Wahi, Bansal, Ghosh, & Ganguli, 2006).

Knowing the capacity of the factors studied to inhibit microbial development allows us to better understand how they interact in real processes. It is not known in great detail what each of these factors separately and together has to produce these inhibition effects.

The purpose of this work is to evaluate the capacity of each of these factors, individually or synergistically, to inhibit the growth of *E. coli*; For this reason, a study was developed that allowed

us to create a model food to control the aqueous activity, the pH and the presence of lactic acid bacteria, with the aim of quantifying the effects of each of these factors within a simulated production process. of dairy products.

**Key words:** Cheese, pathogens, pH, aqueous activity, lactic acid bacteria.

# 1. SINOPSIS

## 1.1. Justificación

La leche y sus derivados son alimento de alta demanda, ya que aporta nutrientes, agua, minerales, proteína y azúcares muy importantes para el organismo. Sin embargo, la leche cruda puede aportar bacterias peligrosas y estas bacterias pueden permanecer presentes durante el proceso de elaboración de productos lácteos. La pasteurización suele ser una forma eficaz para el control de los peligros microbiológicos, no obstante, malas prácticas de fabricación pueden facilitar una contaminación cruzada o la incorporación de patógenos de origen ambiental, adicionalmente existen algunos quesos que aun en la actualidad siguen elaborándose con leche sin pasteurizar. De aquí deriva la importancia de conocer las etapas de fabricación de queso, ya que algunas de estas modifican los llamados “obstáculos microbianos” que como su nombre lo indica nos ayudan a inhibir microorganismos indeseables y algunas de ellas adicionalmente nos ayudan a incrementar los microorganismos benéficos. En esta investigación se volvió relevante medir la eficiencia del proceso de fabricación como método para inhibir a microorganismos patógenos.

## 1.2. Antecedentes

La leche fresca es un producto perecedero, puede estar contaminado y necesita ser procesado, tanto para asegurar la calidad higiénico-sanitaria como para alargar la vida útil del producto. Estos tratamientos consisten en someter la leche a combinaciones adecuadas de tiempo y temperatura que no alteren la calidad organoléptica y nutricional de la leche de partida (Hernandez, 2010). Por ser un alimento muy completo, es un medio ideal para el crecimiento de microorganismos, que de no eliminarse podrían suponer un riesgo para los consumidores. Por lo tanto, si no se realizan los controles de calidad necesarios en los procesos de la industrialización, está puede ser un vehículo de enfermedades que pueden afectar a los consumidores (Gómez & Mejía, 2005).

Debido a su diversa composición química, la leche proporciona un medio especialmente adecuado para el crecimiento de bacterias. En este grupo se encuentran bacterias que se alimentan principalmente de proteínas, lactosa y grasas. Las actividades bioquímicas de cada uno de estos compuestos son proteolíticas, lipolíticas o lipolíticas, respectivamente (Keating & Gaona Rodríguez, 1986).

Las bacterias coliformes, llegan a la leche y subproductos por malas condiciones higiénicas. La temperatura óptima para su desarrollo es aproximadamente 37 °C. Las bacterias coliformes no forman esporas y se destruyen por pasteurización a temperatura baja, por lo que se emplean como indicadores de la higiene en el manejo de la leche después de este proceso (Keating & Gaona Rodríguez, 1986; Meyer, 1987). Se sabe que los productos lácteos contienen bacterias patógenas que son perjudiciales para la alimentación humana. Por contaminación humana, la leche puede contener microorganismos enteropatógenos como *Salmonella* y *Shigella* que son responsables de intoxicaciones alimentarias. El animal puede contaminar la leche con el bacilo tuberculoso bovino, bacilo de la fiebre de Malta y bacterias responsables de mastitis (Meyer, 1987).

Existen ciertos factores que controlan el crecimiento de microorganismos en el queso, estos incluyen la actividad del agua, la concentración de sal, el potencial de oxidación-reducción, el pH, el NO<sub>3</sub>, la temperatura y, quizás, la producción de bacteriocinas por algunos microorganismos. Estos factores se denominan "obstáculos". El efecto de los obstáculos individuales puede no ser significativo, pero todos ellos actuando juntos conducen a un control considerable. Otros compuestos producidos durante la fabricación y maduración de la cuajada, por ejemplo, el agua y los ácidos grasos, también inhiben el crecimiento microbiano, pero las concentraciones de estos producidos por los iniciadores en el queso no son lo suficientemente altas como para tener un efecto significativo sobre las bacterias (A. Hayaloglu, 2016).

En la Cuadro 1 se puede observar el crecimiento de *E. coli* durante la elaboración de queso. La prevalencia de este patógenos depende de las condiciones de proceso como temperatura, adición de antimicrobianos, adición de cultivo láctico, control de temperatura durante el proceso, operaciones adicionales según la variedad de queso (cheddarización, estiramiento de la cuajada, etc.).

**Cuadro 1.** Supervivencia de *E. coli* durante la elaboración de queso

<b>Tipo de queso</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Supervivencia</b>	<b>Autor y año</b>
Semiduro	<i>E. coli</i>	Viable 16 semanas	Peng, <i>et al.</i> , (2013)
Queso blanco (Fresco)	<i>E. coli</i>	Viable 4 semanas	Leucher, <i>et al.</i> , (2002)
Queso parner (Fresco)	<i>E. coli</i>	Viable 48 horas	Wahi, <i>et al.</i> , (2006)
Monterrey Cheddar (Semi duro)	<i>E. coli</i>	Viable 60 días	Adkari, <i>et al.</i> , (2018)
Cheddar (Semi duro)	<i>E. coli</i>	Indetectable 158 días	Reitsma, <i>et al.</i> , (1996)
Cheddar Gouda (Semi duro)	<i>E. coli</i>	Viable 270 días	D'amico, <i>et al.</i> , (2010)
Queso de cabra (Fresco)	<i>E. coli</i>	Viable 42 días	Vernozy, <i>et al.</i> , (2005)
Camembert (Fresco)	<i>E. coli</i>	Viable 20 días	Montet, <i>et al.</i> , (2009)
Mozzarella (Fresco)	<i>E. coli</i>	Inactivación total	Spano, <i>et al.</i> , (2003)
Quesos duros	<i>E. coli</i>	Higiénicamente seguros 1 semana	Johler, <i>et al.</i> , (2006)

### 1.3. Hipótesis

La cheddarización puede ayudar a disminuir microorganismos de deterioro durante la fabricación de queso Chihuahua.

### 1.4. Objetivo General

Medir la efectividad del proceso de manufactura de queso como método de conservación de la leche.

## 1.5. Objetivos Específicos

- 1) Caracterización del crecimiento de *E. coli* en leche líquida.
- 2) Medir la efectividad del proceso de cheddarizado.
- 3) Crear un experimento factorial en el cual se evalué el efecto conjunto de la actividad de agua y el pH sobre la inhibición del desarrollo de *E. coli* en cuajada de leche.

## 1.6. Sección Integradora del Trabajo

Este tema de investigación nos permitió analizar el comportamiento de *E. coli* durante el proceso de elaboración de queso, y analizar los factores que nos conducen a su inhibición.

Artículo I “Factores que afectan el crecimiento de microorganismos benéficos y patógenos en productos lácteos”, comenzamos por resaltar la importancia de la leche y sus derivados lácteos, pasamos a definir conceptos básicos sobre queso, su proceso de elaboración, microorganismos comunes en leche y en la producción de queso, proceso de fabricación como método de conservación, otro punto muy importante son los factores que afectan el crecimiento microbiano tales como; actividad de agua, sal, pH, temperatura, bacterias ácido lácticas, etcétera. Esta información es muy relevante para saber los factores que podemos modificar durante la elaboración de queso para provocar la inhibición de microorganismos indeseable, así como favorecer el crecimiento de microorganismo benéficos.

En el artículo 2 (review) “Proceso de manufactura del Queso como método de conservación de la leche”. El queso como un producto de alta calidad nutrimental, sin embargo, también es un alimento que puede contaminarse fácilmente durante su proceso de elaboración si no se toman las medidas adecuadas, ahora bien, es fácil suponer que este proceso también puede tener características que resultan beneficiosas al momento de inhibir microorganismos indeseables. El objetivo de esta revisión es analizar el proceso de fabricación de queso como método para inhibir

el crecimiento de microorganismos patógenos. Se observó la supervivencia de microorganismos indeseables durante la fabricación de queso durante varias etapas de proceso; adición de cultivo iniciador, adición de antimicrobianos, temperatura de cocción de la cuajada, temperatura de estiramiento de la cuajada, temperatura de almacenamiento y tiempo de almacenamiento. El proceso de manufactura de queso comprende una serie de operaciones unitarias que poseen el potencial de actuar como método de conservación, contribuyendo a asegurar la calidad microbiológica del queso. Algunas variedades de queso cuentan con ciertas operaciones que le dan ciertas características organolépticas y a su vez le permiten desarrollar microorganismos benéficos que ayudan al control de microorganismos indeseables.

Artículo 3 “Effect of Water Activity, pH, and Lactic Acid Bacteria to Inhibit *Escherichia coli* during Chihuahua Cheese Manufacture”. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la efectividad del control del pH, la actividad del agua y la adición de bacterias ácido lácticas sobre la proliferación de *Escherichia coli* en la cuajada durante la elaboración del queso Chihuahua. La leche demostró ser un excelente medio de cultivo para *E. coli*, permitiéndole desarrollarse en concentraciones de hasta  $10^9$  ufc/g. Sin embargo, la presencia de LAB, el control del pH, Aw, y especialmente el uso del proceso de Cheddarización durante el queso Chihuahua la producción resultó ser obstáculos importantes que inhibieron la proliferación de *E. coli* en las condiciones estudiadas. Además, reducir la actividad acuosa de la cuajada lo más rápido posible es presentado como la herramienta más poderosa para inhibir el desarrollo de *E. coli* durante el proceso de elaboración del queso Chihuahua.

## **2. FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS Y PATÓGENOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS**

### 2.1. Leche

La leche es un líquido secretado por la madre de diferentes mamíferos, de los cuales existen más de 4.000 especies, cuya tarea principal es satisfacer las necesidades nutricionales completas de los recién nacidos de la especie. Le suministra energía a partir de grasas y azúcares (lactosa), aminoácidos (proteínas), vitaminas y elementos atómicos (a menudo, pero de manera inexacta, llamados minerales). Además, los componentes de la leche efectúan algunas funciones fisiológicas, incluidas sustancias antimicrobianas (inmunoglobulinas, lacto peroxidasa y lacto transferrina), enzimas e inhibidores de enzimas, proteínas transportadoras de unión a vitaminas y factores de control y crecimiento celular. Debido a que los requerimientos nutricionales y fisiológicos de cada especie son más o menos únicos, la composición de la leche tiene notorias diferencias entre especies (Revilla, 1982). La leche varía según la raza (para animales lecheros comerciales), la salud, el valor nutricional, la etapa de lactancia, la edad del animal e intervalo de ordeño, etc. (Revilla, 1982).

La leche se obtiene mediante ordeño sin aditivos ni extracciones y está destinada al consumo como leche líquida o a su posterior procesamiento (FAO/WHO Codex Alimentarius, 1999). Esta secreción láctea debe tener no menos de 3.25% de grasa y no menos de 8.25% de sólidos no grasos y su valor nutritivo dependerá en gran parte de la combinación de estos dos parámetros. Se utiliza la leche de diferentes mamíferos para el consumo humano, pero la leche de vaca es la más abundante y la de mayor consumo en el mundo (Revilla, 1982).

Se ha recopilado una altísima cantidad de datos científicos sobre la composición de la leche y sus derivados; podría decirse que es uno de los alimentos más estudiados de todos los tiempos. (Romero del Castillo & Mestres Lagarriga, 2004).

La leche es un alimento básico y el hombre ha hecho uso de ella en su dieta, ya sea usándola

directamente o procesándola en productos como queso, yogur y mantequilla, entre otros. (Gómez & Mejía, 2005).

### 2.1.1 Composición Química y Física de la Leche

Después del parto, la vaca comienza con las secreciones mamarias; llamado calostro (durante los primeros 2 o 3 días), es un líquido con un alto contenido de sólidos, de fuerte olor y sabor amargo, abundante en inmunoglobulinas y con la siguiente composición promedio: 79% de agua, 10% de proteínas, 7% grasa, 3% de lactosa y 1% de ceniza. El calostro está destinado principalmente a fortalecer el sistema inmune del becerro y sólo a este le sirve; por su gran proporción de inmunoglobulinas, es sumamente sensible a la desnaturalización térmica (Badui Dergal, 2016).

Pasado este periodo, la vaca sintetiza propiamente la leche durante toda la lactancia que varía entre 180 a 250 días (dependiendo muchos factores), con una producción media diaria muy fluctuante que varía desde 3 hasta 25 L. La leche se sintetiza fundamentalmente en la glándula mamaria, pero una parte de sus constituyentes también proviene del suero de la sangre (Badui Dergal, 2016).

Cuadro 2. Composición química de la leche de diferentes razas de vacas (%)

<i>Raza</i>	<i>Agua</i>	<i>Grasa</i>	<i>Proteínas</i>	<i>Lactosa</i>	<i>Cenizas</i>
Holstein	88.12	3.44	3.11	4.61	0.71
Airshire	87.39	3.93	3.47	4.48	0.73
Suiza café	87.31	3.97	3.37	4.63	0.72
Guernsey	86.36	4.50	3.60	4.79	0.75
Jersey	85.66	5.15	3.70	4.75	0.74

La leche generalmente se compone de agua, grasas, proteínas, azúcares, vitaminas y minerales, y otras sustancias presentes en menores concentraciones que en conjunto forman un sistema físico y químico relativamente estable; Esto se debe a que todos los componentes están en equilibrio. Los sólidos totales de la leche (grasa y sólidos no grasos) representan entre 10.5 y 15.5% de su composición total y varían de acuerdo con muchos factores tales como la raza de la vaca, tipo y

frecuencia de la alimentación, época del año, hora del día de la ordeña, etcétera (Badui Dergal, 2016). En la Cuadro 1 vemos los valores medios de la composición global de los distintos tipos de leche, aunque, como se ha comentado anteriormente, es habitual encontrar diferencias entre una misma raza y más aún entre diferentes razas de cada país.

### **2.1.2 Propiedades de la Leche**

La leche y sus derivados tienen ciertas propiedades físicas especiales que reflejan su composición y las interacciones de sus componentes; el color y la viscosidad son dos factores que el consumidor puede juzgar inmediatamente y, con base en esto, rechazar o aceptar un producto (Badui Dergal, 2016). También es importante conocer otras características físicas como gravedad específica, tensión superficial, capacidad calorífica específica, punto de congelación, etc.(Badui Dergal, 2016).

La leche tiene un color blanco característico, que se debe principalmente a la dispersión total del espectro visible, debida principalmente a los glóbulos grasos, aunque también influyen las micelas de caseína y el fosfato cálcico coloidal. Cuanto más pequeñas sean estas partículas, mayor será el área de dispersión de la luz y, por tanto, el producto aparecerá más blanco; por el contrario, cuando las partículas sólidas se combinan y forman agregados, se reduce la dispersión que causa parte del tinte azul. El objetivo principal de la homogeneización es reducir el tamaño de los glóbulos de grasa grandes y crear una gran cantidad de partículas más pequeñas que contribuyen a la blancura deseada de la leche. Es importante recordar que la presencia de carotenoides y riboflavina también tiene un pequeño impacto en el color de este alimento, dándole los primeros una tonalidad amarilla y la segunda una tonalidad verde (Badui Dergal, 2016).

En cuanto a la viscosidad, y a pesar de que la leche contiene 12-14% de sólidos, la leche se comporta casi como un fluido newtoniano similar al agua, con una viscosidad de 2 centipoises. Las micelas y los glóbulos de grasa son los principales responsables de la viscosidad de los productos lácteos, por lo que la leche desnatada y el suero son líquidos a 1.5 y 1.2 centipoises respectivamente, más parecidos al agua (1 centipoise). Por otra parte, el peso específico de la leche depende de los

diversos sólidos que contiene, de tal forma que existe una ecuación lineal que relaciona este parámetro con los sólidos no grasos y la grasa. El peso específico de la leche a 15 °C es de 1.032, mientras que el de la leche evaporada es de 1.066 y el de la leche condensada azucarada es de 1.308 (Badui Dergal, 2016).

Una de las propiedades generales de la leche es la reducción del punto de congelación mediante la acción de solutos de bajo peso molecular como la lactosa y las sales de acuerdo con lo establecido por la ley de Raoult. En general, el punto de congelación de la leche oscila entre -0.52 °C y -0.57 °C. Este valor se utiliza en análisis criogénicos para determinar el deterioro de la leche debido a la dilución con agua. Comparando el punto de congelación de la muestra con el punto de congelación de referencia, se puede cuantificar la cantidad de agua añadida. (Badui Dergal, 2016).

Es importante señalar que los mismos sólidos disueltos hacen que el punto de ebullición de la leche sea ligeramente superior al del agua pura a la misma presión: por ejemplo, la leche tiene un punto de ebullición de 100.17 °C. El calor específico de la leche es de 0.93 cal/kg °C y al igual que en todos los productos lácteos, variando en forma directa de acuerdo con el contenido de agua (Badui Dergal, 2016).

Por otro lado, la acidez titulable de la leche se debe a la presencia de grupos proteicos ionizables, como el carboxilo de los ácidos aspártico y glutámico, y típicamente su valor está entre 0.10 y 0.26%, expresado como ácido láctico. En cuanto al pH de la leche, suele estar entre 6.5 y 6.7, y cualquier cambio en este valor indica un cambio en el producto: por ejemplo, un pH más bajo se debe a una acidificación bacteriana y un pH alto más a la posibilidad de infecciones como mastitis. (Badui Dergal, 2016).

### **2.1.3 Estado de Dispersión de la Leche**

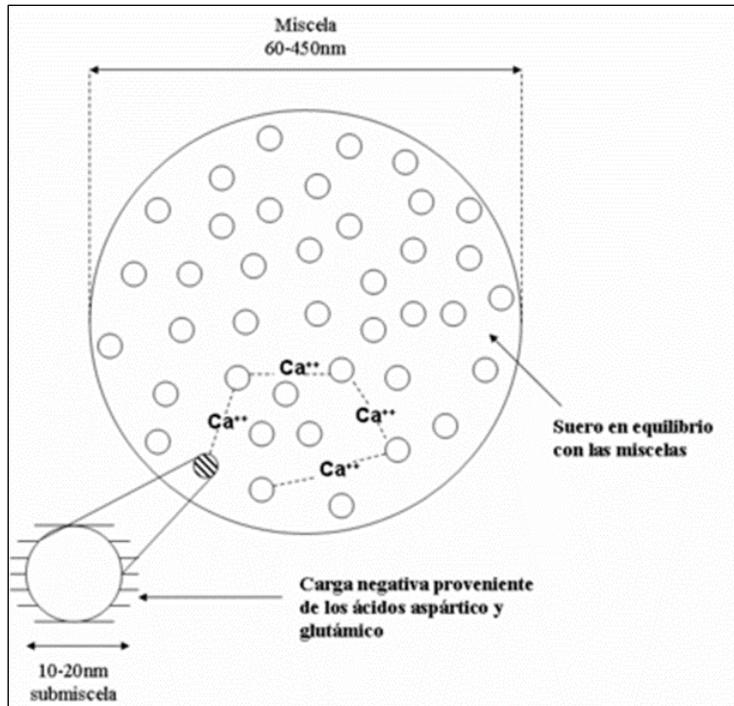
La leche es un sistema biológico muy complejo, en el que existen tres estados de dispersión física de muchos componentes: a) La lactosa, así como las sales, los cationes, los aniones y las vitaminas hidrosolubles, existe como una verdadera solución; b) las proteínas, las caseínas y las del suero,

forman dispersiones coloidales, y c) las sustancias liposolubles se encuentran como emulsión (Badui Dergal, 2016).

Aunque cada uno de estos sistemas tiene diferente densidad (1.05, 1.114 y 0.94 g/ml respectivamente), están en equilibrio debido a diversos mecanismos de estabilidad que tiene cada uno de ellos; los distintos tratamientos a los que se somete la leche y sus derivados pueden alterar estas fases y consecuentemente la estabilidad final del producto (Badui Dergal, 2016).

2.1.3.1 Fase micelar. Las caseínas actúan entre sí formando una dispersión coloidal que consiste en partículas esféricas llamadas micelas con un diámetro que varía de 60 a 450 nm; éstas a su vez están constituidas por subunidades, también esféricas, de diámetro de 10 a 20nm. el peso molecular de las micelas va de 200 a 2800 millones de dáltones; el número de ellas por mililitro de leche es de 5000 a 15 millones; su densidad es de 1.114 g/ml, y están constituidas aproximadamente por 92 % de proteínas y 8 % de fosfato de calcio (Badui Dergal, 2016).

La Figura 1 muestra un diagrama de micelas cuyas subunidades están unidas por iones calcio; En este sentido, no está claro cómo se comporta este ion; Sin embargo, algunas teorías sugieren que el fosfato cálcico se une a los grupos  $\text{NH}_3$  de la lisina o que el calcio interactúa directamente con el carboxilo ionizado. Por este motivo, los secuestrantes de calcio o la diálisis inducen la disolución reversible de las micelas en las respectivas subunidades. (Badui Dergal, 2016).



**Figura 1.** Estructura de la micela de caseínas.

La micela tiene un alto contenido de agua con aproximadamente 3.8 g de agua por gramo de proteína y su estructura porosa permite un intercambio continuo entre sus componentes y los del suero, que depende de la temperatura y del pH del sistema. (Badui Dergal, 2016).

Cuando el pH de la leche se ajusta al punto isoelectrico de la caseína (pH 4.6), se produce la protonación de los carboxilos libres y la consiguiente eliminación de la carga negativa. esto hace que desaparezca el mecanismo estabilizador y facilita la interacción de las caseínas, lo que finalmente conduce a su precipitación. Además de la caseína, las micelas también contienen otras proteínas, principalmente algunas enzimas como la lipasa y la proteasa La primera actúa más fácilmente sobre los glóbulos grasos después de la homogeneización de la leche porque este proceso crea un enlace no covalente entre las micelas y los glóbulos grasos. (Badui Dergal, 2016).

2.1.3.2 Fase lipídica. La fase lipídica juega un papel muy importante en la estabilidad de los productos lácteos y, debido a su composición, es la fuente de muchas de las reacciones químicas y enzimáticas de deterioro que se encuentran más comúnmente en la leche. Está formada por gotitas

de grasa con una densidad de 0.94 g/ml y contiene prácticamente sólo triglicéridos, pero también inmunoglobulinas, enzimas, colesterol, carotenoides y otros lípidos en menores proporciones. (Badui Dergal, 2016).

El número de glóbulos de grasa varía de 1.5 a 3 000 000 000 por mililitro y el tamaño puede ser de 0.1 hasta 22 micras, con un promedio de 4 micras; cabe señalar que estos tamaños son de leche cruda, la cantidad aumenta y el tamaño disminuye. En general, los glóbulos de grasa son de 20 a 50 veces más grandes que los glóbulos de caseína. (Badui Dergal, 2016).

Por su composición, la membrana de los glóbulos de grasa juega un papel muy importante en su estabilidad en la leche, está contiene un 20% de fosfolípidos con una alta proporción de ácidos grasos insaturados que favorecen las reacciones de oxidación; contiene además la mayor parte del cobre que se encuentra en la leche; factores que también contribuyen a la reacción de oxidación antes mencionada (Badui Dergal, 2016).

Las inmunoglobulinas que contiene la leche favorecen la cremación, ya que las fracciones IgM e IgA tienen la peculiaridad de asociarse entre ellas a bajas temperaturas (5 °C), formando grandes agregados proteicos, esto trae consigo que los glóbulos de grasa se aglomeren (Badui Dergal, 2016). Sin embargo, cuando la leche se somete a un tratamiento térmico como la pasteurización, se produce la desnaturalización de las inmunoglobulinas y se inhibe la formación de crema. Las tensiones mecánicas, como la homogeneización, provocan la rotura de las membranas de los glóbulos de grasa y de las células sanguíneas presentes en la leche, la reducción de su diámetro y la difusión de inmunoglobulinas en el suero; esto también reduce la tendencia de la leche a formar crema. (Badui Dergal, 2016).

#### **2.1.4 Contaminantes de la Leche**

Como mencionamos anteriormente, la leche es un excelente medio de cultivo para una serie de organismos, especialmente bacterias mesófilas, y entre estas encontramos bacterias patógenas,

cuya proliferación depende principalmente de la temperatura y a presencia de otros microorganismos competidores o sus metabolitos. Evitar la contaminación y posterior crecimiento de microorganismos en la leche es, por tanto, un problema constante para los responsables de la producción y elaboración de este producto. Por lo tanto, se han creado métodos para reducir los niveles de contaminación mediante un manejo más higiénico, lo que lleva a una mejor higiene. Sin embargo, el riesgo de contaminación de la leche aún existe, principalmente debido a la mala aplicación de los métodos recomendados (Magariños, 2000).

Sin embargo, hay que recordar que la leche es un producto orgánico obtenido de animales y por lo tanto plantea un problema en cuanto a la fuente de contaminación porque, al salir de la glándula mamaria, este producto transporta microorganismos. A esto hay que sumarle los contaminantes creados durante la manipulación en ordeño, transporte y procesamiento, proceso donde la leche pasa por muchas personas y elementos. Las bacterias que se encuentran en la leche no son la única fuente de contaminación, también lo son las bacterias que se encuentran en los equipos, utensilios, en el aire, el polvo, el heno, etc. Muchas bacterias presentes en la leche cruda pueden multiplicarse significativamente a menos que el producto esté congelado. Sin embargo, cuando los productos se almacenan a 4°C e incluso a temperaturas más bajas, las bacterias continúan creciendo, aunque más lentamente (Magariños, 2000).

Respecto a la recogida de leche, esta es la etapa más susceptible a la contaminación por suciedad, microorganismos y sustancias químicas que están presentes en la propia sala de ordeño y pueden introducirse inmediatamente en la leche. Cabe señalar que el alto valor nutricional de la leche puede verse contrarrestado por la presencia incidental de una variedad de contaminantes. (Keating & Gaona Rodríguez, 1986). Estos se pueden dividir en dos grupos: contaminantes químicos y contaminantes biológicos.

2.1.4.1 Contaminantes químicos. Se pueden introducir accidentalmente peligros químicos en la leche y los productos lácteos, convirtiéndolos en productos peligrosos no aptos para el consumo. La leche puede contaminarse cuando los animales lecheros beben agua que contiene sustancias químicas. La contaminación química también puede deberse a un control inadecuado de los

equipos, el medio ambiente y las instalaciones de almacenamiento de leche. Los contaminantes químicos más frecuentemente detectados son: detergentes, desinfectantes de pezones, desinfectantes lácteos, antiparasitarios, antibióticos, herbicidas, plaguicidas, funguicidas, insecticidas (DDT, Aldrin, Dieldrin, Heptacloro), higienizantes (yodo, cloro, peróxido de hidrógeno, amonio cuaternario) y antibióticos (penicilina, estreptomina, clortetraciclina) (Keating & Gaona Rodríguez, 1986).

2.1.4.2 Contaminantes biológicos. La leche, desde su producción, está expuesta a la contaminación con innumerables agentes microbianos. El número y tipo de estos agentes depende de las prácticas de salud e higiene seguidas en la manipulación del producto durante la producción, transporte, procesamiento y venta (Keating & Gaona Rodríguez, 1986).

Los riesgos microbianos son un problema importante de seguridad alimentaria en la industria láctea. Estas sustancias pueden introducirse en la leche desde el medio ambiente o desde los propios animales lecheros. La leche puede contener microorganismos dañinos como *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* (Keating & Gaona Rodríguez, 1986).

### **2.1.5 Transformación de la Leche en Productos Lácteos**

La leche es un alimento invaluable, pero tiene una vida útil corta y debe almacenarse con cuidado. Es un alimento altamente perecedero porque proporciona un excelente ambiente de crecimiento para microorganismos, incluidas bacterias patógenas, que pueden causar deterioro del producto y enfermedades en los consumidores. Sin embargo, la leche procesada permite almacenarla durante días, semanas o meses y ayuda a reducir las enfermedades transmitidas por los alimentos (FAO, OMS, & UNICEF, 2020).

La vida útil de la leche se puede alargar varios días mediante técnicas como la refrigeración (que es el factor que más probablemente afecta a la calidad de la leche cruda) o la fermentación. La pasteurización es un proceso en el que mediante un tratamiento térmico se alarga la vida útil de la leche y se puede reducir el número de microorganismos patógenos hasta niveles que no supongan un peligro grave para la salud. La leche se puede procesar y transformar en productos lácteos condensados, que tienen un alto valor, son fáciles de transportar y tienen una larga vida útil (FAO *et al.*, 2020). El procesamiento de leche ofrece a los pequeños productores lácteos mayores ingresos en efectivo que las ventas de leche cruda y un mayor acceso a los mercados regionales y urbanos (FAO *et al.*, 2020).

Los componentes más valiosos de la leche desde un punto de vista tecnológico son las grasas y las proteínas. La separación y/o conversión de tal o cual sustancia, así como la conversión de lactosa en ácido láctico, son los procesos que dan origen a diversos productos lácteos tradicionales. (Romero del Castillo & Mestres Lagarriga, 2004).

#### 2.1.5.1 Por separación de la grasa

- ❖ Nata: Es una grasa espesa y blanda de color blanco o ligeramente amarillo, emulsionada en leche fresca o cruda, es decir, en su estado natural y no ha sufrido ningún procesamiento artificial. Se compone principalmente de gotas de grasa que flotan en la superficie de la leche cruda; por eso se llama emulsión de grasa en agua. Esta capa se hace visible dejando en un recipiente una determinada cantidad de leche cruda, sin homogeneizar o desnatada: podemos ver cómo se forma una fina capa en la superficie. No hay que confundir con la nata que observamos al hervir la leche, que nada tiene que ver. La nata puede estar más o menos concentrada en grasa, normalmente entre 12 y 36 %, el resto del producto tiene la misma composición que la leche (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).
  
- ❖ Mantequilla: Se trata de una emulsión sólida considerada apta para el consumo humano, producida batiendo, amasando y lavando la grasa y el agua de la leche, con o sin maduración biológica por bacterias específicas del ácido láctico. La grasa láctea en la nata forma una emulsión de grasa en agua que, debido a la acción mecánica sobre la nata (batido), transforma

la emulsión en agua en grasa. Eliminando la mayor parte de la fase acuosa de la crema. La mantequilla contiene al menos un 80% de grasa láctea. El producto líquido obtenido como subproducto de la producción de mantequilla se llama suero de leche y tiene una composición muy similar a la leche desnatada. (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004)

#### 2.1.5.2 Por transformación y/o separación de proteína.

- ❖ Leche fermentada/Yogur: El yogur es sin duda el tipo de leche fermentada más consumido y más conocido. Además, suele ser más fácil de digerir que la leche debido a su bajo contenido de lactosa. Es por ello que es mejor aceptado por personas con intolerancia a la lactosa. A menudo existe mucha confusión en torno a la diferencia entre yogur y leche fermentada. El yogur se produce a partir de la adición de dos bacterias a la leche: el fermento *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Por otro lado, la leche fermentada necesita tanto de los dos tipos de bacterias anteriores como de otros fermentos. En definitiva, el yogur es un tipo de leche fermentada. La caseína de la leche, que resulta del proceso de acidificación por parte de las bacterias del ácido láctico que convierten la lactosa en ácido láctico, forma un gel débil que consta de la fase acuosa y la fase grasa de la leche. En otras palabras, la leche fermentada tiene una composición bastante similar a la leche excepto que parte de la lactosa se ha convertido en ácido láctico. (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).
  
- ❖ Cuajada: En rigor no se trata de un queso sino de leche coagulada sin fermentar, con cuajo animal o extracto de cardo. Hay dos tipos de cuajada, el primer tipo se elabora con un poco de nata o suero, llamado cuajada natural, el segundo se obtiene por coagulación. La leche tradicional con la que se elabora la cuajada es leche de oveja recién ordeñada, mezclada con cuajo, aunque también se puede elaborar con leche de cabra o de vaca. Durante su elaboración, es costumbre introducir una piedra incandescente en el recipiente para que adquiera el sabor ahumado o quemado, que le es característico. La leche con la que se elabora la cuajada debe pasteurizarse durante 30 minutos a unos 35 °C. Sus valores nutricionales son muy parecidos a la leche, aunque, al ser coagulada, su digestión es mucho más sencilla. Contiene lactosa, proteínas como la caseína, calcio y vitaminas. Si se elabora con leche de

oveja, podemos encontrar en esta una gran fuente de grasas saturadas, pero mayor consistencia que las elaboradas con leche de vaca. Las caseínas de la leche, al añadirles cuajo (enzima proteolítica), se transforman dando lugar a un gel sólido bastante consistente, que, a diferencia del anterior, está formado a partir de uniones entre micelas de caseína a través del calcio. Igual que en el caso del yogur, esta estructura engloba la totalidad de la fase acuosa y grasa de la leche (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).

- ❖ Requesón: Es un producto lácteo que se obtiene fermentando y cocinando el suero. Es un subproducto del proceso de elaboración del queso, por lo que el requesón no es queso. Su uso inicial se remonta a la Edad del Bronce, tras la cual se desarrolló su producción en la antigua Roma. Es un producto obtenido del suero del queso. La leche obtenida durante la producción de queso contiene (si se produce a partir de leche cruda) cantidades significativas de proteínas solubles. La acidificación de este suero y el calentamiento por encima de 80°C determinan la precipitación de estas proteínas, formando pequeños agregados con alto contenido de agua y la agregación de estos agregados crea el requesón. Se trata, por tanto, de un producto excepcionalmente rico en proteínas (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).
  
- ❖ Queso: Para elaborarlo, la caseína de la leche se coagula mediante fermentación con bacterias del ácido láctico o añadiendo cuajo o, más a menudo, con la ayuda adicional de estas dos operaciones. El gel así obtenido tiene una fuerte tendencia al sinergismo y segrega así una fracción importante (posiblemente superior al 90% de su masa) de suero. El suero contiene principalmente componentes lácteos solubles (agua, lactosa, proteínas y minerales solubles). El fenómeno de la sinéresis es conocido como desuerado. Si el queso se consume dentro de unos días, es fresco; por el contrario, si se deja madurar, dependiendo del tiempo de maduración, el queso estará más o menos maduro. La operación de escurrido elimina una porción muy importante de agua, lactosa y minerales disueltos, la composición del queso es principalmente rica en proteínas y grasas (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).

## 2.2. Queso

Este es el nombre común de un grupo de productos alimenticios elaborados a partir de leche fermentada, se producen en todo el mundo y se presentan en una amplia variedad de sabores, texturas y formas. Se cree que el queso se desarrolló en la “Creciente Fértil” entre los ríos Tigris y Éufrates en Irak hace unos 8.000 años, durante la “Revolución Agrícola”, cuando se domesticaron ciertas especies de plantas y animales. Entre los primeros animales domesticados se encontraban las cabras y las ovejas; animales pequeños, gregarios y fáciles de pastorear, que se utilizan para proporcionar carne, leche, cuero y lana. El ganado es más difícil de domesticar; porque el ganado salvaje era mucho más grande y feroz que el ganado moderno y también estaba menos adaptado al árido Oriente Medio que las cabras y las ovejas. Al parecer, el ganado vacuno se utilizó inicialmente principalmente como animal de tiro y hasta hace poco no se utilizó como principal fuente de leche. El valor nutricional de la leche producida por el ganado fue rápidamente reconocido y la leche y los productos lácteos se convirtieron en componentes importantes de la dieta humana (Fox, 2017).

Procesar leche para convertirla en queso tiene ventajas obvias en términos de estabilidad en el almacenamiento, facilidad de transporte y diversificación de la dieta humana (Fuquay, 2011).

Es un alimento popular producido en la mayoría de las regiones del mundo a partir de la leche de muchos mamíferos. Son uno de los mejores alimentos para el ser humano, no sólo por su valor nutricional sino también por las sumamente diversas propiedades sensoriales que poseen (Alais, 1985).

Desde el punto de vista fisicoquímico, el queso es un sistema tridimensional formado principalmente por caseína incorporada al llamado caseinato-fosfato cálcico, que a través de la coagulación forma un gel que contiene partículas grasas, algunos minerales, lactosa, vitaminas y otros componentes de la leche. (López de Alcaide, 1988).

Los productos lácteos fermentados se crean mediante una combinación fortuita de factores, la

capacidad de las bacterias ácido-lácticas (BAL) de crecer en la leche y producir suficiente ácido láctico para reducir su pH al punto isoeléctrico de la caseína. Ni las bacterias del ácido láctico ni la caseína están diseñadas para esta función. La caseína está “diseñada” para coagularse enzimáticamente en el estómago de los mamíferos recién nacidos, que tienen un pH gástrico de aproximadamente 6, mucho más alto que el punto isoeléctrico de la caseína. Su hábitat natural es la vegetación, a partir de la cual pueden colonizar las ubres de mamíferos contaminados con leche que contiene lactosa (Fox, 2017).

### **2.2.1. Características Nutricionales del Queso**

El queso tiene un alto valor nutricional con altos niveles de proteínas, grasas, agua, sales minerales y vitaminas. Además, es una interesante fuente de calorías y contribuye a la remineralización del organismo porque contiene abundantes cantidades de calcio y fósforo. Sin embargo, los niveles de calcio varían según el contenido de agua y el tipo de producción (Keating & Gaona Rodríguez, 1986).

Dependiendo del sistema de producción, el queso contiene entre un 10 y un 30% de proteínas. Estas proteínas provienen de caseína desnaturalizada, una parte importante de la cual se degrada y se disuelve en oligopéptidos y aminoácidos. De hecho, gracias a esta proteólisis, la proteína del queso es más fácil de digerir (Dubach, 1980).

Al igual que el calcio de la leche, el cuerpo humano absorbe bien el calcio del queso debido a la proporción relativa de calcio y fósforo que proporciona y a la presencia simultánea de proteínas que favorecen la absorción intestinal. El contenido de aminoácidos esenciales en las proteínas de la leche y el queso confiere a estos productos un valor nutricional extremadamente alto (Dubach, 1980). Respecto a la grasa que contiene el queso, no sólo aporta calorías, sino que también transporta vitaminas liposolubles, principalmente vitaminas A y D. Los lípidos de la leche, triglicéridos, fosfoglicéridos y esfingolípidos se encuentran en el queso en forma de emulsión, lo que los hace más fáciles de digerir (Dubach, 1980).

La consistencia del queso, además de la grasa, también depende de su contenido en agua. Esta sustancia también se utiliza como disolvente y suero, transportando minerales, vitaminas hidrosolubles y ácido láctico (Revilla, 1982).

La mayoría de las vitaminas B se eliminan con el suero durante el proceso de escurrido, dejando sólo el 25% en la cuajada. Mientras que la vitamina C se elimina por completo (Dubach, 1980)

### **2.2.2. Clasificación de Queso**

La variedad de quesos es realmente impresionante, el origen de las materias primas (leche de vaca, oveja, cabra o búfala) produce alrededor de 500 tipos de quesos reconocidos por la Federación Internacional de Lácteos. Muchos otros quesos locales también se producen a menor escala. Para facilitar su estudio, se han realizado varios intentos de clasificar los quesos en grupos o familias significativas. El sistema de clasificación tradicional los clasifica basándose principalmente en el contenido de humedad en duros, semiduros o blandos (P. F. Fox, Guinee, Cogan, & McSweeney, 2017).

Aunque es una base de clasificación muy utilizada, tiene un grave inconveniente: agrupa quesos que tienen características y procesos de elaboración muy diferentes. Por ejemplo, el cheddar, el parmesano y el emmental suelen clasificarse como quesos duros, aunque tienen sabores y métodos bastante diferentes. Se han realizado esfuerzos para hacer que este sistema sea más discriminativo al incluir factores como el origen de la leche del queso, el contenido de humedad, la textura, los microorganismos de maduración primaria y la temperatura de cocción. Otro esquema de clasificación hace diferencia entre variedades según el tipo de iniciador primario y secundario utilizado y el contenido de humedad. Además, hay clasificación de los quesos sobre la base de la técnica de fabricación, sugiriendo que solo hay 18 tipos distintos de queso natural, agrupados en 8 familias bajo los encabezados muy duro, duro, semiblando y blando:

1. Muy duro (rejilla)

- ❖ Madurado por bacterias (parmesano)

## 2. Duro

- ❖ Madurado por bacterias, sin ojos (Cheddar)
- ❖ Madurado por bacterias, con ojos (Emmental)

## 3. Semiblando

- ❖ Madurado principalmente por bacterias (Gouda)
- ❖ Madurado por bacterias y microorganismos superficiales (Limburgo)
- ❖ Madurado principalmente por moho azul en el interior (Roquefort)

## 4. Suave

- ❖ Madurado (Brie)
- ❖ Sin madurar (Cottage)

Desafortunadamente, ninguno de estos esquemas es completamente satisfactorio y, por lo tanto, ninguno es universalmente aceptado. Adicionalmente se proponen una serie de "superfamilias" en las que se agruparían todos los quesos según el método de coagulación de la leche:

- ❖ Coagulados con cuajo (la mayoría de las principales variedades internacionales de queso)
- ❖ Coagulados con ácido (Cottage y Quarg)
- ❖ Coagulado calor/ácido (Ricotta)
- ❖ Concentración/cristalización (Mysost)

Todos los quesos curados se coagulan con cuajo (~75% de la producción mundial total). El requesón agrio es el segundo grupo más grande. La coagulación mediante una combinación de calor y ácido se utiliza para un pequeño número de variedades, incluida la ricota. Concentrado/cristalización utilizado en Noruega para producir “queso de suero” (Mysost) (P. F. Fox *et al.*, 2017).

### 2.2.3 Etapas en el Proceso de Elaboración de Queso

Hay cientos de tipos diferentes de queso producidos en todo el mundo y todos se elaboran según diferentes recetas, técnicas, procesos de producción e incluso secretos comerciales. Sin embargo, todos los diferentes quesos tienen un proceso de elaboración (Fuquay, 2011).

El proceso de conversión de la leche en queso incluye dos etapas: la primera es el proceso de coagulación en el que se producen cambios fisicoquímicos de las proteínas (micelas de caseína), bajo la influencia del ácido láctico y/o enzimas digestivas, proteólisis, que conducen a la formación de una columna vertebral proteica o “esqueleto”, haciendo que la leche se espese formando grumos o geles. En segundo lugar, después de la coagulación, se produce una separación del suero, es decir, la fase acuosa de la cuajada, tras el corte de esta, obteniendo al final de esta etapa un queso crudo o queso fresco. Con la variación de las etapas de proceso durante la fabricación de queso se puede obtener diferentes tipos de queso (Fuquay, 2011). Generalmente la producción de todas las variedades de queso implica un protocolo similar, al cual se modifican varios pasos para dar un producto con las características deseadas (figura 2).

2.2.3.1 Selección de leche. La composición del queso está fuertemente influenciada por la composición de la leche, incluido el contenido de grasa, proteínas, calcio y pH. Por el contrario, la composición de la leche está influenciadas por una serie de factores, incluida la especie, la raza, la variación individual del animal, el estado nutricional, la salud y la etapa de lactancia del animal. La leche destinada para la elaboración de queso debe estar libre de contaminantes químicos y ácidos grasos libres que causan mal sabor en el queso, así como antibióticos que inhiben los cultivos bacterianos. (Fuquay, 2011).

La leche debe ser de buena calidad microbiológica, porque los contaminantes bacterianos se concentran en la cuajada y pueden causar defectos o problemas de salud pública. Sin embargo, la leche para queso a menudo se pasteuriza o se somete a uno o más de los tratamientos que se describen a continuación para eliminar patógenos, intoxicaciones alimentarias y ciertas bacterias

perjudiciales. (Fuquay, 2011).

2.2.3.2 Estandarización de la composición de la leche. El contenido de humedad del queso, y por lo tanto el nivel de grasa y proteína, está determinado principalmente por el protocolo de fabricación, pero la relación grasa: proteína en el queso está determinada principalmente por la relación grasa: caseína en la leche. Dependiendo de la relación requerida, se puede modificar por:

- ❖ la eliminación una proporción de grasa mediante cremación natural o centrifugación,
- ❖ la adición de leche desnatada,
- ❖ la adición de crema, y
- ❖ la adición de leche en polvo, leche evaporada o retenido de ultrafiltración (UF); dichas adiciones también aumentan el contenido total de sólidos de la leche y, por lo tanto, aumentan el rendimiento de cuajada de queso por unidad de volumen (Fuquay, 2011).

El calcio juega un papel esencial en la coagulación de la leche por el cuajo y en el posterior procesamiento del coágulo; por lo tanto, es una práctica común agregar  $\text{CaCl}_2$  (0.01 %) a la leche para queso (Fuquay, 2011).

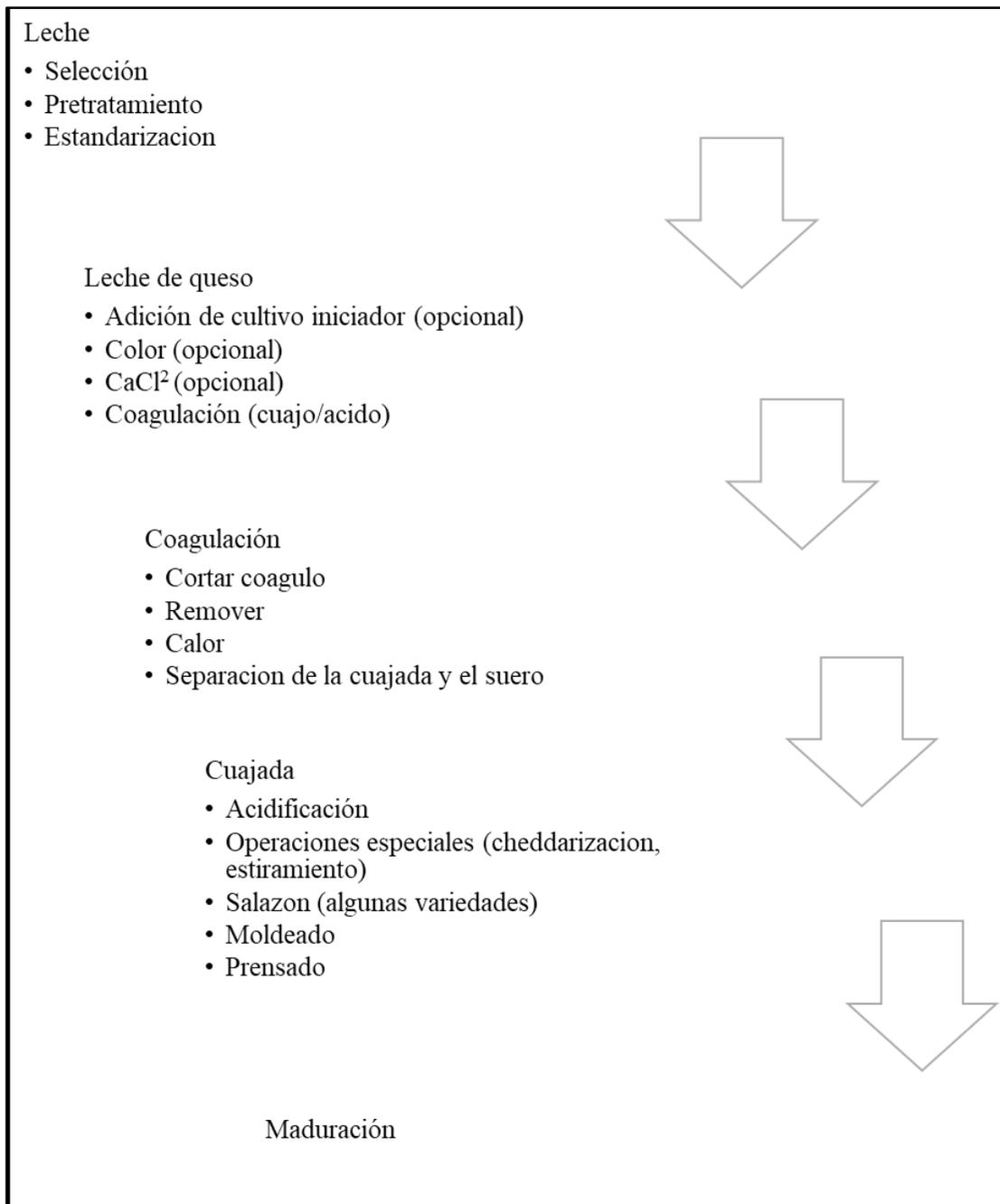
2.2.3.3 Tratamiento térmico de la leche. Cuando hablamos de leche cruda, nos referimos a leche que no ha sido sometida a ningún tratamiento térmico. La principal diferencia con la leche que consumimos habitualmente es que nos aporta un sabor más distintivo y rico. Porque se obtiene ordeñando diariamente, sin interrupción, de la forma más rápida y completa posible (Fuquay, 2011).

La leche se trata térmicamente a una temperatura de 62 a 65 °C durante 15 a 20 segundos. Este tratamiento se aplica a la leche cruda para reducir la cantidad de microorganismos presentes en la leche. Por lo tanto, se permite un almacenamiento más prolongado. Para ello se utilizan temperaturas más bajas respecto a la pasteurización, que conserva más del sabor original (Fuquay, 2011).

La leche pasteurizada ha sido tratada térmicamente para reducir la cantidad de microorganismos dañinos en la leche a un nivel que no represente un peligro significativo para la salud. Este tratamiento prolonga la vida útil de la leche y determina cambios químicos, físicos y organolépticos al mínimo nivel posible. La pasteurización no destruye las esporas ni las toxinas liberadas por los microorganismos presentes en la leche antes del tratamiento térmico (Fuquay, 2011).

Si elaboramos queso con leche pasteurizada, este tratamiento inactiva el cuajo, creando cuajadas más húmedas y suaves que tardan más en madurar. Además, este queso no consigue el mismo sabor y textura que el queso elaborado con leche sin procesar (Fuquay, 2011). Leche temperatura ultra elevada o esterilizada UHT; (Ultra High Temperature, UHT) significa temperatura ultra elevada. En este tratamiento la leche se somete a altas temperaturas durante cortos periodos de tiempo. Luego se utiliza para crear productos comercialmente estériles que se pueden almacenar a temperatura ambiente. Mediante este proceso de tratamiento se destruyen todos los microorganismos que no son capaces de causar daños al producto (si se almacena en condiciones normales). La leche que se somete a este tratamiento se envasa de forma aséptica en envases esterilizados y sellados, que impiden la entrada de microorganismos. (Fuquay, 2011).

La termalización de la leche para elaborar queso se realiza ampliamente al recibirla en fábrica para reducir la cantidad de microorganismos y prolongar el tiempo de almacenamiento. Por razones de salud pública, desde principios del siglo XX, la pasteurización de la leche destinada al consumo líquido se ha vuelto cada vez más popular. La pasteurización de la leche para hacer queso se hizo popular alrededor de 1940, principalmente por razones de salud pública, pero también para garantizar un suministro más uniforme de leche de calidad. (Fuquay, 2011).



**Figura 2.** Protocolo general para la fabricación de queso (Fox, *et al.*, 2000)

2.2.3.4. Color del queso. Los principales pigmentos de la leche son los carotenoides, que se derivan de la dieta del animal, incluida la hierba fresca y el trébol. El ganado transfiere carotenoides al tejido graso y a la leche, mientras que las cabras, las ovejas y las búfalas no lo hacen. Por lo tanto, la grasa de la leche de vaca y los productos ricos en grasas, incluido el queso, son amarillos en un

grado que depende del contenido de carotenoides de la dieta del animal, mientras que los productos lácteos equivalentes de sus vacas, como las ovejas, las cabras o las búfalas, son más blancos. Los carotenoides de la leche bovina pueden blanquearse mediante tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o peróxido de benzoilo, o enmascararse con clorofila u óxido de titanio, si estos aditivos están permitidos. En el otro extremo del espectro están las personas que prefieren los quesos de colores intensos, que suelen obtenerse añadiendo achiote o extracto de la semilla de *Bixa orellana* (originaria de Brasil) la cual contiene dos pigmentos apocarotenoides, bixina y norbixina. (Fuquay, 2011).

2.2.3.5. Acidificación. La acidificación generalmente se logra mediante la producción in situ de ácido láctico mediante la fermentación de lactosa por BAL. Originalmente, se dependía de la microflora nativa de la leche para producir ácido. Sin embargo, debido a que esto era inestable, la velocidad y el grado de acidificación también lo eran, dando como resultado quesos de calidad variable. Los cultivos de BAL (iniciadores) para la elaboración de queso se introdujeron hace unos 100 años y desde entonces se han ido mejorando y refinando progresivamente. Sin embargo la acidificación de la cuajada para algunos quesos artesanales aún depende de la microflora autóctona (Fuquay, 2011).

La acidificación directa con ácido (normalmente ácido láctico o HCl) o genoacidificación (GDL) es una alternativa a la acidificación biológica y se utiliza principalmente comercialmente en la producción de requesón, quark, feta y queso mozzarella. La acidificación directa es más controlable que la acidificación biológica y, a diferencia de los cultivos iniciadores, no es susceptible a la infección por bacteriófagos. Sin embargo, las enzimas de las bacterias iniciadoras son esenciales para la maduración del queso, por lo que la acidificación química se utiliza principalmente para quesos donde la textura es más importante que el sabor (Fuquay, 2011).

La velocidad de acidificación depende de la cantidad y tipo de iniciador añadido, de las características de temperatura de la cuajada, y varía de 5 a 6 horas para el queso cheddar y cottage y de 10 a 12 horas para otras variedades de queso holandés y suizo. El pH final de la cuajada para la mayoría de los quesos de cuajada con cuajo está entre 5.0 y 5.3, pero el pH de los quesos de cuajada ácida, por ejemplo, Cottage, Quark y Cream, y algunos quesos coagulados con cuajo blando, como el Camembert y el Brie son 4.6 (Fuquay, 2011).

2.2.3.6. Coagulación. Después de que la leche ha sido estandarizada y pasteurizada o tratada de otro modo, se transfiere a cubas, que varían en forma (hemisférica, rectangular o cilíndrica, vertical u horizontal), pueden estar abiertas o cerradas, y pueden variar en tamaño, donde se convierte en cuajada de queso mediante un proceso que involucra tres operaciones básicas: acidificación, coagulación y deshidratación (Fuquay, 2011).

Una etapa característica esencial en la fabricación de todas las variedades de queso es la coagulación del componente de caseína del sistema de proteínas de la leche para formar un gel que atrapa la grasa, si está presente. La coagulación puede lograrse mediante:

- ❖ proteólisis limitada por proteinasas seleccionadas;
- ❖ acidificación a pH ~4.6;
- ❖ acidificación a aproximadamente pH 5.2 en combinación con calentamiento a ~ 90 °C.

La mayoría de los quesos se producen mediante coagulación enzimática (cuajo). En el pasado se usaba el cuajo de los estómagos de los animales jóvenes (terneros, cabritos, corderos, búfalos). La enzima principal del cuajo preparado a partir de estómagos de animales jóvenes es la quimosina (95% de la actividad total de coagulación de la leche), con una poca de pepsina. Sin embargo, los suministros limitados de tales cuajos (debido al nacimiento de menos terneros y una tendencia creciente en muchos países a sacrificar terneros a una edad mayor que antes), junto con un aumento mundial en la producción de queso, han llevado a una escasez de cuajo de ternera. y, en consecuencia, los sustitutos del cuajo (generalmente pepsinas bovinas o porcinas y, con menor frecuencia, pepsina de pollo, y las proteinasas ácidas de *Rhizomucor miehei* y, con menos frecuencia, *R. pusillus* o *Cryphonectria parasítica* se usan ampliamente para la fabricación de queso en muchos países con resultados satisfactorios (Fuquay, 2011).

2.2.3.7. Operaciones posteriores a la coagulación. El gel de leche cuajada es estable cuando se almacena en condiciones de reposo. Sin embargo, cuando se corta o se rompe, rápidamente forma sinéresis y expulsa el suero. La velocidad y el grado de sinéresis dependen, entre otras cosas, de la finura de la cuajada, la composición de la leche, el valor del pH, la temperatura de cocción, la velocidad de mezclado de la cuajada y suero y, por supuesto, el tiempo. La composición del queso

depende en gran medida del grado de sinéresis y, al estar bajo el control del quesero, es en esta fase es cuando realmente comienza la diferenciación de los distintos tipos de queso, aunque la composición de la leche, la cantidad y la composición del queso son cruciales. También son importantes el tipo de iniciador, así como la cantidad y tipo de cuajo. La temperatura a la que se cocina la cuajada varía de ~ 30 °C (es decir, sin cocción) para quesos con mucha humedad (por ejemplo, Camembert) a ~ 55 °C para queso con poca humedad (por ejemplo, Parmigiano Reggiano) (Brennan, Cogan, & Loessner y S. Scherer M., 2004).

Después de la cocción, la cuajada y el suero se separan mediante diferentes técnicas varietales. Luego, la cuajada de la mayoría de los quesos se transfiere a una tina para su posterior deshidratación y acidificación. La cuajada, que ha sufrido una extensa sinéresis en la tina (es decir, tiene un bajo contenido de humedad), se presiona en los moldes, a veces con un aumento programado de presión, para derretir el queso y liberarlo de los agujeros mecánicos. Reducir el contenido de humedad. La cuajada de las dos familias de quesos, Cheddar y Filés, sufre un tratamiento especial antes de formarse. (P. F. Fox, McSweeney, P. L.H., Cogan, T. M. and Guinee T. P. , 2004).

El queso tipo cheddar se somete a un proceso llamado 'cheddarización'. El cual es un proceso tradicional, la cuajada escurrida se apila en dos lechos en la cuba, separados por un canal para el drenaje del suero. Las camas de cuajada se cortan en bloques, de ~ 10 cm de lado, que se invierten cada 15 min y luego se apilan dos o tres bloques de altura. Este proceso continúa durante ~ 2 h hasta que el pH desciende a ~ 5.4. Durante la cheddarización, los bloques de cuajada fluyen ligeramente y el queso adquiere una textura fibrosa similar a la de la carne de pechuga de pollo cocida. Anteriormente, se creía que el flujo durante el cheddarización era esencial para la textura del queso Cheddar, pero es probable que el cambio más importante durante el cheddarización sea la acidificación que disuelve el fosfato de calcio coloidal: cuando la relación Ca: proteína disminuye a un cierto valor, adquiriendo la textura característica del queso tipo cheddar (Fox, *et al.*, 2004).

La fabricación de la cuajada del queso mozzarella es similar a la del queso cheddar hasta que el pH disminuye a ~ 5.4. La cuajada acidificada se calienta luego en agua caliente de 60-65 °C, se amasa

y se estira. Se afirma que el amasado y el estiramiento son esenciales para la textura fibrosa característica y la capacidad de estiramiento de la mozzarella. Sin embargo, puede ser que la función de calentar y amasar sea simplemente inactivar enzimas y matar bacterias y, en efecto, estabilizar las características del queso. Originalmente, el calentamiento y el amasado probablemente se introdujeron para controlar la microflora de la cuajada elaborada con leche de mala calidad microbiológica (Fox, *et al.*, 2004).

2.2.3.8. Salazón. La salazón es un tema de gran interés y representa una fase productiva imprescindible si se quiere corregir defectos y obtener productos de gran calidad, uniformes y apetitosos. (Jonson & Paulus, 2005).

Mediante esta operación buscamos y obtenemos tres cosas. En primer lugar, se consigue un mejor drenaje gracias a la capacidad de la sal para absorber la humedad; En segundo lugar, se mejora la fermentación, porque, aunque el efecto antiséptico de la sal no es tan fuerte como se supone, no hay duda de que tiene un efecto específico sobre algunos microorganismos. La sal garantiza un sabor más agradable y, en tercer lugar, la salazón permite conseguir una mejor y más rápida formación de la corteza (Jonson & Paulus, 2005).

El salado se puede llevar a cabo utilizando 3 procedimientos distintos: con sal, con salmuera o de forma mixta.

- ❖ Salado con sal: este método se practica con técnicas distintas, pues mientras en algunos sitios agregan la sal a la leche, en otras mezclan la sal con la cuajada y muchos elaboradores lo hacen al prensado o algún tiempo después de prensar.
- ❖ Salazón con salmuera: La salazón del queso en salmuera es el sistema más lógico y práctico. Se trabaja mejor y de prisa, con menos empleo de mano de obra y de sal, se logran excelentes resultados solo con algunos cuidados y con sencillas instalaciones.
- ❖ Sistema mixto de salazón: El método mixto más utilizado es el que se usa en el queso manchego. primero se utilizaba salmuera o saturación durante 24 horas, con botes periódicos irregulares para dejar las piezas otras 24 horas envueltas por completo en sal seca. la salmuera forma una corteza fina y delicada, que a continuación es endurecida por

la sal, dejándola suficientemente delgada y elástica, pero a la par resistente, lo que no sucede si se invierten los términos y se usa primero la sal y posteriormente la salmuera (Jonson & Paulus, 2005).

La mayoría de los quesos, son salados al final de la fabricación de la cuajada mezclando sal seca con trozos de cuajada, por ejemplo, Cheddar y variedades relacionadas, inmersión en salmuera de NaCl, por ejemplo, Gouda, Emmental y Camembert, y Frotar sal seca en la superficie del queso prensado, por ejemplo, queso azul. La sal, que varía entre un 2 - 10 % en la fase de humedad, tiene una gran influencia en varios aspectos de la maduración, la calidad y la seguridad del queso (Fuquay, 2011).

2.2.3.9. Maduración. La maduración corresponde a la fase en que la masa del queso cambiará sus características, inicia con un aspecto de masa blanquecina, algo insípida, más o menos consistente y pasará a tener nuevas características en su estructura, aspecto, composición, consistencia y color, al mismo tiempo que el olor y el gusto adquieren nuevos matices y se acentúan. Todo esto ocurre porque la masa del queso está poblada de microorganismos que, con sus enzimas, junto a los propios de la leche y los añadidos para su coagulación, llevarán a cabo transformaciones bioquímicas y físicas. Estos cambios serán diferentes para cada tipo de queso, dependiendo del tipo de leche, tipo de coagulación y de los trabajos realizados en la fase de desuerado. También va a depender del tipo de maduración y de las condiciones de la cámara donde maduran (Fuquay, 2011). Existen dos tipos de maduración, aquella que se realiza en ambientes naturales, como cuevas, bodegas y aquella que se realiza en ambientes controlados, en cámaras donde se programa la temperatura y la humedad. La maduración puede durar desde horas hasta varios meses, en este proceso los quesos van perdiendo progresivamente la humedad mediante la evaporación. Es por ello que desde el inicio su peso irá decreciendo e irá concentrando cada vez más su porcentaje de extracto seco (materia sólida del queso). En este proceso también es importante acordarse de la actividad de las bacterias que, poco a poco, irán modificando las grasas, proteínas y carbohidratos generando determinados aromas y sabores (Flores, 2018).

A grandes rasgos podríamos diferenciar dos tipos de queso por su maduración:

- ❖ Los quesos frescos: este tipo de queso no necesita maduración por lo que puede ser consumido justo después de su proceso de fabricación.
- ❖ Los quesos madurados: tras su fabricación necesita un periodo de tiempo a una temperatura y humedad determinadas para que desarrollen todos los cambios físico-químicos que caracterizan al mismo (Flores, 2018).

En algunos países, una parte importante del queso que se consume son quesos curados con ácido, que están listos para el consumo cuando se elabora la cuajada. Aunque el queso coagulado con cuajo se puede consumir como cuajada fresca, y un poco lo es, la mayoría de estas variedades se maduran durante un período que oscila entre 3 semanas y más de 2 años; generalmente, la duración de la maduración está inversamente relacionada con el contenido de humedad del queso (Fuquay, 2011).

Las cuajadas de las diferentes variedades de queso son claramente diferentes al final de la fabricación, las características únicas de cada variedad se desarrollan durante la maduración como resultado de un conjunto complejo de reacciones bioquímicas. Los cambios que se producen durante la maduración, y por tanto el sabor, aroma y textura del queso maduro, están predeterminados por el proceso de fabricación, especialmente por los niveles de humedad y NaCl y pH, la actividad coagulante residual, el tipo de iniciador y, en muchos casos, por la microflora secundaria (Fuquay, 2011).

Los cambios bioquímicos durante la maduración son causados por uno o más de los siguientes: coagulante, enzimas lácteas domésticas, especialmente proteinasa y eventualmente lipasa, bacterias iniciadoras o sus enzimas, y microorganismos y sus enzimas (Fuquay, 2011).

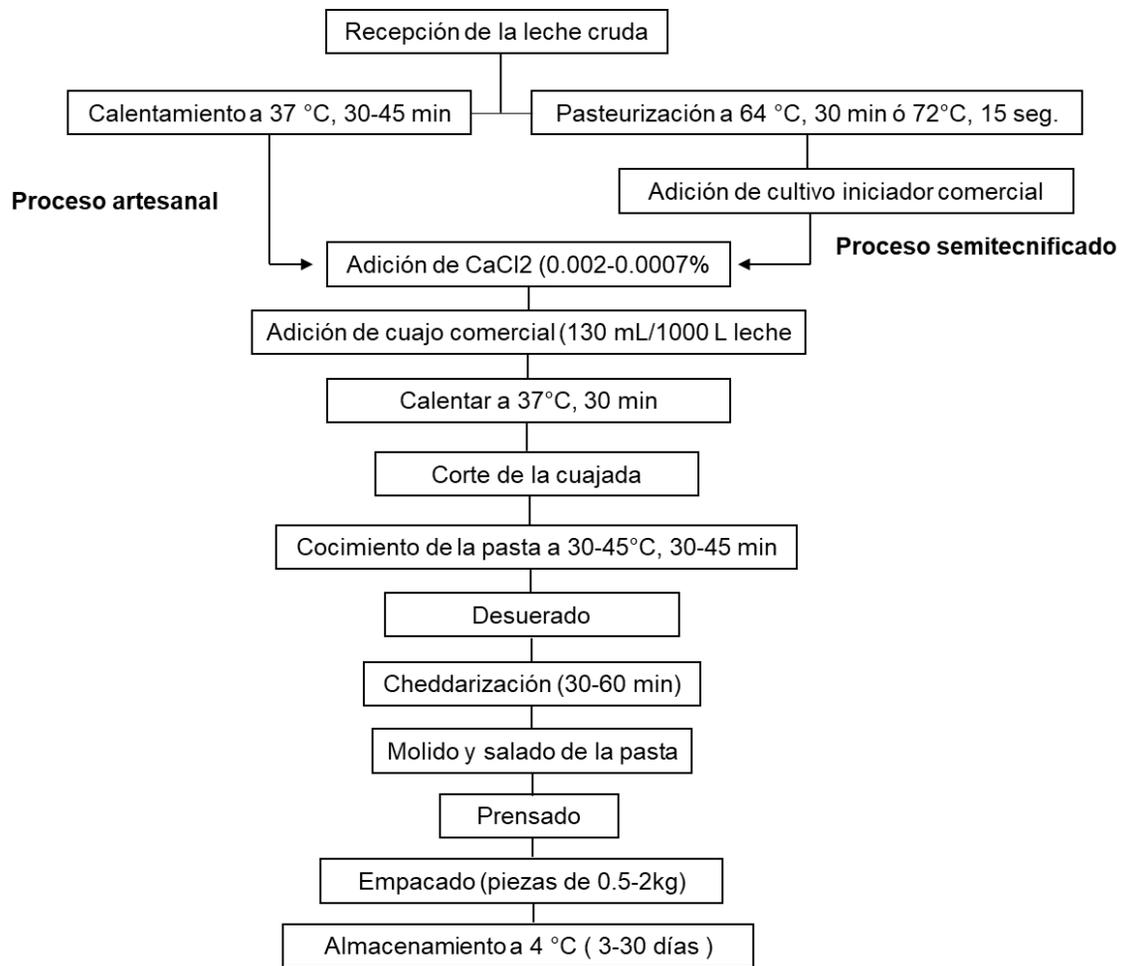
#### **2.2.4 Queso Chihuahua: Características y Proceso de Elaboración**

Es uno de los pocos quesos mexicanos que cuenta con una norma de referencia que tiene como objetivo implementar lineamientos para estandarizar su producción (COFOCALEC & A.C., 2011). Sin embargo, a pesar de que la normativa mexicana (SSA. & NOM-243-SSA1-2010) establece que

toda leche destinada para su elaboración debe ser sometida a un proceso de pasteurización, aun así actualmente se sigue elaborando a partir de leche cruda en queserías artesanales, debido a que es más suave en textura e intenso en sabor respecto al queso elaborado con leche pasteurizada (Van Hekken, Drake, Corral, Guerrero-Prieto V. M., & Gardea, 2006)

El queso chihuahua es una versión del queso Cheddar; incluso el proceso de elaboración (Figura 3) es similar en ambos (Van Hekken *et al.*, 2006). Surgió a partir de la elaboración de queso cheddar por las comunidades Menonitas, las cuales, al intentar producirlo en México, debido a las condiciones del entorno geográfico, dio como el resultado el queso chihuahua. La etapa más crítica en la manufactura del queso es la cheddarización, proceso donde se lleva a cabo la acidificación de la pasta, la cual debe encontrarse específicamente entre 32-38 °D, hecho que es crucial en el desarrollo de las características deseables de este queso (Lopez Diaz & Martinez Ruiz, 2018).

Durante algunos años, se han realizado diversos estudios al queso chihuahua con el fin de conocer sus características fisicoquímicas y reológicas, perfil sensorial, textura, inocuidad e identificación de los microorganismos predominantes en este queso, incluso se ha explorado el potencial antimicrobiano, producción aroma y capacidad proteolítica para generar péptidos bioactivos por BAL aisladas del queso chihuahua (Brennan *et al.*, 2004; Gutiérrez-Méndez, Vallejo-Cordoba, González-Córdova, Nevárez-Moorillón., & Rivera-Chavira, 2008; Renye, Somkuti, Paul, & Van Hekken, 2009; Tunick *et al.*, 2008; Van Hekken *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Diagrama general del proceso de elaboración del queso Chihuahua

### 2.2.5 Principales Microorganismos Asociados a la Producción de Queso

Los microorganismos ingresan al queso al ser agregados intencionalmente como parte del cultivo iniciador o están asociados naturalmente con los ingredientes utilizados en la producción de queso. Por tanto, la tecnología de fabricación es fundamental para definir la biodiversidad de la flora del queso (P. F. Fox, McSweeney, Cogan, & Guinee, 2004).

La leche de la ubre de animales sanos es esencialmente estéril; sin embargo, durante el ordeño y el almacenamiento se presentan oportunidades de contaminación. La leche extraída de la ubre a nivel de granja bajo condiciones higiénicas de ordeño puede contener rutinariamente aproximadamente

5 x 10<sup>3</sup> ufc/ml. La rapidez y el grado de enfriamiento de la leche después del ordeño tienen un impacto significativo en la flora microbiana (P. F. Fox *et al.*, 2004).

La leche enfriada a 15-21 °C está dominada por microorganismos mesófilos, particularmente especies de *Lactococcus* y *Enterobacter*. Enfriar la leche a 4 °C retardará en gran medida el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, pero las bacterias psicrófilas, como *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Acinetobacter*, seguirán creciendo lentamente y dominarán la flora. La pasteurización, que forma parte del proceso de fabricación de la mayoría de los quesos comerciales, mata aproximadamente el 99.9% de las bacterias que se encuentran en la leche cruda. Sin embargo, las esporas de *Bacillus* y *Clostridium* y los organismos termófilos, por ejemplo, *Micrococcus*, *Microbacterium* y *Enterococcus* sobrevivirán a la pasteurización y entrarán en el queso (P. F. Fox *et al.*, 2004).

El contenido microbiológico de la leche cruda que llega a la quesería constituye el microbiota inicial del queso. El tipo y la tasa de microorganismos se puede incrementar, mantenerse estable o reducirse dependiendo de varios factores, tales como: la limpieza de los equipos y utensilios de elaboración, la manipulación, el cultivo iniciador utilizado, los microorganismos que contribuyen a la maduración, el tiempo y la temperatura del almacenamiento de la leche y del queso (P. F. Fox *et al.*, 2004).

En la Cuadro 2, se representan algunos grupos microbianos presentes en la leche, clasificados como útiles o indeseables en la producción del queso, además el papel de los microorganismos que forman parte de dichos grupos.

**Cuadro 3.** Grupos microbianos de leche asociados a la producción de queso (adaptado de Cécile, 2011).

<i>Microorganismos</i>	<i>Papeles principales</i>	<i>Otros roles</i>	<i>Ejemplos</i>
<i>Bacterias lácticas</i>	Acidificación de la leche, participación en la producción de aromas y la formación de textura	Actividad anti patógena (bacteriocinas, ácido láctico).	<i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> .

<i>Bacterias propiónicas</i>	Fermentación propiónica mediante la transformación del ácido láctico para dar ácido acético, ácido propiónico y anhídrido carbónico. El ácido propiónico generado contribuye a la conservación del queso y al desarrollo de las características aromáticas.	Actividad anti patógena	<i>Propionibacterium acidipropionici</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i> <i>Propionibacterium jensenii</i> <i>Propionibacterium thoenii</i>
<i>Bacterias de superficie</i>	Forman parte de la flora de superficie del queso madurado. Juegan un papel importante en la formación de la textura, color y gusto del queso.	Actividad anti patógena	<i>Staphylococcus sp. no patógenos</i> ( <i>Staphylococcus equorum</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. lentus</i> ). <i>Bacterias corineformes</i> ( <i>Micrococcus</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> ).
<i>Levaduras</i>	Desacidificación del queso al principio de la maduración, permitiendo la implantación posterior de bacterias sensibles a la acidez como los corineformes. Contribuyen a la formación de la textura y el gusto.	<i>Geotrichum candidum</i> puede ser responsable de defectos de textura (piel de sapo) en queso de pasta blanda.	<i>Kluyveromyces lactis</i> . <i>Geotrichum candidum</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>Mohos</i>	Son agentes de la maduración presentes en la superficie ( <i>P. camembert</i> y <i>Rhizomucor</i> ) en quesos como Tomme de Savoie y Saint-Nectaire. O en el interior ( <i>P. roquefortii</i> ) en queso azul. Desarrollan las características sensoriales del queso.	El <i>Rhizomucor</i> es responsable de defectos de textura (pelo de gato) y la aparición de gustos extraños en los quesos de pasta blanda. Producción de micotoxinas.	<i>Penicillium camemberti</i> <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Chrysosporium sulfureum</i> <i>Rhizomucor fuscus</i> <i>Rhizomucor plumbeus</i> <i>Trichothecium domesticum</i>

## 2.2.6 Proceso de Fabricación de Queso Como Método de Conservación de la Leche

El proceso mediante el cual la leche se convierte en diversos productos lácteos tiene una larga historia. La gente intenta conservarlos sabiendo que una vez retirados de la vaca, son un producto

de corta duración, ya que perecen rápidamente debido a varios factores. La misma necesidad llevó al desarrollo de procesos de conversión de la leche. La innovación fue y es un factor relevante, pues existen subproductos lácteos que requieren diferentes métodos de conservación para implementarse. Las civilizaciones antiguas no tenían métodos industrializados como hoy, pero el queso, el helado y el yogur, entre otras cosas, se elaboraban de la misma forma (P. F. Fox, McSweeney, P. L.H., Cogan, T. M. and Guinee T. P. , 2004).

El proceso de fabricación juega un papel importante a la hora de determinar las condiciones ambientales finales del queso. Este entorno es altamente selectivo y tiene un impacto significativo en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos durante el procesamiento y la maduración. La fabricación de la mayoría las variedades de queso implican la coagulación a temperaturas de 30-37 °C, seguida de cocción a 37-54 °C. La temperatura de coagulación facilitará el crecimiento de la mayoría de los microorganismos; sin embargo, la temperatura alcanzada durante la cocción tiene el potencial de inhibir el crecimiento de algunos organismos. Por ejemplo, el queso tipo suizo se cocina a 52-54 °C y se mantiene por encima de 50 °C por un periodo de hasta 5 h. Se considera que este tratamiento térmico desempeña un papel importante en el control del crecimiento de iniciadores y microorganismos indeseables. El proceso de fabricación también influye en la composición cruda del queso, que se define mejor por los cuatro parámetros: sal en humedad, humedad en materia magra, grasa en materia seca y pH. Estos parámetros, a su vez, influyen en el entorno en el que se multiplican los microorganismos. Los principales factores ambientales que controlan el crecimiento de microorganismos en el queso incluyen el contenido de agua, contenido de sal, el pH, la presencia de ácidos orgánicos, presencia de nitrato, potencial redox y la temperatura de maduración (P. F. Fox *et al.*, 2004).

Una etapa importante en la elaboración de la leche es la pasteurización, gracias a que la leche es sometida a un tratamiento térmico especial durante un período de tiempo determinado se logra la destrucción completa de los organismos patógenos que pueda contener, sin cambiar significativamente su composición, sabor o valor nutricional. La pasteurización no corrige los defectos de la leche; Sólo ayuda a conservar sus propiedades naturales matando entre el 90 y el 99% de los microorganismos y desactivando algunas enzimas, lo que supone aumentar la vida comercial del producto (Aurelio, 1982).

Hay que tener en cuenta que la pasteurización permite:

- ❖ Destruir el 99% de los agentes microbianos causantes de enfermedades al hombre, tales como bacterias, rickettsias, virus y protozoarios.
- ❖ Disminuir el número de aquellos microorganismos saprófitos que son los que, por lo general, afectan la calidad de la leche y subproductos.
- ❖ Controlar más fácilmente los métodos de producción y la velocidad de maduración.
- ❖ Producir queso estandarizado todo el año.
- ❖ Madurar el queso a temperatura más alta que la usada para queso de leche cruda.
- ❖ Obtener productos de más larga conservación.
- ❖ Disminuir apreciablemente la producción de queso con aroma y sabor más puro (Juarez, 1995).

La temperatura de pasteurización está estrechamente relacionada con el tiempo de exposición necesario para matar los patógenos más resistentes. En el caso de la leche, la base inicial era matar *Mycobacterium tuberculosis*, para lo cual se requería 60 °C durante 15 a 20 minutos, pero en la práctica el conteo requería 61°C durante 30 minutos. con un margen de seguridad. (Aurelio, 1982).

Otro paso importante en la elaboración de queso y que adicionalmente nos ayuda al control o eliminación de microorganismos es la adición de cultivos iniciadores. Los microorganismos utilizados como cultivos iniciadores en la industria láctea son en su mayoría bacterias del ácido láctico que se agregan a la leche para iniciar y controlar adecuadamente su fermentación. También se utilizan otras bacterias, como los probióticos, que en ocasiones se añaden por separado. Además, algunos productos lácteos, como el queso o el kéfir, llevan añadidos otros microorganismos, como hongos y levaduras, para desencadenar determinados procesos. Los objetivos de los cultivos iniciadores son:

- ❖ Acidificación: por producción de ácido láctico a partir de la lactosa, como consecuencia desciende el pH. La producción de ácido láctico comporta: primero el gusto ácido característico, En segundo la higienización, por acidificación, producción de bacteriocinas y competencia con los microorganismos indeseables, y finalmente la precipitación de la caseína cuando el pH llega al punto isoeléctrico y la formación del gel lácteo.

- ❖ Modificación de la textura: se realiza por la precipitación de la caseína y por la producción de mucílagos.
- ❖ Modificación del gusto y del aroma: Se desarrolla primeramente por la producción de ácido, en segundo lugar, por la producción de sustancias aromáticas a partir de la lactosa o del citrato, y finalmente en tercer lugar por la producción de sustancias aromáticas y sápidas por proteólisis y lipólisis.

Con el uso de cultivos iniciadores seleccionados se puede controlar mejor la calidad y la uniformidad de los productos lácteos (Romero del Castillo & Mestres Lagarriga, 2004).

Adicionalmente tenemos la cheddarización la cual es una operación es la característica principal del método de elaboración del queso cheddar. (Lucius, 1910) En esta etapa bajo la influencia de calor, ácido y gravedad, las partículas de cuajada se mantienen juntas y forman una masa sólida de cuajada, que se caracteriza por el corte de la cuajada enmarañada en losas, las cuales se apilan para aplicar presión de manera controlada y gradual durante un periodo prolongado (60-90 minutos) durante este tiempo se desarrolla rápidamente la acidez (McSweeney, 2007). Por lo tanto, es un paso importante en la elaboración del queso que ayuda a alcanzar el nivel requerido de liberación de suero y acidez de la cuajada. (Lowrie, Kalab, & Nichols, 1982). El rasgo más notable de la cheddarización es la acidificación de la pasta, acompañada por la expulsión del suero, como resultado del incremento en acidez, el fosfocaseinato de cálcico del gel obtenido por adición de la enzima coagulante, se pierde progresivamente y tiende a convertirse en fosfocaseinato monocálcico, lo que primero influye en la formación de una pasta más plástica y cohesiva, y luego menos plástica y desmoronable. La disminución del pH en esta etapa influye decisivamente en la estructura y textura del producto. Al descender el pH, el fosfato de calcio coloidal "ligado" a la caseína y para- $\kappa$ -caseína que forman la red de la cuajada, se vuelve soluble y pasa o migra hacia la fase acuosa, dejando la matriz estructural desmineralizada (Villegas de Gante, 2004).

Debemos tener en cuenta que el queso cheddar se hizo originalmente mediante un proceso de cuajada agitada y las condiciones sanitarias eran deficientes lo que produjo quesos gaseosos con sabores impuros. Sin embargo, se encontró que la cheddarización mejora la calidad del queso, presumiblemente como resultado de la mayor y más rápida producción de ácido. Es decir, a medida que el pH cayó por debajo de aproximadamente 5.4, el crecimiento de organismos indeseables

formadores de gas, tales como coliformes, se habría inhibido cada vez más. El apilamiento y el reapilamiento de bloques de cuajada tibia en la cuba durante aproximadamente 2 h también exprimió cualquier bolsa de gas que se formara durante la fabricación (Kosikowski, 1997).

El salado es una etapa esencial en la fabricación de los quesos. Y es muy importante porque actúa directa o indirectamente, modificando la actividad de agua, sobre el desarrollo de los microorganismos y la actividad enzimática. En decir nos ayuda con el control de crecimiento microbiológico.

La temperatura de proceso es uno de los factores ambientales más importantes que influyen en el crecimiento microbiano y el mantenimiento de la vitalidad. El control de la temperatura es fundamental para la elaboración del queso. Temperaturas inadecuadas pueden matar o inactivar a los cultivos. El calor es importante para garantizar la reacción química. El frío, por su lado, también juega un papel vital en la industria quesera. Los quesos madurados requieren de una temperatura y humedad de ambiente específica para madurar adecuadamente desarrollando los sabores completamente (Varela & Grotiuz, 2008).

Otra etapa muy importante para el control de microorganismos es la maduración. Tiene como fin la pérdida de humedad y en el caso de quesos con adición de cultivos el desarrollo de las cepas que desarrollaran los posteriores cambios en la textura, sabor y olor, por esta razón el control de las variables de temperatura y humedad son de vital importancia para obtener una maduración óptima en el producto, si estas condiciones no son controladas se corre el riesgo de favorecer el crecimiento de otros microorganismos como hongos o bacterias que pueden generar defectos en el sabor olor y en el peor de los casos permitir el desarrollo de microorganismos que generen toxinas dañinas al consumidor (P. F. Fox *et al.*, 2004).

### 2.3. Microbiología de la Leche y Subproductos

Si bien la calidad nutricional de la leche y los productos lácteos es indiscutible, lo cierto es que desde que se sintetizan en las glándulas mamarias hasta que llegan al consumidor, su calidad

original está sujeta a muchos riesgos que afectan la salud. Estos riesgos son: la contaminación y multiplicación de microorganismos, contaminación con gérmenes patógenos, alteración fisicoquímica de sus componentes, absorción de olores extraños, generación de malos sabores y contaminación con sustancias químicas tales como pesticidas, antibióticos, metales, detergentes, desinfectantes, partículas de suciedad, etc. Todos éstos contaminantes ya sea en forma aislada o en conjunto, actúan en forma negativa sobre la calidad higiénica y nutricional del producto y, consecuentemente en contra de la salud pública y economía de cualquier país (Cu, Sánchez, & Vázquez, 2010). Las principales fuentes de contaminación microbiana de la leche son:

- ❖ El interior de la ubre, si el animal padece alguna infección.
- ❖ El exterior de la ubre y los pezones.
- ❖ El equipo de ordeño y otros utensilios que estén en contacto con la leche (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).

Los tipos y cantidades de microorganismos varían ampliamente, al igual que las prácticas de los productores lácteos con respecto a la higiene de la ubre, el pre y post ordeño y la limpieza del equipo. Esto significa que el microbioma que contamina la leche sucia es muy heterogéneo. Además, es necesario tener en cuenta las condiciones en las que se realizará el ordeño:

- ❖ Temperatura durante el ordeño.
- ❖ Temperatura de almacenamiento de la leche.
- ❖ Tiempo que permanece la leche a las diferentes temperaturas

El contenido inicial en microorganismos de la leche cruda puede variar de menos de 1000 ufc/ml, cuando las condiciones higiénicas de manejo del animal y del ordeño son correctas, hasta más de  $10^6$  ufc/ml, cuando se descuida la higiene (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).

### **2.3.1 Principales Grupos Bacterianos Encontrados en Leche**

Los microorganismos son importantes para la leche y los productos lácteos porque les dan sabor y

propiedades físicas deseables, pero otros microorganismos pueden causar deterioro, algunos patógenos y sus toxinas pueden hacer que los productos lácteos sean inseguros. La diversidad en los microorganismos presentes que son los responsables de la gran diferencia en las características organolépticas entre los quesos hechos con leche cruda, respecto a los pasteurizados. La microbiota dominante incluye: Bacterias lácticas (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, etc.), *Pseudomonas*, *Micrococcaceae* (*Micrococcus* y *Staphylococcus*), y levaduras (Del Campo, 2005).

Debido a su diversa composición química, la leche proporciona un medio especialmente adecuado para el crecimiento de bacterias. En este grupo se encuentran bacterias que se alimentan principalmente de proteínas, lactosa y grasas. Las actividades bioquímicas de cada uno de estos compuestos son proteolíticas, lipolíticas o lipolíticas, respectivamente (Keating & Gaona Rodríguez, 1986).

Las bacterias que muestran mayor presencia en la leche y de los subproductos son: Las bacterias lácticas, bacterias coliformes, bacterias propiónicas, bacterias butíricas, bacterias proteolíticas y las bacterias patógenas (Meyer, 1987). A continuación, les mostramos una breve descripción de las mismas:

Las bacterias lácticas transforman la lactosa en ácido láctico bajando el pH hasta 4.5, a esta acidez se impide la acción de estas bacterias y otros gérmenes. En la leche cruda caliente, estas bacterias se multiplican rápidamente, no forman esporas y se destruyen por la pasteurización a temperatura baja (Meyer, 1987).

Las bacterias coliformes producen ácido láctico y ácido acético, bióxido de carbono e hidrógeno a partir de la lactosa. En base a la formación de estos gases, se puede determinar la presencia de bacterias coliformes. La presencia de estas indica además la existencia de bacterias patógenas (Meyer, 1987). Su importancia en la lechería se debe a que su presencia en la leche y en los productos lácteos indica deficiencia en la higiene de los métodos de producción, transporte y venta, etc., y además ocasiona acidificaciones, lo que causa daños a la leche y sus productos. En el queso, las bacterias coliformes provocan la formación de muchos agujeros pequeños en la pasta conocido

como hinchamiento precoz, por ocurrir antes de las 48 horas, y constituye un elemento de depreciación del producto (Juarez, 1995; Meyer, 1987).

Las bacterias propiónicas convierten la lactosa en ácido láctico, ácido acético y bióxido de carbono. La temperatura óptima para su desarrollo en los quesos es de 24 °C. Abajo de 10 °C, las bacterias propiónicas no se multiplican. Estas bacterias no forman esporas y se destruyen por pasteurización a temperatura alta (Meyer, 1987).

Las bacterias butíricas transforman la lactosa en ácido butírico, bióxido de carbono e hidrógeno. Estas bacterias se encuentran frecuentemente en los forrajes, ensilados y en la tierra. Llegan a la leche por contaminación. Son bacilos capaces de formar esporas (que resisten a la pasteurización) en condiciones adversas. Son aerobios y su temperatura óptima de crecimiento son los 37 °C. La más conocida de estas bacterias es el *Clostridium botulinum*. El ácido butírico es volátil y proporciona un olor desagradable al producto. La producción de los gases puede provocar hinchamientos tardíos en los quesos, acompañados de defectos en el sabor. El agente responsable es el *Clostridium tyrobutyricum*. Un bajo número de esporas de dicho microorganismo en la leche puede causar defectos importantes en los quesos (Meyer, 1987).

Las bacterias proteolíticas se encuentran frecuentemente en heno, paja y partículas de estiércol, forman esporas altamente termorresistentes, su destrucción se dificulta aún en la esterilización. Las bacterias proteolíticas se desarrollan mejor en medios neutros y alcalinos. Pueden coagular leche no acidificada (Meyer, 1987).

Se sabe que los productos lácteos contienen bacterias patógenas que son perjudiciales para la alimentación humana. Por contaminación humana, la leche puede contener microorganismos enteropatógenos como *Salmonella* y *Shigella* que son responsables de intoxicaciones alimentarias. El animal puede contaminar la leche con el bacilo tuberculoso bovino, bacilo de la fiebre de Malta y bacterias responsables de mastitis (Meyer, 1987).

La mayoría de las bacterias patógenas no provocan cambios significativos en la leche y se detectan únicamente mediante análisis bacteriológico. En los quesos algunos microorganismos patógenos

como *Brucella mellitensis* pueden sobrevivir durante algún tiempo. Otros microorganismos pueden multiplicarse y producir sustancias tóxicas como *Staphylococcus aureus* cuyas toxinas son detectables en el queso cuando el número de gérmenes supera de 5 a 10 millones/gr. Los microorganismos patógenos sobreviven hasta 3 meses en ciertos tipos de quesos, pero por regla general la maduración de quesos reduce el contenido de agentes patógenos (Bran Taracena, 1986).

Los grupos que forman parte del microbiota de contaminación de la leche se pueden clasificar de varias formas, aquí presentamos una clasificación útil desde el punto de vista de las operaciones tecnológicas. Algunos microorganismos forman parte de varios grupos a la vez.

2.3.1.1 Microbiota termo dúrica. La presencia de esporas bacterianas en leche puede ocasionar problemas en la industria láctea debido a que dichas esporas pueden sobrevivir a tratamientos térmicos como la pasteurización y pueden causar el deterioro de la leche (Collins, 1981). Estas bacterias formadoras de esporas son capaces de sobrevivir frente a diferentes tipos de estrés y luego germinar, soportando distintos valores de pH, temperatura y actividad de agua (van Netten & Kramer, 1992).

Estos microorganismos esporulados pueden ser anaerobios estrictos como los pertenecientes al género *Clostridium*, o anaerobios facultativos pertenecientes al género *Bacillus*. Entre los anaerobios estrictos las especies más importantes son *Clostridium butyricum*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium sporogénesis* y *Clostridium botulinum*, pero su abundancia es relativa debido a la necesidad de nichos con ausencia de oxígeno. Sin embargo, estas especies son las responsables de efectos de “hinchazón tardía” en quesos madurados, y son responsables de enfermedades de origen alimentario como es el caso de neurotoxina producida por *C. Botulinum* causante de botulismo (Granum, 1994).

El género bacilos representa un grupo taxonómico heterogéneo en el cual dichas bacterias se caracterizan por ser Gram positivas y formadoras de endosporas. Las especies pertenecientes al género *Bacillus* tienen la capacidad de crecer tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Este género presenta un amplio espectro de características fisiológicas distintas que se aprecia en

la variedad de especies mesófilas, termófilas y psicotrópicas existentes. *Bacillus locheniformis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis* Son las especies mesófilas que son las predominantes en leche, mientras que *Bacillus cereus* es la especie psicotolerante más importante ya que es patógena para el ser humano, siendo causante síndromes eméticos y diarreicos de origen alimentario (Granum, 1994).

2.3.1.2 Esporulados. Las bacterias esporuladas, importantes para la microbiología de alimentos son de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. Cuando el ambiente es propicio, las esporas germinan y dan origen a células normales (vegetativas).

- ❖ *Bacillus cereus*; es un patógeno productor de toxina, puede producir un gusto amargo en la leche.
- ❖ *Clostridium perfringens*, patógeno
- ❖ *Clostridium butyricum* y *Clostridium tyrobutyricum*, que no son patógenos, pero tienen mucha importancia tecnológica porque son los responsables de los hinchamientos tardíos de los quesos (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).

Los microorganismos esporulados aerobios son capaces de soportar procesos como la pasteurización. Si bien se encuentran en bajo número en la leche cruda, pueden llegar a concentraciones elevadas debido a su capacidad de crecer en el proceso de elaboración de productos lácteos generando un impacto negativo al nivel de las propiedades organolépticas debido a la producción de enzimas (Chen, Daniel, & Coolbear, 2003).

2.3.1.3 Microbiota psicotrofa. Incluye los microorganismos que se desarrollan a temperaturas bajas, entre 4 y 20 °C. Tienen importancia porque la leche se almacena a temperaturas por debajo de los 4 °C. A esta temperatura la mayoría de los microorganismos tiene un crecimiento muy lento, pero si la temperatura no está bien regulada o la leche pasa demasiado tiempo en estas condiciones, es este grupo el que se desarrolla preferentemente constituyendo un peligro de cara a la calidad posterior de la leche o de los productos que con ella se elaboren, puesto que estos microorganismos

poseen gran cantidad de enzimas proteolíticos y lipolíticos que quedan en la leche después del tratamiento térmico. Dentro del microbiota psicotrofa encontramos los siguientes grupos:

- ❖ Bacilos Gram negativos, de los cuales más del 50% pertenecen al género *Pseudomonas* y en menor proporción *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* y *Moraxella*.
- ❖ Microorganismos del género *Bacillus* (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).

2.3.1.4 Coliformes. Son indicadores de falta de higiene. Pertenecen a la familia de las *Enterobacteriáceas* y agrupa los siguientes géneros:

- ❖ *Escherichia*, raramente patógeno, ya que menos de un 10% de las cepas de *E. coli* estudiadas son patógenas, el 90% restante son inocuas.
- ❖ *Enterobacter*, bacterias Gram negativas facultativamente anaeróbicas. Muchas de estas bacterias son patógenas y causa de infección oportunista, otras son descomponedores que viven en la materia orgánica muerta o viven en el ser humano como parte de una población microbiana normal. Algunas enterobacterias patógenas causan principalmente infección del tracto urinario y del tracto respiratorio.
- ❖ *Citrobacter*, es un grupo de bacilos Gram negativos aerobios que se encuentran frecuentemente en el agua, el suelo, la comida, vegetación y como flora saprofita en el tracto intestinal de muchos animales además del hombre. El género *Citrobacter*, aunque desde los puntos de vista bioquímico y serológico es similar a *Salmonella*, es poco común que cause infecciones oportunistas. En los seres humanos producen, por ejemplo, infecciones urinarias, meningitis neonatal y abscesos cerebrales.
- ❖ *Klebsiella*, es un género de bacterias inmóviles, Gram-negativas, anaerobias facultativas y con una prominente cápsula de polisacáridos. Es un patógeno humano frecuente. Las bacterias del género *Klebsiella* pueden encabezar un amplio rango de estados infecciosos (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004).

2.3.1.5 Otros patógenos. Otro grupo a tener en cuenta son los posibles patógenos para las personas susceptibles de contaminar la leche, como:

- ❖ *Listeria monocytogenes*, es una bacteria que se desarrolla intracelularmente y es causante de la listeriosis. Es uno de los patógenos causante de infecciones alimentarias más violentos, con una tasa de mortalidad entre un 20 a 30 %, más alta que casi todas las restantes toxiinfecciones alimentarias. *Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, pequeño (0.4 a 0.5 micrones de ancho × 0.5 a 1.2 de largo) no ramificado y anaerobio facultativo capaz de proliferar en una amplia gama de temperaturas (1 a 45 °C) y una elevada concentración de sal. Es catalasa positiva y no presenta cápsula ni espora. Tiene flagelos peritricos, gracias a los cuales presenta movilidad a 30 °C o menos, pero es inmóvil a 37 °C, temperatura a la cual sus flagelos se inactivan.
- ❖ *Bacillus cereus*, se trata de un bacilo Gram positivo, esporulado, anaerobio facultativo y móvil. La espora es ovoidea, central y no deformante. Hidroliza la lecitina de la yema del huevo y no fermenta el manitol. La temperatura óptima es de 30 a 37 °C, su temperatura de crecimiento es de 5 a 55 °C y su temperatura de germinación, de 5 a 8 °C. Su pH óptimo, 4.5 a 9.3, Aw 0.95 y su concentración de sal, 7.5 %. Produce dos tipos de toxiinfecciones alimentarias: la forma diarreica y la forma emética
- ❖ *Clostridium perfringens*, es una bacteria anaeróbica Gram-positiva, capsulada, esporulada e inmóvil que se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente, de gran plasticidad ecológica. No suele aparecer esporulada, ni en productos patológicos ni en cultivos, requiriendo para esporular medios especiales. Se encuentra en los intestinos de los seres humanos y de varios animales homeotermos, en el suelo, en el agua, en los alimentos (sobre todo en las carnes que no están bien cocinadas), entre otros. Las enfermedades causadas por dicho microorganismo pueden ser fatales. La cápsula, la carencia de flagelos y la esporulación poco frecuente lo diferencian de otras especies del género. Constituye el agente etiológico más importante de la gangrena gaseosa. Además, es responsable de otros cuadros clínicos como son: toxiinfecciones alimentarias, enteritis necrosante, celulitis e infecciones inespecíficas. Los determinantes de patogenicidad de esta bacteria son variados, de tal manera que ejerce su acción patógena mediante la producción de varias toxinas citotóxicas, una enterotoxina y varias enzimas extracelulares con actividad biológica (colagenasas, hialuronidasas, etc.
- ❖ *Campylobacter* ssp. Es un género de bacterias perteneciente a la familia *Campylobacteraceae*. Las especies de este género son bacilos Gram negativo con forma de coma y móviles por la presencia de uno o dos flagelos polares. Miden entre 0.5 y 5 micras

de largo por 0.2 a 0.5 micras de ancho, tomando forma cocoide en cultivos antiguos o expuestas de forma prolongada al aire. No son esporulados, reaccionan positivamente a la oxidasa, la reacción a la catalasa es variable, y su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 25 y 42 °C. *Campylobacter jejuni* es ahora una de las principales causas de intoxicación alimentaria en muchos países desarrollados.

- ❖ *Yersinia enterocolitica*, es una bacteria de la familia *Yersiniaceae*, género *Yersinia*. Es un cocobacilo gramnegativo con bordes redondeados, no esporulado, capaz de crecer dentro de una amplia escala de temperaturas (desde -1 °C hasta +40 °C). Es móvil a 22 °C con movimientos ondulantes y giratorios gracias a que presenta flagelos peritricos; dicha movilidad no se presenta si su cultivo se incubaba a 37 °C. Presenta pili y fimbrias, una cápsula de poco espesor y flagelos peritricos o anfitricos. Es una de las causas del síndrome diarreico invasor, aunque es menos frecuente que otros agentes. Fue descubierta en 1939 como patógeno primario para el ser humano y fue involucrada en procesos intestinales. Esta bacteria se multiplica en las mucosas y se puede transmitir a través del contacto con animales, ingestión de productos alimenticios contaminados o agua contaminada. Raramente causa infecciones mortales. Habita en el intestino de animales domésticos. Esta bacteria genera manifestaciones variadas, que van desde un síndrome diarreico invasor autolimitado, hasta un cuadro de septicemia franco que conduce a la muerte.
- ❖ Rickettsias, estas bacterias son diferentes de la mayoría de otras bacterias, ya que solo pueden vivir y multiplicarse dentro de las células de otro organismo (huésped) y no pueden sobrevivir por sí mismas en el medio ambiente. Muchas especies de estas bacterias viven en el interior de pequeños animales (como ratas y ratones), que se denominan "el huésped". El ganado, las ovejas y las cabras son los organismos huéspedes de *Coxiella burnetii*, que causa la fiebre. Los seres humanos son el huésped habitual de *Rickettsia prowazekii*, que causa el tifus epidémico. Dichos animales huéspedes pueden o no estar enfermos por la infección. (Romero del Castillo Shelly & Mestres Lagarriga, 2004)

### **2.3.2 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* fue aislada y descrita por primera vez por el pediatra alemán Escherich en 1885,

demonstrando su presencia como huésped común en el intestino. Lo llamó " *Bacterium coli commune* ". Esto se puede traducir como "bacterias comunes del colon". En 1919, Castellani y Chalmers le dieron su nombre definitivo en honor a Escherich. El género *Escherichia* pronto se convirtió en el género típico de la familia *Enterobacteriaceae*, y *E. coli* es la especie más conocida de este género (Rodríguez-Angeles, 2002).

*E. coli* se caracteriza por poseer bacilos Gram negativos, no esporulante, además, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas. Como todas las bacterias Gram negativa, la cubierta de *E. coli* consta de tres elementos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas (Rodríguez-Angeles, 2002).

Es una bacteria mesófila, su óptimo de desarrollo se encuentra en el entorno de la temperatura corporal de los animales de sangre caliente (35-43 °C). La temperatura límite de crecimiento se sitúa alrededor de 7 °C, lo que indica que un control eficaz de la cadena de frío en las industrias alimentarias es esencial para evitar el crecimiento de *E. coli* en los alimentos. La congelación tiene pocos efectos sobre la población de *E. coli* en el alimento, y no garantiza la destrucción de un número suficiente de bacterias viables para asegurar su inocuidad. Sin embargo, *E. coli* es sensible a temperaturas superiores a 70 °C, a partir de la cual son fácilmente eliminadas; por ello, es muy importante la pasteurización de alimentos como la leche, zumos, etc., para garantizar su eliminación (Rodríguez-Angeles, 2002).

Además de la temperatura, el pH y la actividad de agua pueden influir en la proliferación de *E. coli*. Las condiciones óptimas de desarrollo para estos parámetros son de 7.2 y 0.99 respectivamente. El desarrollo de *E. coli* se detiene a pH extremos (inferiores a 3.8, o superiores a 9.5), y valores de *A<sub>w</sub>* inferiores a 0.94. Por ello, el grado de acidez de un alimento puede constituir un factor de protección y garantizar su seguridad (Rodríguez-Angeles, 2002).

En su hábitat natural, viven en el intestino inferior de la mayoría de los mamíferos sanos y, por tanto, en las aguas residuales. En los seres humanos, *E. coli* se adhiere a la mucosidad del intestino

grosso y coloniza el tracto gastrointestinal del bebé dentro de las 48 horas posteriores a la primera comida. (F. C. M. Vásquez, Martínez, Mancera, Ávila, & Vargas, 2007).

2.3.2.1 Patogenicidad de *Escherichia coli*. *E. coli* cuenta con numerosas cepas que se pueden encontrar en patología humana y que presentan una virulencia marcada. Se sabe que causan gastroenteritis en los niños, especialmente en los países en desarrollo, y casi 1 millón de niños mueren cada año por deshidratación y otras complicaciones. Esta familia de patógenos también incluye a *E. coli* O157:H7 que en USA causa al menos 20.000 casos de diarrea sanguinolenta y más de 200 muertes al año, debido a insuficiencia renal que ocurre especialmente en niños pequeños y ancianos (Rodríguez-Angeles, 2002).

2.3.2.2 Factores de patogenicidad. La patogenicidad es función de algunos antígenos superficiales y de las toxinas que generan. Así, las fimbrias actúan aportando su capacidad de adherencia, los antígenos O y K presentan propiedades anti fagocitarias e inhibitoras de las sustancias bactericidas del suero, y son responsables de la virulencia de las cepas invasivas, cuya síntesis está codificada por genes que se encuentran en plásmidos de elevado peso molecular. Presentan una endotoxina ligada al lipopolisacárido, en especial el lípido A, responsable de la acción pirógena y probablemente de las alteraciones vasculares que se producen en las infecciones generalizadas. Algunas cepas pueden producir exotoxinas responsables de la producción de diarreas, cuya síntesis está codificada por la presencia de plásmidos, que a su vez pueden contener genes asociados con la capacidad de adherencia y otras propiedades (producción de colicinas, hemolisinas y resistencias a los antibióticos). Por otra parte, las cepas de *E. coli* enteroinvasivas están caracterizadas por su capacidad de penetrar e invadir las células del epitelio intestinal. Se considera que la capacidad de penetración es debida a la presencia de antígenos superficiales, en especial de proteínas de la membrana externa, cuya síntesis está codificada por plásmidos, al igual que se ha demostrado en el género *Shigella* (Rodríguez-Angeles, 2002).

2.3.2.3 Cepas patógenas. Se ha sugerido en algunas *E. coli* enteropatógenos la posibilidad de

producción de enterotoxinas semejantes a las producidas por *Shigella dysenteriae* (enterotoxinas citotóxicas), que presentarían una acción tóxica directa sobre las células del epitelio intestinal, responsable de la destrucción de las microvellosidades del enterocito y de la producción de la diarrea. También se ha demostrado que el serotipo 0:157 produce una enterotoxina citotóxica (verotoxina) sobre las células endoteliales de los vasos responsables de diarreas hemorrágicas (Rodríguez-Angeles, 2002).

Las EHEC (*E. coli* enterohemorrágicas) constituyen un grupo de bacterias patógenas responsables de un número de infecciones en constante aumento. En los años 80, las EHECS y particularmente el serotipo 0157:H7 fueron patógenos emergentes. En concreto, su importancia para la salud pública aparece en 1982, por un brote en Estados Unidos. Esta bacteria también ha provocado numerosas muertes en los últimos años (en Japón, Estados Unidos, Canadá, Escocia y Francia). Actualmente se han reportado 100 diferentes EHEC como productoras de toxina Shiga. Los EHEC son responsables de manifestaciones clínicas variadas, que van desde una diarrea banal a una colitis hemorrágica que puede evolucionar en un 10% de los casos hacia un síndrome hemolítico y urémico (SHU) en niños y ancianos, o púrpura trombocitopénica trombótica en adultos, una enfermedad que consiste en un trastorno de la sangre que provoca la formación de coágulos de sangre en pequeños vasos sanguíneos. Esto lleva a un bajo conteo plaquetario (trombocitopenia). También hay otras *E. coli*, no O157 y productoras de la toxina Shiga (STEC) como O55, O111, O26, O103:H2; O148:H8 (Rodríguez-Angeles, 2002).

#### 2.4. Factores que Afectan el Crecimiento Microbiano

Todos los microorganismos, como todo ser vivo, requieren de un conjunto de elementos que les permitan crecer/sobrevivir en un ambiente determinado. Estos factores difieren claramente para cada microorganismo. Entonces, en general, las bacterias requieren un ambiente diferente al de las levaduras, las levaduras requieren un ambiente diferente al de los hongos, etc. Estos factores se pueden agrupar de la siguiente manera:

- ❖ Factores intrínsecos (características propias del alimento): pH, disponibilidad de agua

(Aw), potencial redox (Eh), nutrientes, microestructura, antimicrobianos naturales, viscosidad.

- ❖ Factores extrínsecos: temperatura de almacenamiento, atmósfera gaseosa ambiental, humedad ambiental.
- ❖ Procesamiento: tratamientos térmicos (cocción), tipo de envasado, aditivos, presiones...
- ❖ Otros: flora natural (competencia-sinergismo), microorganismos (fisiología, injuria)

Existen ciertos factores que controlan el crecimiento de microorganismos en el queso, estos incluyen la actividad del agua, la concentración de sal, el potencial de oxidación-reducción, el pH, el NO<sub>3</sub>, la temperatura y, quizás, la producción de bacteriocinas por algunos microorganismos. Estos factores se denominan "obstáculos". El efecto de los obstáculos individuales puede no ser significativo, pero todos ellos actuando juntos conducen a un control considerable. Otros compuestos producidos durante la fabricación y maduración de la cuajada, por ejemplo, el agua y los ácidos grasos, también inhiben el crecimiento microbiano, pero las concentraciones de estos producidos por los iniciadores en el queso no son lo suficientemente altas como para tener un efecto significativo sobre las bacterias (A. Hayaloglu, 2016).

### **2.4.1 Actividad de Agua**

El agua es uno de los componentes principales de los alimentos y también es un elemento directamente relacionado con la vida útil de los alimentos. De toda el agua contenida en los alimentos, una parte constituye su estructura molecular y otra es gratuita o está disponible. Los microorganismos se aprovechan de esto y se multiplican en los alimentos, reduciendo la calidad y poniendo en peligro la seguridad alimentaria. En ciencia de los alimentos hablamos de actividad del agua (Aw), que se refiere a la cantidad de agua libre presente en un alimento. Este es un parámetro importante ya que determina la vida útil y los tipos de microorganismos que pueden crecer dentro de este alimento (Cardona, 2019).

**Cuadro 4.** Contenido de aw en alimentos

<i>Alimento</i>	<i>Aw</i>
Carne fresca	0.98
Frutas frescas y enlatada	0.97
Verduras	0.97
Huevos	0.97
Jugos	0.97
Leche	0.97
Queso	0.95
Pan	0.94
Conservas	0.88
Mermelada	0.86
Frutos secos	0.73
Miel	0.70
Pasta	0.50
Galletas y Cereales	0.35
Leche en polvo	0.20
Azúcar	0.10

Adaptado de Badui Dergal (2016) y Murtagh (1993)

La actividad del agua se define como la presión parcial de vapor de agua en equilibrio con el alimento dividido por la presión parcial de vapor de agua en condiciones estándar (presión de vapor parcial del agua pura a la misma temperatura), (Cardona, 2019).

Los valores de la actividad de agua afectan con fuerza a la tendencia de un alimento a sufrir alteraciones de origen microbiano, enzimático o químico. los niveles de actividad de agua que contribuyen a la alteración del alimento varían de acuerdo con el tipo de alimento, la concentración de solutos, temperatura, pH, presencia de aditivos humectantes y otros muchos factores (Bello, 2000). Se ha observado que los alimentos desecados, cuyo contenido acuoso se sitúa entre el 5 y el 10%, tiene actividades de agua situadas en la zona más baja de las isotermas, que se suponen corresponden al agua enlazada como monocapa y multicapa. en este rango de actividad de agua (menor a 0.2), los alimentos requieren un mínimo de procesado o de conservación para ofrecer una buena estabilidad durante su conservación (Bello, 2000).

En general, mientras más alta sea la actividad de agua y más se acerque a 1.0, que es la del agua pura, mayor será su inestabilidad, por ejemplo, en carnes, frutas y vegetales frescos que requieren refrigeración por esta causa (Cuadro 3). Por el contrario, los alimentos estables a temperatura

ambiente (excepto los tratados térmicamente y comercialmente estériles, como los enlatados), son bajos en actividad de agua como sucede con los de humedad intermedia en los que el crecimiento microbiano es retardado (Badui Dergal, 2016).

Para su crecimiento, los microorganismos necesitan condiciones propicias de pH, de nutrientes, de oxígeno, de presión, de temperatura y de actividad de agua; como regla general, esta última tendrá que ser mayor a medida que los otros parámetros se vuelvan menos favorables. Por cada 0.1 unidades de aumento de actividad de agua el crecimiento microbiano puede incrementarse 100 %, Hasta llegar a un límite. Los que más agua requieren son las bacterias, después las levaduras y luego los hongos (Cuadro 4); de todos, los patógenos son los que más la necesitan para su desarrollo, situación contraria a las levaduras osmófilas. Como regla, la actividad de agua mínima para la producción de toxinas es mayor que para el crecimiento microbiano. la reducción de la disponibilidad de agua inhibe dicho crecimiento, pero a su vez incrementa la resistencia térmica de los microorganismos, lo que indica que para destruirlos es mejor el calor húmedo que el calor seco. Los microorganismos responden a una baja humedad, prolongando su fase inicial, bajando la fase logarítmica y reduciendo el número de células viables (Badui Dergal, 2016).

**Cuadro 5.** Valores de Aw para el crecimiento de microorganismos

<b>Organismo</b>	<b>Aw mínima</b>
Mayoría de bacterias dañinas	0.91
Mayoría de levaduras dañinas	0.88
Mayoría de hongos dañinos	0.80
Bacteria halófila	0.75
Levadura osmófila	0.60
<i>Salmonella</i>	0.95
<i>Clostridium botulinum</i>	0.95
<i>Escherichia coli</i>	0.96
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.86
<i>Bacillus subtilis</i>	0.95

Adaptado de Badui Dergal (2016)

### 2.4.2. Sal

Tiene sentido que la sal ayude a conservar los alimentos, ya que las bacterias que los estropean necesitan humedad para crecer y madurar. La sal elimina la humedad de los alimentos mediante un proceso llamado ósmosis. Esto significa que elimina el agua de los alimentos, reduciendo su actividad hídrica casi por completo. Sin embargo, este no es el único mecanismo de conservación de la sal. (Badui Dergal, 2016).

La acción de la sal está íntimamente relacionada con la reducción de  $A_w$  que ocurre cuando la sal (o cualquier soluto) se disuelve en agua. En el queso, la concentración de sal varía desde quizás el 0.4% en el queso Emmental hasta el 5% en el queso azul. Al calcular el efecto inhibitorio de la sal en el queso, es la cantidad de sal disuelta en el agua (SM) del queso, en lugar de la concentración real de sal, el parámetro importante. El SM en el queso Cheddar varía del 4 al 6% (A. Hayaloglu, 2016).

La mayoría de los quesos son salados en salmuera; el queso cheddar es una excepción y se sala en seco. En los quesos salados en salmuera, existe un gradiente de sal (exterior más alto, interior más bajo) al comienzo de la maduración, que disminuye relativamente lentamente durante la maduración. Todos los quesos en salmuera contienen un alto nivel de sal en las capas superficiales; por lo tanto, los microorganismos secundarios que crecen en la superficie deben ser tolerantes a la sal. La mayoría de los Corineformes, micrococos y estafilococos pueden crecer en presencia de NaCl al 10 a 15%. El crecimiento de *P. camemberti* no se ve afectado en gran medida por el NaCl al 10%, y algunas cepas de *P. roqueforti* pueden tolerar el NaCl al 20%. *Geotrichum candidum* es bastante sensible a la sal. En presencia de 1% de NaCl, su crecimiento puede reducirse al 1% de NaCl y se inhibe completamente al 6%. Por lo tanto, demasiada salmuera evitará su crecimiento en la superficie del queso. Su intolerancia a la sal puede explicar por qué *G. candidum* generalmente se agrega deliberadamente en la fabricación de quesos maduros en la superficie, con la esperanza de que crezcan algunas células (A. Hayaloglu, 2016).

### 2.4.3 Potencial Redox

El potencial redox es uno de los factores selectivos más importantes en cualquier entorno para controlar el crecimiento y desarrollo de microorganismos, influyendo en los tipos de microorganismos presentes y los procesos metabólicos de sus sustancias. Se denomina reacción de reducción-oxidación, de óxido-reducción o, simplemente, reacción redox, a toda reacción química en la que uno o más electrones se transfieren entre los reactivos, provocando un cambio en sus estados de oxidación. Para que exista una reacción de reducción-oxidación, en el sistema debe haber un elemento que ceda electrones y otro que los acepte. El agente reductor es aquel elemento químico que suministra electrones al medio, aumentando su estado de oxidación, es decir, siendo oxidado; mientras que un agente oxidante capta esos electrones, quedando con un estado de oxidación inferior, es decir, siendo reducido. Muchas sustancias desinfectantes afectan el potencial redox de una solución, lo que permite monitorear y controlar su efectividad en todo momento (González Cortés *et al.*, 2010).

El potencial de oxidación-reducción (Eh) es una medida de la capacidad de los sistemas químicos y bioquímicos para oxidarse (perder electrones) o reducir (ganar electrones). La Eh de la leche es aproximadamente 150 mV y la del queso es aproximadamente 250 mV. El mecanismo exacto de disminución de Eh cuando el queso se produce a partir de leche no está claro, pero probablemente esté relacionado con la fermentación de lactosa a ácido láctico por el iniciador durante el crecimiento. En el Eh bajo, el queso es esencialmente un sistema anaeróbico, en el queso solo pueden crecer microorganismos anaeróbicos facultativa. Por lo tanto, los aerobios obligados, como *Brevibacterium* y *Micrococcus spp.*, No crecen dentro del queso, incluso cuando otras condiciones de crecimiento son favorables (A. Hayaloglu, 2016).

### 2.4.4 pH y Ácidos Orgánicos.

La mayoría de las bacterias requieren un valor de pH neutro para un crecimiento óptimo y presentan un crecimiento deficiente a valores de pH <5.0. El pH de la cuajada de queso después de la

fabricación generalmente se encuentra dentro del rango de 4.5 a 5.3, por lo que el pH es un factor importante para controlar el crecimiento bacteriano en el queso. Las BAL, en especial los lactobacilos, generalmente tienen un pH óptimo por debajo de 7, y *Lactobacillus spp.* puede crecer a valores de pH de 4.0; la mayoría de las levaduras y mohos tienen un pH óptimo de 5-7 pero pueden crecer a valores de pH <3.0. Se cree que los Corineformes y los micrococos no pueden crecer por debajo de pH 5.5 o 6.0 (A. Hayaloglu, 2016). En la Cuadro 4 podemos encontrar los rangos de pH a los que crecen algunas bacterias.

Se cree que la eficacia de los ácidos orgánicos como inhibidores del crecimiento microbiano depende de la cantidad de ácido no disociado presente y, por tanto, de la constante de disociación (pKa) y del pH. Los principales ácidos que se encuentran en el queso son propiónico, acético y láctico, y estos tienen valores de pKa de 4.87, 4.75 y 3.08, respectivamente, de modo que a la misma concentración el ácido láctico es el inhibidor menor y el propiónico el más eficaz. Sin embargo, la concentración del ácido también es importante y, en el queso, el lactato está invariablemente presente en la cuajada de queso joven en concentraciones mucho mayores que las de los otros dos ácidos. El pH de muchos quesos blandos aumenta característicamente durante la maduración, particularmente en la superficie, y esto reducirá las propiedades inhibitoras de la superficie. El ácido propiónico es muy eficaz para reprimir el crecimiento de mohos (A. Hayaloglu, 2016).

**Cuadro 6.** Rangos de pH para el crecimiento de bacterias

Bacteria	Mínimo	Óptimo	Máximo
<i>Clostridium perfringens</i>	5	7.2	9
<i>Bacillus cereus</i>	4.3	6 – 7	9.3
<i>Campylobacter spp.</i>	5	6.5 – 7.5	8
<i>Shigella spp.</i>	4.8		9.3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4.8	7.8 – 8.6	11
<i>Clostridium botulinum</i>	4.6		9
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	7 – 8	9.8
<i>Escherichia coli</i>	4	6 – 7	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.4	6 – 7	9.4
<i>Salmonella spp.</i>	3.7	7 – 7.5	9.5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4.2	7.2	10

### 2.4.5 Nitratos

Los nitratos y los nitritos son aditivos que se emplean como conservantes en productos cárnicos curados (chorizo, salchichón, caña de lomo, jamón, salchichas cocidas, etc.) o productos cárnicos esterilizados (salchichas cocidas) y excepcionalmente en algunos preparados de carne (lomo de cerdo adobado, pincho moruno, careta de cerdo adobada, costilla de cerdo adobada). Los más utilizados son nitrito potásico (E-249), nitrito sódico (E-250), nitrato sódico (E-251) y nitrato potásico (E-252), conociéndose a la mezcla de sal con nitratos y/o nitritos con el nombre de «sal curante» o «sal de curación», cuyas funciones en los productos curados son el desarrollo del aroma y del sabor, el desarrollo y estabilización del color característico de estos productos y, sobre todo, evitar el desarrollo de las esporas de *Clostridium botulinum*, causante del botulismo. El nitrato ( $\text{NO}_3$ ), como  $\text{KNO}_3$  (salitre) o  $\text{NaNO}_3$ , se agrega a la leche (20 g 100 l 1) para algunos quesos, especialmente los quesos de tipo holandés como Gouda y Edam, para prevenir la producción temprana y tardía de gases por coliformes y *Clostridium tyrobutyricum*, respectivamente. El inhibidor real es el  $\text{NO}_2$ , que se forma a partir del  $\text{NO}_3$  por la xantina oxidoreductasa en la leche o la cuajada. El mecanismo exacto por el cual el  $\text{NO}_2$  previene el crecimiento microbiano no está claro. El  $\text{NO}_2$  es un inhibidor eficaz de los clostridios, pero no inhibe los coliformes (A. Hayaloglu, 2016).

### 2.4.6 Temperatura

Además de la higiene, también es importante el control de la temperatura en la manipulación de alimentos. El mantenimiento y almacenamiento en condiciones apropiadas de baja temperatura y el establecimiento y control de temperaturas óptimas de cocción son esenciales para reducir el riesgo de crecimiento de patógenos. Uno de los requisitos de seguridad y temperatura de los alimentos es mantener los alimentos fríos suficientemente fríos y los calientes muy calientes. Y la temperatura actúa como una barrera para prevenir el crecimiento microbiano y la producción de toxinas. El efecto de la temperatura en los alimentos y en el desarrollo de bacterias patógenas varía

en función de los grados que se aplican: a más de 65 °C, se destruyen; entre 5-10 °C y 65 °C, se evita la multiplicación; y de 8 °C a -18 °C, los patógenos se mantienen en estado latente, no se eliminan. No se entiende la seguridad alimentaria sin la temperatura (refrigeración, cocción o almacenamiento), ya que la refrigeración, entre 4 °C y 7 °C, que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos. Debe tenerse en cuenta que, a medida que la temperatura disminuye, se reduce también la velocidad de crecimiento de muchos de los microorganismos hasta el punto en que se detiene. De ahí que se consiga alargar la vida útil del producto y baje el riesgo microbiológico (Hayaloglu, 2016).

Las altas temperaturas favorecen la maduración de microorganismos iniciadores y no iniciadores, pero también el crecimiento de bacterias patógenas y perjudiciales. Por lo general, el queso Cheddar se madura a 6-8 °C, mientras que los quesos madurados con moho se maduran a 10-15 °C. El queso emmental se madura inicialmente durante 2-3 semanas a una temperatura baja (12 C), después de lo cual la temperatura se aumenta a 20-24 °C y se mantiene durante 2-4 semanas para promover el crecimiento de BAL y la fermentación de lactato a propionato y acetato; la temperatura se reduce luego de nuevo a 4 °C. Para los quesos blandos, también se controla la humedad ambiental para evitar la evaporación excesiva del agua de la superficie del queso. (A. A. Hayaloglu, 2016).

#### **2.4.7 Bacterias Ácido Lácticas**

Los alimentos no sólo son una fuente de nutrientes, sino que también sirven como un medio ideal para que crezcan los microorganismos. Las bacterias del ácido láctico (BAL) son microorganismos con una variedad de usos, siendo uno de los principales la fermentación de alimentos como la leche, la carne y las verduras para producir productos como yogur, queso, salchichas y encurtidos (Ramirez Ramirez, Rosas Ulloa, Velazquez Gonzalez, Ulloa, & Arce Romero, 2011).

Las bacterias del ácido láctico no sólo contribuyen a la bioconservación de los alimentos, sino que también mejoran propiedades sensoriales como el sabor, el olor y la textura, y mejoran la calidad

nutricional. Además, los probióticos son cepas bacterianas puras o mezclas de cepas bacterianas que mejoran la salud cuando los humanos y los animales los consumen en cantidades suficientes. (Parra Huertas, 2010).

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y bencidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr, Chill, & Maida, 2002). Además las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6, y la mayoría crece a un pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medio donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (Carr *et al.*, 2002).

2.4.7.1 Clasificación. La clasificación de las BAL en géneros diferentes es basada en principio en la morfología, modo de fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración de ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina. En la naturaleza existen los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Sin embargo, los géneros más recientes son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Axelsson & Ahrné, 2000).

2.4.7.2 Características fermentativas. Existen diversos géneros de BAL; sin embargo, éstas son agrupadas como homofermentadoras o heterofermentadoras basado en el producto final de su fermentación. las homofermentadoras como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como el producto principal en la fermentación de la glucosa utilizando la vía de la glucólisis (Axelsson &

Ahrné, 2000). Por su parte, las del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacillus* son heterofermentadoras y convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, cantidades significantes de otros productos como acetato, etanol y CO<sub>2</sub> (Axelsson & Ahrné, 2000).

2.4.7.3 Componentes antimicrobianos. La acción conservadora las bacterias ácido lácticas es debido a la inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y dañinos por varios productos finales en la fermentación. Estas sustancias son ácidos como el láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacterias y productos secundarios generados por la acción de la lacto peroxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocianato (Shirai, Guerrero, & Lara, 1996). Las bacteriocinas son moléculas que tienen estructura tipo péptido o proteínas biológicamente activas, las cuales presentan acción bacteriana sobre receptores específicos de las células; además, la composición química de estas sustancias es muy variada y su modo de acción específico (S. M. Vásquez, Suárez, & Zapata, 2009).

### **3. PROCESO DE MANUFACTURA DEL QUESO COMO MÉTODO DE CONSERVACIÓN DE LA LECHE**

Chacón-Flores, N.A.<sup>a</sup>, Olivas, G.I.<sup>a</sup>, Acosta-Muñiz, C.H.<sup>a</sup>, Gutiérrez-Méndez, N.<sup>b</sup>, Sepúlveda, D.R.<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo; C.P. 31570; Cuauhtémoc, Chihuahua.

<sup>b</sup> Universidad Autónoma de Chihuahua; CP 31000; Chihuahua, Chihuahua.

nidia.chacon@estudiantes.ciad.mx; golivas@ciad.mx; cacosta@ciad.mx; ngutierrez@uach.mx;  
dsepulveda@ciad.mx\*

01 julio 2023

RIIT Revista Internacional de Investigación e Innovación tecnológica

[https://riit.com.mx/apps/site/idem.php?module=Catalog&action=ViewItem&id=6216&item\\_id=85558](https://riit.com.mx/apps/site/idem.php?module=Catalog&action=ViewItem&id=6216&item_id=85558)



## Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: [www.riit.com.mx](http://www.riit.com.mx)

### Proceso de manufactura del Queso como método de conservación de la leche Cheese manufacture process as a milk preservation method

Chacón-Flores, N.A.<sup>a</sup>, Olivas, G.I.<sup>a</sup>, Acosta-Muñiz, C.H.<sup>a</sup>, Gutiérrez-Méndez, N.<sup>b</sup>, Sepúlveda, D.R.<sup>\*\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo; C.P. 31570; Cuauhtémoc, Chihuahua.

<sup>b</sup> Universidad Autónoma de Chihuahua; CP 31000; Chihuahua, Chihuahua.

[nidia.chacon@estudiantes.ciad.mx](mailto:nidia.chacon@estudiantes.ciad.mx); [golivas@ciad.mx](mailto:golivas@ciad.mx); [cacosta@ciad.mx](mailto:cacosta@ciad.mx); [ngutierrez@uach.mx](mailto:ngutierrez@uach.mx); [dsepulveda@ciad.mx](mailto:dsepulveda@ciad.mx)\*

**Innovación tecnológica:** Conocer y aplicar los procedimientos adecuados en la fabricación de queso para conseguir un producto final inocuo.

**Área de aplicación industrial:** Ciencia de alimentos.

Recibido: 04 julio 2022

Aceptado: 08 mayo 2023

#### Abstract

Cheese is a product with various benefits such as high nutritional quality, excellent flavor, pleasant texture, versatility of use, and extended shelf life. However, when produced under poor manufacturing practices, it is also susceptible to contamination with disease-causing microorganisms. There are reasons to presume that the conditions used in the process can reduce or eliminate the population of undesirable microorganisms in the final product, therefore the objective of this document is to analyze how the cheese-making process can inhibit the growth of pathogenic microorganisms. In most manufacturing processes, growth of pathogens is observed in the initial stages and then it begins to decrease as the process progresses. There are several factors that contribute to the reduction of pathogens such as the addition of lactic cultures, antimicrobials, temperatures, pH, water activity reduction, storage conditions and the variety of manufactured cheese. Of the treatments and factors considered in this article, it was found that the stretching temperature (80 °C for 5 minutes) in mozzarella cheese is a defining factor on the inhibition of pathogens inoculated at an initial concentration of 100,000 cfu/ml. Low-moisture hard cheeses are safe to consume within a week of their manufacture, thanks to the conditions found in their processes, as well as the characteristics of the finished product.

**Keywords:** Cheese, Escherichia coli, Cheese manufacture, Staphylococcus aureus, Food safety.

## Resumen

El queso es un producto con diversos beneficios como su alta calidad nutricional, excelente sabor, textura agradable, versatilidad de uso y extendida vida de anaquel. Sin embargo, cuando se elabora bajo malas prácticas de manufactura también es susceptible a la contaminación con microorganismos causantes de enfermedades. Existen motivos para suponer que las condiciones empleadas en el proceso pueden disminuir o eliminar las poblaciones de microorganismos indeseables en el producto final, por ello el objetivo de este documento es analizar cómo el proceso de elaboración de queso, puede inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. En la mayoría de los procesos de elaboración se observa un crecimiento de patógenos en etapas iniciales y después comienza a disminuir mientras avanza el proceso. Existen varios factores que contribuyen a la disminución de patógenos como la adición de cultivos lácticos, antimicrobianos, temperaturas, pH, reducción de la actividad de agua, condiciones de almacenamiento y la variedad de queso fabricado. De los tratamientos y factores que se consideran en este artículo se encontró que la temperatura de estiramiento (80 °C por 5 minutos) en el queso mozzarella es un factor clave en la inhibición total de patógenos inoculados a una concentración inicial de 100 000 ufc/ml. Los quesos duros de baja humedad son seguros para consumirse a una semana de su manufactura, gracias a las condiciones encontradas en sus procesos, así como a las características del producto terminado.

*Palabras clave:* Queso, *Escherichia coli*, Proceso de manufactura de queso, Inocuidad de alimentos.

## I. Introducción

La leche es una peculiar solución acuosa de proteínas, carbohidratos y sales minerales que además contiene grasa emulsionada en la forma de glóbulos, y proteínas altamente especializadas (caseínas) formando micelas ricas en minerales en suspensión coloidal [1]. Este alimento es una rica fuente de nutrientes para el ser humano, lo cual también lo vuelve un excelente medio para el desarrollo de las bacterias que se encuentran en el medio ambiente, las cuales pueden contaminar la leche y proliferar en ella. Algunos de estos microorganismos son indeseables, ya que pueden provocar enfermedades al ser humano o deteriorar la calidad de la leche. Los principales microorganismos patógenos generadores de alertas alimentarias son: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Brucella abortus* y *Streptococcus agalactiae* [2]. Por otra parte, se

pueden encontrar otros microorganismos conocidos como bacterias ácido lácticas que son capaces de consumir la lactosa como fuente de energía y producir ácido láctico como subproducto, lo cual, a través de la historia ha dado lugar al surgimiento de los productos lácteos fermentados [3]. Los géneros de bacterias ácido lácticas más representativas son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* [4].

Durante el proceso de manufactura de los productos lácteos, la leche es sometida a diferentes operaciones que la transforman en alimentos radicalmente diferentes en sus características organolépticas, los cuales sin embargo conservan su calidad nutricional, como sucede en el caso de la manufactura de queso [5]. Las ventajas derivadas de transformar la leche en queso son evidentes en lo referente a su vida de anaquel y estabilidad durante el almacenamiento [6].

Así mismo, al disminuir el contenido de agua se reduce el peso de los productos, lo que facilita su transporte [7]. Finalmente, la transformación de la leche en queso provee de un medio muy efectivo para diversificar la dieta humana desde un punto de vista sensorial [8].

La fabricación y la maduración de queso representan una serie de eventos bioquímicos consecutivos que, si están bien sincronizados y equilibrados, conducen a la generación de productos inocuos, con aromas y sabores altamente deseables. Condiciones de manufactura inapropiadas, sin embargo, pueden resultar en productos dañinos a la salud, y/o con sabores y olores desagradables [9]. La calidad y composición del queso está también fuertemente influenciada por las características de la leche empleada en su manufactura, especialmente su calidad microbiológica, su contenido de grasa, proteína, calcio y pH [10].

Las diversas técnicas para la fabricación del queso se han venido desarrollando desde hace siglos como un medio para conservar la leche cruda a través de su fermentación [11]. La selección natural de la flora necesaria para la fermentación de la leche, o la adición directa de estos organismos como cultivos iniciadores, ayuda a conservar los productos y permite la competencia de la flora benéfica con contaminantes microbianos, incluidos los patógenos humanos. Otros factores que contribuyen a asegurar la inocuidad del queso son el uso de tratamientos térmicos como la cocción de la cuajada, la adición de sal, y el control de las condiciones de temperatura y humedad ambiental durante la maduración [12].

En la actualidad, la manufactura de queso es una actividad que se beneficia del conocimiento desarrollado por una amplia gama de disciplinas científicas. Entre ellas destacan la microbiología, química,

bioquímica, enzimología, y biología molecular, entre otras [1]. El objetivo del presente artículo es documentar la efectividad del proceso de elaboración de queso, como método de conservación de la leche. Se presenta un compendio de información científica a partir de la cual se puede determinar la participación de cada una de las diferentes operaciones unitarias empleadas en la manufactura de quesos como elementos clave en asegurar la inocuidad microbiológica de los productos elaborados. Aunque son diversos los microorganismos patógenos que pueden estar presentes en la leche [2], este artículo se enfoca en evaluar la sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* durante el proceso de manufactura del queso. Estos microorganismos son considerados como representativos del resto de microorganismos patógenos ya que *Escherichia coli* es un importante indicador de contaminación fecal que advierte la presencia de otros patógenos [13], mientras que *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos no formadores de esporas más resistentes a principios bactericidas, pudiendo sobrevivir durante largos periodos de tiempo en ambientes hostiles.

## II. Queso

### 2.1 Proceso de elaboración de queso

La fabricación de queso puede definirse como el conjunto de operaciones realizadas a la leche durante un periodo de alrededor de 24 horas para convertirla en una sustancia sólida o semisólida [14]. Es importante considerar, sin embargo, que la deshidratación controlada o maduración, en algunas ocasiones puede requerir periodos más prolongados. Aunque el protocolo de fabricación para variedades individuales difiere en detalle, los pasos básicos más comunes a la mayoría de las variedades son: acidificación, coagulación, deshidratación (corte del coágulo, cocción, agitación, prensado, salado y otras operaciones que promueven la sinéresis en

gel), conformación (moldeado y prensado) y salado (cuando no se ha realizado previamente) [15]. La fabricación de queso es esencialmente un proceso de deshidratación en el que la grasa y la caseína en la leche se concentran entre 6 y 12 veces, dependiendo de la variedad de queso de la que se trate [16]. Los niveles de humedad, contenido de sal, pH y la microflora del queso regulan y controlan los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración y determinan, la inocuidad microbiológica, el sabor, el aroma y la textura del producto final [17].

El queso proviene en primera instancia de la fermentación microbiana de la leche, en donde el descenso en el pH causado por los microorganismos modifica las características organolépticas del producto y le confiere estabilidad durante su almacenamiento [18]. Aunque típicamente esta fermentación es realizada por bacterias ácido lácticas (BAL) seleccionadas, en algunos casos los microorganismos empleados para este fin implican complejos ecosistemas microbianos, compuestos por bacterias, levaduras y hongos [19]. Adicionalmente, posteriores adecuaciones del proceso de manufactura de quesos han introducido el uso de enzimas coagulantes y otros adjuntos, que permiten obtener características particulares en cada variedad de queso [20]. Los métodos de fabricación y maduración, el tipo de leche empleada, y la composición química bruta de los quesos resultantes definen la flora microbiana remanente en los quesos, incluyendo a los microorganismos intencionalmente añadidos (BAL), así como a microorganismos contaminantes indeseables (patógenos o de deterioro) [21].

Los factores que controlan el crecimiento de microorganismos indeseables en el queso incluyen además del pH, a la actividad de agua (modificada a través de la deshidratación y la adición de sal) [22], la temperatura de proceso y de almacenamiento,

la inhibición competitiva causada por la presencia de BAL viables, y a la presencia de sustancias inhibidoras, intencionalmente añadidas, como los nitratos, o sintetizadas *in situ* por las mismas BAL, como las bacteriocinas. Desde un punto de vista de conservación de alimentos, todos estos factores son conocidos como "obstáculos". El efecto de cada uno de los obstáculos sobre la viabilidad de microorganismos indeseables puede no ser significativo por sí solo. Sin embargo, una vez que todos los obstáculos se presentan de manera simultánea, se obtiene un efecto sinérgico que produce un control considerable, lo cual es conocido en su conjunto como "tecnología de obstáculos" [23].

### III. Estudios de supervivencia de microorganismos indeseables en la elaboración de queso

Existen infinidad de microorganismos indeseables que pueden contaminar la leche y proliferar rápidamente en ella debido a la alta disponibilidad de nutrientes y a las temperaturas empleadas en la elaboración de productos lácteos [24]. Entre estos microorganismos indeseables se distinguen dos grandes grupos: los microorganismos de deterioro, que son capaces de modificar negativamente las características organolépticas del queso durante su almacenamiento, limitando su vida de anaquel, y los microorganismos patógenos, causantes de enfermedades en el ser humano, que convierten a los productos contaminados en vectores de enfermedad [25, 26].

Como ya se mencionó previamente, algunos obstáculos microbianos (actividad de agua, concentración de sal, pH y ácido láctico) presentes en el queso tienen el potencial para inhibir el desarrollo de los microorganismos indeseables [27], por lo que diversos grupos de investigación alrededor del mundo han dedicado sus esfuerzos a estudiar y

cuantificar la capacidad de los diversos parámetros de proceso y operaciones unitarias empleadas en la manufactura de quesos para inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables, asegurando una larga vida de anaquel y sobre todo la inocuidad microbiológica del producto terminado. En particular el uso de cultivos iniciadores, adición de antimicrobianos, temperatura de proceso, así como la temperatura y tiempo de almacenamiento han sido señalados como los factores más relevantes en el aseguramiento de la calidad microbiológica de quesos [28-30].

### 3.1 Cultivo iniciador

Los cultivos iniciadores empleados en la manufactura de quesos se seleccionan generalmente con base en su capacidad para producir ácido láctico a una velocidad apropiada, en su capacidad para resistir el ataque de bacteriófagos, y en su capacidad para producir aromas, sabores y texturas deseables [31]. Los microorganismos que se emplean para este fin con más frecuencia en la industria láctea son las bacterias ácido lácticas. Algunos de estos microorganismos, además de las propiedades previamente descritas, tienen la capacidad de generar productos finales de la fermentación como el ácido acético, el peróxido de hidrogeno, el diacetilo, y algunas bacteriocinas, sustancias capaces de ejercer un efecto inhibitorio sobre los microorganismos indeseables en la leche [4]. La acidez desarrollada por las bacterias lácticas (independientemente del efecto conservador de los ácidos orgánicos) contribuye a la conservación de los productos lácteos, ya que el pH encontrados en los productos fermentados (que pueden llegar a valores de pH de 4 - 5) la flora banal y los microorganismos patógenos pueden ser inhibidos en cierta medida, extendiendo la vida de anaquel, y contribuyendo a la inocuidad microbiológica del producto [32].

Considerando este interesante potencial que tiene la presencia de cultivos lácticos viables en la preservación de productos lácteos se han conducido diversas investigaciones referentes al tema. De entre éstas, resulta relevante resaltar la comparación que se realizó entre el uso de cultivos lácticos termófilos (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) y mesófilos (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*) para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157: H7 en queso feta y en queso telemes, en donde se encontró que a pesar de que se observa un incremento en la población de *E. coli* durante la fabricación de ambos tipos de queso, su presencia disminuye durante la maduración a 4 °C. En este respecto, los cultivos lácticos termófilos fueron capaces de reducir la población de *E. coli* a niveles de no-detectable después de 44 y 40 días en queso feta y telemes, respectivamente. Por otro lado, niveles de no-detectable fueron encontrados con el uso de cultivos lácticos mesófilos después de 36 y 30 días, en queso feta y telemes, respectivamente [33].

Govaris et al. (2002) nos muestran que la supervivencia de *E. coli* O157: H7 es mayor en quesos fermentados con iniciadores termófilos que con cultivos mesófilos, aunque en ambos casos queda también demostrado que un periodo de maduración de alrededor de un mes, o mes y medio a 4 °C son suficientes para erradicar la presencia de este patógeno en quesos feta y telemes [33].

Una palabra de precaución es requerida tras considerar estos razonablemente exitosos resultados ya que también existen estudios en donde el uso de cultivos lácticos, incluso de aquellos conteniendo bacterias productoras de bacteriocinas, rinde resultados menos favorables. Como ejemplo, un estudio realizado en queso feta y camembert en donde se estudió la capacidad de cultivos lácticos

mesófilos en combinación con *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, una cepa productora de nisina, para inhibir el desarrollo de *E. coli* O157: H7. En este caso, la población de *E. coli* O157: H7 en queso feta se incrementó en 4 ciclos logarítmicos durante los primeros diez días de almacenamiento a 2 °C, alcanzando niveles de alrededor de 8 ciclos logarítmicos (UFC/g), lo cual indudablemente implica un grave riesgo a la salud de los consumidores. Un posterior descenso en los números de *E. coli* O157: H7 observado a partir del día 20 de almacenamiento fue insuficiente para reducir la población a niveles aceptables, terminando tras 75 días de almacenamiento en niveles 1.5 ciclos logarítmicos superiores a los presentes al principio del proceso. En el caso del queso camembert los resultados fueron similares, observándose un pico (3 ciclos logarítmicos) en el incremento de la población de *E. coli* O157: H7 a las 24 horas, seguido por un descenso que terminó en niveles 1.5 ciclos logarítmicos superiores a los iniciales tras 65 días de almacenamiento a 2 °C [34].

Las discrepancias entre los resultados de este estudio y el descrito previamente son evidentes y alarmantes, ilustrando que el uso de cultivos lácticos como única herramienta para asegurar la inocuidad de los quesos es insuficiente, ya que su efectividad puede variar ampliamente dependiendo del tipo de cultivos lácticos empleados, así como de otras condiciones ambientales relevantes, como el pH del producto y la temperatura de almacenamiento.

Para demostrar la gran variabilidad de resultados que se pueden obtener con diferentes tipos de cultivos lácticos podemos citar un estudio en donde se evaluó la efectividad de varios *lactobacilos* y *lactococos* de manera individual y en combinación, para inhibir el desarrollo de *E. coli* enteropatógena en queso camembert.

En este estudio el uso de cepas individuales de cultivos lácticos probó ser insuficiente para controlar el desarrollo de *E. coli* mostrando un incremento de alrededor de 4 ciclos logarítmicos en su población a las 24 horas (de manera similar al estudio previamente descrito), seguido de un descenso después de 63 días de almacenamiento que terminó en todos los casos con poblaciones de *E. coli* superiores a los niveles de contaminación iniciales. Las diferencias de inhibición encontradas entre cepas individuales permiten categorizarlas en función de su capacidad inhibitoria en orden de mayor a menor: *S. cremoris*> *L. helveticus*> *S. lactis*> *L. casei*> *L. bulgaricus*. Sin embargo, cuando se emplearon combinaciones de cultivos lácticos se consiguieron mejores resultados, obteniendo niveles de contaminación de *E. coli* al final del almacenamiento menores que los presentes al inicio del proceso de manufactura. Los cultivos iniciadores combinados reprimieron *E. coli* en el siguiente orden, de mayor a menor: *S. cremoris* + *L. helveticus*> *S. cremoris* + *L. bulgaricus*> *S. cremoris*, + *L. helveticus* + *S. diacetylactis*> *S. cremoris* + *S. diacetylactis*. En particular la combinación *S. cremoris* + *L. helveticus* se distinguió por causar un decremento en la población de *E. coli* por debajo de los niveles iniciales a los 7 días de almacenamiento, seguido por un descenso sostenido en la población a través de todo el tiempo de almacenamiento. Como conclusión de este estudio se puede derivar que la combinación de cultivos iniciadores es más efectiva en el control de microorganismos patógenos en comparación con el uso de cultivos individuales y que la selección adecuada de las combinaciones de cultivos lácticos es crítica [35].

Como último asunto pendiente queda determinar si la concentración inicial de patógenos contaminando la leche juega algún papel en la eficiencia del uso de cultivos

lácticos como inhibidores del desarrollo de patógenos. En este sentido se puede mencionar un estudio conducido en queso feta en donde se evaluó la capacidad de un cultivo láctico (*Streptococcus cremoris*) para inhibir el desarrollo del patógeno *S. aureus* en función de la concentración inicial de contaminación del patógeno (1, 5 y 10%). En este caso el estudio demuestra un incremento en la concentración del patógeno a las 7 horas de iniciado el proceso de manufactura, seguido de un descenso a través de 75 días de maduración (similar a los estudios previamente descritos). Los quesos con cultivos lácticos fueron capaces de reducir la concentración final del patógeno de mejor manera que los quesos sin iniciador, resultando en quesos con dos ciclos logarítmicos menos patógenos al final del periodo de maduración. De manera interesante, este estudio demuestra que la concentración inicial del patógeno no tiene ningún efecto sobre la capacidad del cultivo láctico para producir la inhibición, siendo exitoso en cualquier circunstancia. Ciertamente, cabe hacer la aclaración de que la concentración final, en cualquier caso resulta ser un porcentaje de la concentración inicial, motivo por el cual resulta de suma importancia reducir lo más posible la concentración inicial de patógenos a través del uso de buenas prácticas de producción de la leche, y buenas prácticas de manufactura del queso [36].

### 3.2 Adición de antimicrobianos

El término antimicrobiano hace referencia a aquellas sustancias con capacidad para reducir o inhibir el crecimiento de microorganismos en los alimentos [37]. El uso de estas sustancias tiene por objetivo el aumentar la seguridad de los alimentos y su vida útil. El tipo de sustancias antimicrobianas que pueden ser empleadas en quesos, así como su concentración se encuentran regulados por ley, de tal manera

que no pueden ser usados de manera indiscriminada [38]. Es por este motivo que resulta de gran interés el evaluar principios naturales, que puedan cumplir con esta función sin ser considerados como sustancias sintéticas sujetas a regulación de uso [39].

Un ejemplo del uso de antimicrobianos "naturales" lo podemos encontrar en el uso de aceites esenciales provenientes de diversos vegetales. Un estudio conducido en queso blanco iraní adicionado con 2500 - 3500 µg/ml de aceite esencial de estragón (*Artemisia dracuncululus*) determinó su capacidad para inhibir el desarrollo de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Este estudio demostró la capacidad del aceite esencial para reducir la población de *E. coli* y *S. aureus* en dos ciclos logarítmicos después de 72 h, en comparación con el queso control sin adición del aceite esencial. En todos los casos, el uso de aceite esencial demostró causar un efecto dosis-dependiente, en donde se observa mayor inhibición conforme se incrementa la cantidad del aceite adicionado [40].

Otro ejemplo del uso de antimicrobianos "naturales" se puede encontrar en la adición de metabolitos antimicrobianos sintetizados por bacterias ácido-lácticas, como es el caso de la reuterina, poderoso antimicrobiano sintetizado por *Lactobacillus reuteri*. Un estudio realizado en queso cottage contaminado con *E. coli* O157: H7 demostró que la adición de reuterina en concentraciones de 50, 100, y 150 unidades/g resulta en la reducción de la población de *E. coli* O157: H7 en 2, 3, y 6 ciclos logarítmicos después de un almacenamiento por 7 días a 7 °C. Como puede observarse, la capacidad bactericida de la reuterina es ampliamente superior a la del aceite esencial mencionado en el estudio previo, mostrando de manera semejante una capacidad bactericida dosis-dependiente [41].

Finalmente, haciendo referencia al uso de conservadores químicos convencionales

como punto de comparación, se puede mencionar el estudio conducido en queso blando hispánico, en donde se añadió sorbato de potasio (0.3%), o benzoato de sodio (0.3%), en quesos contaminados con *E. coli* O157: H7. Este estudio demostró la capacidad del sorbato y el benzoato para inhibir el desarrollo del patógeno. El queso adicionado con benzoato de sodio o con sorbato de potasio mostró ausencia de crecimiento de *E. coli* O157: H7 durante cuatro meses de almacenamiento a 12 °C, extendiendo así de manera efectiva la vida de anaquel de este producto típicamente considerado como de corta vida de anaquel debido a su alta humedad, alto pH y ausencia de cultivos lácticos [41].

### 3.3 Temperatura

La temperatura es uno de los principales factores que afectan el crecimiento y supervivencia de los microorganismos viables en leche y productos lácteos [42]. De manera general se pueden identificar tres rangos de temperatura para cada tipo de microorganismo, en donde se observa a) una temperatura de crecimiento óptimo b) una temperatura baja, debajo de la cual ya no se observa crecimiento, aunque la viabilidad de los microorganismos ya presentes no se pierde entrando en vida latente, y c) una temperatura alta, a partir de la cual los microorganismos presentes pierden viabilidad y mueren [43].

Con esta base, las diferentes temperaturas empleadas en cada una de las etapas del proceso de manufactura de quesos ejercen cierta influencia en el desarrollo o inhibición de las poblaciones microbianas, primero en la leche, luego en la cuajada, y finalmente en el queso.

Aunque en teoría, cualquier proceso de manufactura de queso debe iniciarse con la pasteurización de la leche, proceso térmico

aplicado con la intención exclusiva de inactivar microorganismos indeseables en la leche [44], en muchos casos, sobre todo en el caso de los quesos artesanales o con "Denominación de Origen Protegida" los quesos son elaborados a partir de leche "cruda", motivo por el cual resulta de especial relevancia el identificar la capacidad de otras operaciones unitarias empleadas en la manufactura de quesos para inhibir o reducir el desarrollo de microorganismos indeseables [45].

#### 3.3.1 Cocción de la cuajada

Una vez que la leche es coagulada, como paso inicial en el proceso de manufactura de quesos, la cuajada resultante es cortada y sometida a un proceso de cocimiento, con el propósito principal de reducir la humedad y promover el desarrollo de acidez y textura. Este proceso de cocimiento se aplica a la cuajada suspendida en suero en tanques agitados con calentamiento indirecto, en los cuales se incrementa la temperatura de manera paulatina. La duración e intensidad del tratamiento térmico aplicado determina las características fisicoquímicas de la cuajada cocida y de igual manera determina el potencial efecto bactericida que esta etapa del proceso de manufactura pueda causar sobre los microorganismos presentes. Con relación a esto, Peng y colaboradores realizaron un estudio en donde evaluaron el efecto de cocer la cuajada a 40 o 46 °C sobre la viabilidad de *E. coli* productor de toxinas Shiga, en un proceso de elaboración de queso semiduro. En este estudio no se encontró diferencia significativa entre las dos temperaturas de cocimiento empleadas, encontrando *E. coli* viable en todos los quesos, aun después de 16 semanas de almacenamiento refrigerado a 13 °C [46]. De manera semejante, en otro trabajo publicado se evaluó el efecto de emplear cuatro diferentes temperaturas de cocimiento (30, 36, 38 y 40 °C) sobre el desarrollo y

supervivencia de *Staphylococcus aureus* en queso manchego. En este estudio *S. aureus* alcanzó su número máximo en queso después de 24 h de manufactura, con un recuento de alrededor de 800,000 ufc/g. De igual manera que en el estudio anterior, en este estudio se demuestra que este intervalo de temperaturas de cocimiento es insuficiente para causar un efecto bactericida relevante. Inclusive, resulta relevante mencionar que los quesos elaborados con cuajada cocida a 40 °C resultaron con una población de *S. aureus* al final del proceso de manufactura superior a la observada en quesos cocidos a temperaturas más bajas, con lo que se demuestra que temperaturas de cocimiento moderadas pueden resultar en un efecto de incubación, más que de inhibición del desarrollo de microorganismos indeseables [47].

Finalmente, en otro estudio en donde se emplearon temperaturas extremas de 20 y 45 °C durante el cocimiento de la cuajada y se observó su efecto sobre el crecimiento y supervivencia de *E. coli* O157:H7 durante el proceso de elaboración de queso blanco. En este caso, si se observó una disminución en la población de *E. coli* O157:H7 durante un periodo extendido de 50 horas al emplear temperaturas de 45 °C, lo cual no se observó en el caso de las cuajadas cocidas a 20 °C. De cualquier manera en ambos casos el patógeno sobrevivió el proceso de manufactura y mantuvo su viabilidad en los quesos durante el almacenamiento refrigerado por 4 semanas [48].

Como conclusión se puede plantear que las temperaturas de cocimiento de la cuajada en general no son suficientes para causar una reducción significativa en la población de microorganismos indeseables en la cuajada, sino que al contrario típicamente resultan en un incremento en la población. Este efecto resulta razonable, ya que en general las temperaturas de cocimiento se limitan para evitar inactivar los cultivos lácticos

adicionados, ya que se busca que estos mantengan su viabilidad y continúen acidificando la cuajada en etapas posteriores. El uso de cultivos lácticos termófilos, capaces de soportar temperaturas superiores a los 55 °C, podría representar una opción viable para emplear temperaturas de cocimiento superiores que potencialmente pudieran inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables.

### 3.3.2 Estiramiento de la cuajada.

Otra etapa en el proceso de manufactura de queso en donde el uso de temperaturas elevadas puede potencialmente reducir la población de microorganismos indeseables es la etapa de malaxado o "estiramiento" de la cuajada. En esta etapa, la cuajada cocida es sometida a un tratamiento térmico por inmersión en agua o por contacto con una superficie caliente y masajeadora con la intención de inducir la reorientación de las hebras de caseína para producir una masa elástica, característica de los quesos de "pasta hilada" como el mozzarella, asadero y Oaxaca. Con respecto a la eficacia de esta operación unitaria para inhibir el desarrollo de microorganismos, se puede citar el estudio realizado por Spano y colaboradores quienes evaluaron el uso de dos temperaturas de estiramiento típicamente empleadas en la manufactura de queso mozzarella (70 y 80 °C) sobre la viabilidad de *Escherichia coli* O157:H7. La aplicación de 80 °C por 5 minutos eliminó por completo la población de *E. coli* inoculada en los quesos (100,000 ufc/g). Confirmación de la total inactivación del patógeno se obtuvo empleando un proceso de enriquecimiento tras 7 días de almacenamiento a 4 °C. Estirar la cuajada a 70 °C por otra parte, no produjo un efecto tan marcado, reduciendo la población del patógeno solamente entre uno y dos ciclos logarítmicos. Este estudio demuestra la importancia de emplear temperaturas altas durante el proceso de estiramiento para

inhibir en mayor medida el desarrollo de microorganismos indeseables [49]. La temperatura de pasteurización alta (72 °C) puede ser empleada como un criterio que permita definir el poder de inhibición de diversos tratamientos térmicos, siempre teniendo en cuenta que los procesos de transferencia de calor en quesos (conducción) se llevan a cabo de manera más lenta que los observados en leche líquida (convección).

### 3.3.3 Temperatura de almacenamiento

Una vez formados y prensados los quesos, estos son sometidos a un proceso de maduración. Este proceso de maduración se lleva a cabo en condiciones de humedad y temperatura controlada, lo cual permite manipular la velocidad a la que suceden procesos bioquímicos y microbiológicos responsables de la calidad organoléptica final del queso. Durante esta etapa se presenta potencialmente otra oportunidad dentro del proceso de manufactura de los quesos para inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables. Con respecto al efecto que ejerce la temperatura de almacenamiento sobre la supervivencia de microorganismos indeseables se puede citar un estudio en donde se evaluó el efecto de 3 temperaturas de almacenamiento (4, 8 y 28 °C) sobre la viabilidad de *Escherichia coli* O157:H7 en queso Panner almacenado por 48 horas. Bajo estas condiciones de almacenamiento, *E. coli* fue capaz de proliferar con notables aumentos en la tasa de crecimiento conforme la temperatura de almacenamiento se fue elevando. Inclusive a temperaturas de refrigeración *E. coli* fue capaz de incrementar notablemente su población al final del periodo estudiado, demostrando la incompetencia de las condiciones de almacenamiento empleadas para reducir riesgos microbiológicos en queso Panner, especialmente en periodos tan breves de tiempo [50].

Estudios semejantes, conducidos por periodos más largos de tiempo, han permitido apreciar de mejor manera el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de microorganismos patógenos.

Como ejemplo se puede mencionar un estudio realizado en quesos Monterey y Cheddar inoculados con 6.6 log ufc/g de *E. coli* O157:H7 empacados al vacío y almacenados a 4.4, 10, o 21.1 °C por 365 días. En este caso, el almacenamiento prolongado si fue capaz de reducir la población de *E. coli* produciendo descensos de más de 6 ciclos logarítmicos en su población a los 120 días de almacenamiento a temperatura de 21.1 °C. Los quesos tipo Cheddar presentaron menos desarrollo de *E. coli* en comparación con los quesos Monterey, que requirieron de más tiempo de almacenamiento para lograr reducciones comparables. Después de 60 días de almacenamiento a 4.4 °C, se observaron reducciones de 0.8 y 1.0 log ufc/g en queso tipo Monterey y Cheddar respectivamente. Cuando la temperatura de almacenamiento se aumentó a 10 °C las reducciones fueron de 0.5 y 2 log ufc/g, respectivamente. Finalmente, el aumento adicional de la temperatura de almacenamiento a 21.1 °C causó una reducción de 1.5 y 5.2 log ufc/g de *E. coli* a los 60 días de almacenamiento en queso estilo Monterey, y Cheddar respectivamente [51].

De manera semejante, la temperatura de maduración ha mostrado efectos altamente significativos sobre la sobrevivencia de *S. aureus* en queso. Un estudio realizado en queso Manchego contaminado con *S. aureus* en concentraciones iniciales de alrededor de 6 log ufc/g, elaborado con leche cruda de oveja y almacenado a 5, 10, 15 o 20 °C por 60 días demostró la capacidad de temperaturas de 20 °C de causar un descenso en la población de *S. aureus* de alrededor de 6 ciclos logarítmicos después de 60 días de almacenamiento. Por otro lado, las

temperaturas de almacenamiento de 10 °C y 15 °C causaron una reducción de 4 ciclos logarítmicos en el mismo tiempo, mientras que la temperatura de almacenamiento de 5 °C resultó en una reducción de solo 3 ciclos.

En este estudio se concluye que durante el almacenamiento prolongado de quesos, las bajas temperaturas de maduración generalmente permiten una mayor supervivencia de las bacterias patógenas en comparación con temperaturas más cercanas a la ambiente [47].

Finalmente, resulta interesante mencionar que el queso cheddar elaborado a partir de leche sin pasteurizar requiere por ley ser sometido a un periodo de maduración mínimo de 60 días, con el propósito de brindar seguridad al consumidor (Estándar de la Administración de Alimentos y Drogas de EE. UU). Para evaluar la efectividad de esta medida, se realizó un estudio en queso cheddar elaborado a partir de leche sin pasteurizar que fue inoculada experimentalmente con un coctel de 5 cepas de *E. coli* y monitoreada para determinar su viabilidad por 360 días de almacenamiento a 7 °C. Durante el almacenamiento se observó una disminución en la población de *E. coli*. Sin embargo, su presencia fue detectada aún después de 240 días de almacenamiento (7 °C), confirmando que el uso de más altas temperaturas de almacenamiento es requerido para asegurar que un periodo extendido de maduración inhiba la presencia de patógenos [52].

### 3.4 Tiempo de almacenamiento

Como ya se ha vuelto evidente desde la sección anterior, el efecto de la temperatura de almacenamiento no puede ser considerado sin tomar en cuenta la duración del almacenamiento. Típicamente, el almacenamiento del queso bajo condiciones controladas puede durar desde solo un par de

días hasta meses o años, dependiendo de la variedad de queso de que se trate.

Se han realizado diversas investigaciones enfocadas a evaluar la supervivencia de microorganismos indeseables durante la etapa de almacenamiento en función del tiempo empleado. Uno de ellos se llevó a cabo en queso Cheddar elaborado con leche pasteurizada contaminada con *E. coli*. En este estudio *E. coli* mostró una fuerte disminución en su población durante el periodo de almacenamiento a 7 °C, alcanzando una reducción de la población a menos de 1 ufc/g al día 60, aunque niveles indetectables se alcanzaron solo después de 158 días de almacenamiento [53]. Por otra parte, otro estudio que describe el comportamiento de *E. coli* durante el almacenamiento de queso Cheddar y Gouda elaborado a partir de leche sin pasteurizar estableció una concentración aproximada de 145 ufc/g en el primer día de almacenamiento. A partir de este punto, los recuentos bacterianos disminuyeron significativamente alcanzando niveles medios de 25 y 5 ufc/g en Cheddar y Gouda, respectivamente a los 60 días de almacenamiento. Sin embargo, a pesar de que *E. coli* mostró un descenso continuado en su población, vale la pena mencionar que en este estudio, el uso del método de enriquecimiento selectivo, permitió detectar presencia de *E. coli* durante más de 270 días en ambos tipos de queso [54]. Resultados semejantes se han encontrado también en queso de cabra, en donde la concentración de *E. coli* disminuye de manera continua durante la etapa de maduración por 42 días a 4 °C, alcanzando niveles 2 log ufc/ml menores que los encontrados al principio del almacenamiento, reducción suficiente para suponer su ausencia total. Sin embargo, en este estudio se pudo conseguir también la detección de *E. coli* después del enriquecimiento, incluso posteriormente a los 42 días de maduración, lo cual indica la sobrevivencia de un número limitado de células bacterianas lesionadas o

con capacidad limitada para reproducirse en condiciones normales [55].

Estudios realizados en queso Camembert inoculado con *Escherichia coli* productora de toxina Shiga han demostrado la disminución de la población durante las primeras etapas de maduración alcanzando concentraciones de  $10^2$  ufc/g después de un periodo de almacenamiento de 20 días a 4 °C [56].

Con respecto a *Staphylococcus aureus*, también se ha estudiado su supervivencia durante el almacenamiento en queso Domiati egipcio, utilizando leche sin pasteurizar con una concentración inicial de  $10^4$  ufc/g de *S. aureus*, y evaluando el efecto del almacenamiento a 30 °C. Aunque en este estudio la población de *S. aureus* aumentó rápidamente durante la fabricación del queso, se observó una disminución durante el almacenamiento hasta encontrar menos de 10 ufc/g después de 4 semanas [36]. Estudios semejantes en queso Manchego almacenado por 60 días encontraron recuentos de *S. aureus* que disminuyeron notablemente después de 35 días de almacenamiento a 15 °C, alcanzando niveles debajo del límite de detección al final del periodo de maduración [57].

Finalmente, resulta relevante mencionar experiencias obtenidas de estudios en quesos duros y semiduros con respecto a la sobrevivencia y proliferación de *E. coli* durante la maduración y almacenamiento. Los resultados muestran que los quesos duros son higiénicamente seguros una semana después de la fabricación. En general, la tecnología de fabricación de quesos duros suizos no permite el crecimiento de bacterias patógenas y conduce a una tasa de mortalidad muy rápida.

Ninguna de las bacterias patógenas inoculadas, excepto por un bajo número de *S. aureus*, se pudo encontrar en los quesos duros

experimentales un día después de la fabricación. En los quesos semiduros experimentales, *E. coli* y *S. aureus* sobrevivieron más tiempo que en los quesos duros, pero después de 90 días, cuando se completó el periodo de maduración a 5 °C, las bacterias cayeron por debajo del límite de detección [58].

#### IV. Conclusiones

El proceso de manufactura de quesos comprende una serie de operaciones unitarias que poseen el potencial de actuar como métodos de conservación, contribuyendo a asegurar la inocuidad de los quesos. Cada variedad de queso en particular requiere de condiciones específicas de proceso que permitan alcanzar las características organolépticas deseadas, con lo que la efectividad del proceso para inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables es variable. En la medida en que las condiciones de proceso impliquen el uso de temperaturas superiores a las de pasteurización, tiendan a reducir la actividad de agua y el pH, así como a promover el desarrollo de bacterias benéficas, se podrá esperar un impacto positivo en la inocuidad del producto.

La adición de bacterias ácido-lácticas en general, o en particular de aquellas capaces de sintetizar metabolitos antimicrobianos, en la leche al inicio de los procesos de manufactura de quesos ha demostrado ser una efectiva estrategia para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos. De igual manera, el uso de sustancias naturales con capacidad antimicrobiana, como los aceites esenciales vegetales, o algunos metabolitos microbianos representa una extraordinaria oportunidad para inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables desde el principio del proceso de manufactura, ya que se ha observado que es en las primeras etapas de producción de quesos en donde se

presentan los mayores incrementos en las poblaciones de microorganismos patógenos.

Ya durante el proceso de manufactura, la temperatura empleada durante el cuajado, cocción, desuerado, molido, y moldeado representa una oportunidad para inhibir bacterias indeseables si se emplean temperaturas altas, o de incubar las bacterias presentes si se emplean temperaturas cercanas a la temperatura ambiente. Altas concentraciones iniciales de bacterias indeseables conducen a concentraciones altas al final de estas etapas de proceso, mientras que altas concentraciones de BAL al inicio del proceso conduce a reducción en la población de bacterias indeseables debido al consecuente descenso del pH y a la inhibición competitiva.

Etapas de proceso adicionales empleadas en algunas variedades de queso como la cheddarización o el estiramiento de la pasta reducen adicionalmente las poblaciones de bacterias indeseables de manera exitosa. Especialmente la etapa de estirado empleada en la manufactura de quesos de pasta hilada ha probado ser capaz de reducir las poblaciones de microorganismos indeseables por debajo de los límites de detección cuando se emplean apropiadas prácticas de producción.

Finalmente, el almacenamiento extendido o maduración de los quesos ha demostrado capacidad de reducir las poblaciones de microorganismos indeseables, especialmente al emplear temperaturas cercanas a la temperatura ambiente por periodos de varios meses, y en combinación con pH y actividad de agua reducidos.

#### V. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada para

cursar el doctorado en ciencias dentro del programa del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo unidad Cuauhtémoc.

#### VI. Referencias

1. Badui D.S., 2016, *Química de los alimentos*, México, Pearson Educación.
2. Aguilera-Becerra, A.M., Urbano-Cáceres E.X, and C.P. Jaimes-Bernal, 2014, "Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria", *Ciencia y Agricultura*, vol. 11, núm. 2, julio-diciembre, pp. 83-93.
3. Parra Huertas, R.A., 2010, "Bacterias ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos", *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, vol. 8, n.1, pp. 93-105, Nacional Agraria Medellín 62, 4967-4982.
4. Ramirez Ramirez, J.C., et al., 2011, "Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud", *Revista fuente*, Año 2, no. 7, abril-junio, ISSN 2007-0713.
5. Law, B.A. and A.Y. Tamime, 2011, *Technology of cheesemaking*, Victoria Australia, John Wiley & Sons.
6. De Cangas Morán, R., et al., Desarrollo de un queso fresco con cultivos probióticos e ingredientes vegetales, *Tecnología Química*, vol. 39, no.1, ene-abr 2019, pp. 49-64.
7. Marchant, I.M.S. and A.I. sede Arica, *Manual conservación de alimentos*. Obtenido <http://www.inacap.cl/web/materialpoyocedem/profesor/Gastronomia/Man>

- uales/Manual Conservacion\_de\_Alimentos.pdf, 2019.
8. Majem, L.S., 2004, *Leche, lácteos y salud*, Buenos Aires-Bogota-Caracas Madrid-Mexico-Sao Paulo, Ed. Médica Panamericana.
  9. Fox, P.F., McSweeney, P. L.H., Cogan, T. M. and Guinee T. P., 2004, *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition ed. Volume 2, Major Cheese Groups.
  10. Fox, P.F., et al., 2017, *Fundamentals of cheese science*, Boston MA, Springer.
  11. Donnelly, C., 2004, *Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese*, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol 1, pp. 541-559.
  12. Bernal S.B., Gallegos C.D., Ibarra I.E., *Introducción a la tecnología de alimentos*, 2da ed. 2004, Mexico-España-Venezuela-Colombia, Limusa.
  13. Donnenberg, M., 2013, *Escherichia coli: pathotypes and principles of pathogenesis*, Baltimore Maryland USA, Academic Press.
  14. Fox, P.F., et al., 2004, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3er edn, Vol 1, General Aspects, London, Elsevier Academic Press.
  15. Scott, R., et al., *Fabricación de queso/Cheesemaking practice*, 2010, Springer.
  16. O'Connor, C., 1993, *Traditional cheesemaking manual*, Addis Ababa Ethiopia, ILRI (aka ILCA and ILRAD).
  17. Romero del Castillo, R.S., and J. Mestres Lagarriga, 2004, *Productos lácteos Tecnología*, 225, Barcelona, Ediciones UPC.
  18. Walstra, P., Wouters, T.M, Geurts, T.M, 2006, *Dairy Science and Technology*, second ed, Boca Raton, FL CRC/Taylor & Francis.
  19. Hayaloglu, A.A., 2016, *Cheese: Microbiology of Cheese*, Amsterdam, The Netherlands, Elsevier.
  20. Diaz, M.d., "Proceso básico de la leche y el queso", *Revista Digital Universitaria*, vol 6, no. 9, 10 septiembre 2005.
  21. Barreras, F.L., 2007, *Preelaboración y conservación de alimentos*. Buenos Aires, Libros en Red.
  22. Hayaloglu, A., 2016, *Cheese: Microbiology of Cheese*, Malatya Turkey, Inonu University.
  23. Barreiro, J.A. and A.J. Sandoval, 2006, *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas*, Caracas, Equinoccio.
  24. Rios, K.C., 2011, *Tecnología de alimentos*, Bogota Colombia, Ediciones de la U.
  25. Dubey, K.K., T. Raj, and P. Kumar, "Pathogenic microorganisms in milk: their source, hazardous role and identification", *Advances in Dairy Microbial Products*, 2022. p. 145-161, DOI: 10.1016/B978-0-323-85793-2.00005-9.
  26. Bastam, M.M., et al., "Pathogenic bacteria in cheese, raw and pasteurised milk", *Veterinary Medicine and Science*, 2021, 7(6), pp. 2445-2449, DOI: 10.1002/vms3.604.

27. D'Amico, D.J. and C.W. Donnelly, "Growth and survival of microbial pathogens in cheese", *Cheese*, 2017, pp. 573-594, DOI: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00022-3
28. Keba, A., et al., "Review of the prevalence of foodborne pathogens in milk and dairy products in Ethiopia", *International Dairy Journal*, 2020, vol. 109, pp. 104762, DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104762.
29. Farrokh, C., et al., "Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production", *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 162(2), pp. 190-212, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008.
30. Paswan, R. and Y.W. Park, "Survivability of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 pathogens and food safety concerns on commercial powder milk products", *Dairy*, 2020, 1(3), pp. 189-201, DOI: 10.3390/dairy1030014.
31. Helen, C., et al., 2003, *Tecnología de alimentos*, primera edición, Limusa.
32. Villegas de Gante, A., 2004, *Tecnología Quesera*. Primera ed. 2004: Editorial trillas.
33. Govaris, A., Papageorgiou D.K., and K. Papatheodorou K., "Behavior of *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture and ripening of feta and telemes cheeses", *Journal of Food Protection*, Abril 2002, 65(4): p. 609-615, DOI: 10.4315/0362-028x-65.4.609
34. Ramsaran, H., et al., "Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in soft cheeses", *Journal of Dairy Science*, 1998, 81(7), pp. 1810-1817.
35. Rash, K. and F. Kosikowski, "Influence of lactic acid starter bacteria on enteropathogenic *Escherichia coli* in ultrafiltration prepared Camembert cheese", *Journal of Dairy Science*, Abril 1982, 65(4), pp. 537-543, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(82)82231-5.
36. Kornacki, J.L. and Marth E.H., "Fate of nonpathogenic and enteropathogenic *Escherichia coli* during the manufacture of Colby-like cheese", *Journal of Food Protection*, marzo 1982, 45(4), pp. 310-316, DOI: 10.4315/0362-028X-45.4.310.
37. De la Fuente-Salcido, et al., "Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana", *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 2015, 46(2), pp. 7-16.
38. Miranda, M.I.R., *Inocuidad en la elaboración de quesos con respecto a la nueva NOM-243-SSA1-2010*.
39. Santamarina G.G., et al., "La microbiota del queso y su importancia funcional", *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 2020, 26(4), pp. 248-256.
40. Raeisi, M., et al., "Essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculoides*) antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in culture media and Iranian white cheese", *Iranian Journal of Microbiology*, 2012, 4(1), pp. 30.
41. Kasrazadeh, M. and C. Genigeorgis, "Potential growth and control of *Escherichia coli* O157: H7 in soft

- hispanic type cheese", *International Journal of Food Microbiology*, mayo 1995, 25(3), pp. 289-300, DOI:10.1016/0168-1605(94)00089-o.
42. Matos, A.R., et al., *Peligros biológicos e inocuidad de alimentos*. Revista Electrónica de Veterinaria, septiembre 2005, 6(9), p. 1-5.
43. Varela, G. and G. Grotiuz, *Fisiología y metabolismo bacteriano*. Uruguay, Editorial Cefa, agosto 2008: p. 43-58.
44. Molina, M.A.B., *Derivados lácteos*, 2016, Miraflores Lima Peru, Editorial Macro EIRL.
45. Batro, P., *Quesos artesanales. Historia, descripción y elaboración*, 2010, Buenos Aires, Albatros.
46. Peng, S., et al., "Fate of Shiga toxin-producing and generic *Escherichia coli* during production and ripening of semihard raw milk cheese", *Journal of Dairy Science*, febrero 2013, 96(2), pp. 815-823, DOI: 10.3168/jds.2012-5865.
47. Gaya, P., et al., "Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behaviour in Manchego cheese", *International Journal of Food Microbiology*, mayo 1988, 6(3), pp. 249-257, DOI: 10.1016/0168-1605(88)90017-7.
48. Leuschner, R.G. and M.P. Boughtflower, "Laboratory-scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, and Dublin", *Journal of Food Protection*, marzo 2002, 65(3), pp. 508-514, DOI: 10.4315/0362-028x-65.3.508.
49. Spano, G., et al., "Fate of *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture of Mozzarella cheese", *Letters in Applied Microbiology*, Enero 2003, 36(2), pp. 73-76, DOI: 10.1046/j.1472-765x.2003.01252.x.
50. Wahi, S., et al., "Growth and survival of *Escherichia coli* O157: H7 during manufacture and storage of Indian cheese (paneer)", *Foodborne Pathogens & Disease*, junio 2006, 3(2), pp. 184-189, DOI: 10.1089/fpd.2006.3.184.
51. Adhikari, A., et al., "Effect of storage time and temperature on the viability of *E. coli* O157: H7, *Salmonella* spp., *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium sporogenes* vegetative cells and spores in vacuum-packed canned pasteurized milk cheese", *International journal of food microbiology*, diciembre 2018, 286, pp. 148-154, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.027.
52. Schlessler, J., et al., "Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157: H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurized milk", *Journal of Food Protection*, mayo 2006, 69(5), pp. 990-998, DOI: 10.4315/0362-028x-69.5.990.
53. Reitsma, C.J.H., D.R., "Survival of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 During the Manufacture and Curing of Cheddar Cheese", *Journal of Food Protection*, mayo 1996, 59(5), pp. 460-464, DOI: 10.4315/0362-028X-59.5.460.

54. D'amico, D.J., M.J. Druart, and C.W. Donnelly, "Behavior of *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk", *Journal of Food Protection*, diciembre 2010, 73(12), pp. 2217-2224, DOI: 10.4315/0362-028x-73.12.2217.
55. Vernozy-Rozand, C., et al., "Growth and survival of *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses", *International journal of food microbiology*, Agosto 2005, 105(1), pp. 83-88, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.005.
56. Montet, M., et al., "Growth and survival of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains during the manufacture and ripening of Camembert cheese", *International journal of microbiology*, noviembre 2009, DOI: 10.1155/2009/653481.
57. Gómez-Lucia, E., et al., "Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese", *Journal of dairy science*, enero 1992, 75(1), pp. 19-26, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(92)77733-9
58. Johler, S., K. Zurfluh, and R. Stephan, "Tracing and inhibiting growth of *Staphylococcus aureus* in barbecue cheese production after product recall", *Journal of dairy science*, mayo 2016, 99(5), pp. 3345-3350, DOI: 10.3168/jds.2015-10689.

#### **4. EFFECT OF WATER ACTIVITY, PH, AND LACTIC ACID BACTERIA TO INHIBIT *Escherichia coli* DURING CHIHUAHUA CHEESE MANUFACTURE**

Nidia Aracely Chacón Flores <sup>1</sup>, Guadalupe Isela Olivas Orozco <sup>1</sup>, Carlos Horacio Acosta Muñiz <sup>1</sup>, Néstor Gutiérrez Méndez <sup>2</sup> and David Roberto Sepúlveda Ahumada <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Cuauhtémoc, Chihuahua 31570, México; nidia.chacon@estudiantes.ciad.mx (N.A.C.F.); golivas@ciad.mx (G.I.O.O.); cacosta@ciad.mx (C.H.A.M.)

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua 31000, México; ngutierrez@uach.mx

\* Correspondence: dsepulveda@ciad.mx

Fecha de publicación: 12 Octubre 2023

FOODS

DOI: 10.3390/foods12203751

Article

# Effect of Water Activity, pH, and Lactic Acid Bacteria to Inhibit *Escherichia coli* during Chihuahua Cheese Manufacture

Nidia Aracely Chacón-Flores<sup>1</sup>, Guadalupe Isela Olivas-Orozco<sup>1</sup>, Carlos Horacio Acosta-Muñoz<sup>1</sup>, Néstor Gutiérrez-Méndez<sup>2</sup> and David Roberto Sepúlveda-Ahumada<sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Cuauhtémoc, Chihuahua 31570, Mexico; nidia.chacon@estudiantes.ciad.mx (N.A.C.-F.); golivas@ciad.mx (G.I.O.-O.); cacosta@ciad.mx (C.H.A.-M.)  
<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua 31000, Mexico; ngutierrez@uach.mx  
 \* Correspondence: dssepulveda@ciad.mx

**Abstract** This study aimed to evaluate the effectiveness of pH control, water activity ( $A_w$ ), and the addition of lactic acid bacteria (LAB) on the proliferation of *Escherichia coli* in the curd during the manufacturing of Chihuahua cheese. Milk proved to be an excellent culture medium for *E. coli*, allowing it to develop at concentrations up to  $10^9$  cfu/g. However, the presence of LAB, the pH control,  $A_w$ , and especially the use of the Cheddarization process during the Chihuahua cheese production proved to be important obstacles that inhibited the proliferation of *E. coli* under the conditions studied. Moreover, reducing the water activity of the curd as quickly as possible is presented as the most powerful tool to inhibit the development of *E. coli* during the Chihuahua cheese-making process.

**Keywords:** water activity; lactic culture; *Escherichia coli*; bacterial inhibition; dairy products



**Citation:** Chacón-Flores, N.A.; Olivas-Orozco, G.I.; Acosta-Muñoz, C.H.; Gutiérrez-Méndez, N.; Sepúlveda-Ahumada, D.R. Effect of Water Activity, pH, and Lactic Acid Bacteria to Inhibit *Escherichia coli* during Chihuahua Cheese Manufacture. *Foods* **2023**, *12*, 3751. <https://doi.org/10.3390/foods12203751>

Academic Editors: Esther Sendra, Simone Stella and Erica Tirloni

Received: 16 June 2023  
 Revised: 12 September 2023  
 Accepted: 18 September 2023  
 Published: 12 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Consuming milk and dairy products is essential to the diet due to their composition rich in proteins, fats, lactose, mineral salts, and vitamins, among many other important nutrients [1]. This abundance of nutrients also offers optimal conditions for the growth of microorganisms, which can be beneficial or harmful to humans. As an example of beneficial bacteria, lactic acid bacteria (LAB) can be mentioned. These microorganisms are used in the food industry as starter cultures to obtain fermented dairy products [2]. Among the most used LAB genera are *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, and, within the genus *Streptococcus*, the species *Streptococcus thermophilus* [3]. On the other hand, there are microorganisms capable of causing illness in humans through food consumption, such as *Salmonella*, *E. coli*, *Listeria*, and *Campylobacter* [4]. Specifically, *E. coli* and some of its strains, such as *E. coli* O157:H7, are of great concern to the food industry (and a public health problem) due to their ability to cause serious diseases such as hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura [5]. Studies conducted in Canada and the United States have shown that *E. coli* ranks second among bacterial enteropathogens associated with non-specific diarrhea [6]. Recent studies conducted in Mexico establish that about 40% of fresh cheese from local retail markets show some degree of contamination with *E. coli* [7].

Chihuahua cheese, also known as Menonita cheese, is a traditional Mexican variety of cheese produced mainly in the state of Chihuahua, in the northern part of the country [8]. This cheese has a soft or semi-hard texture obtained by enzymatic coagulation of whole milk added with lactic acid bacteria. Once set, curds are cooked, cheddarized, salted, and pressed, obtaining in this way their characteristic attributes [9]. It is one of the main cheeses produced in Northern Mexico, a variant of young Cheddar cheese (2–4 weeks of maturation) and was developed by the Mennonite community that settled in the State of

Chihuahua during the early years of the twentieth century [10]. According to the Mexican standard, the composition of Chihuahua cheese must include no more than 45% moisture, and at least 28% fat and 25% protein [9,11].

As part of the food manufacturing process, it is possible to manipulate some cheese attributes to inhibit the proliferation of microorganisms. Some of the most important processing factors include the control of water activity, the concentration of salt or other inhibitory substances, the oxidation-reduction potential, acidity, and temperature, as well as the addition of beneficial microorganisms and the modification of the atmosphere composition in which they are stored [12,13]. Several authors have studied modifying these factors to control the proliferation of *E. coli* during the manufacturing process of different cheese varieties. Previous studies have determined the effect of adding lactic cultures, antimicrobial substances, temperature control (during cooking, drainage, and storage), pH control, and storage conditions. These studies have determined that the proliferation of *E. coli* in milk and dairy products during manufacturing processes occurs in the early stages of processing, depending on the pH, temperature, and type of starter culture employed. Typically, once the population reaches high concentrations, it is difficult to inhibit its continued presence during storage [14–24].

Considering the results of these studies, the importance of inhibiting the proliferation of *E. coli* in the initial stages of the cheese-making process is evident. For this reason, the objective of the present study was to evaluate the ability of pH, water activity, and the presence or absence of lactic acid bacteria to act as obstacles in the proliferation of *E. coli* during the curdling of milk, which is the first stage in the cheese-making process.

**2. Materials and Methods**

The study was divided into three stages (Figure 1). The first part of the study characterizes the development of *E. coli* populations in liquid milk. The second part studies the development of *E. coli* throughout the Chihuahua cheese manufacturing process, and the third part of the study evaluates the influence of the water activity and pH of milk curds on the development of *E. coli* during the early stages of the Chihuahua cheese manufacturing processes.

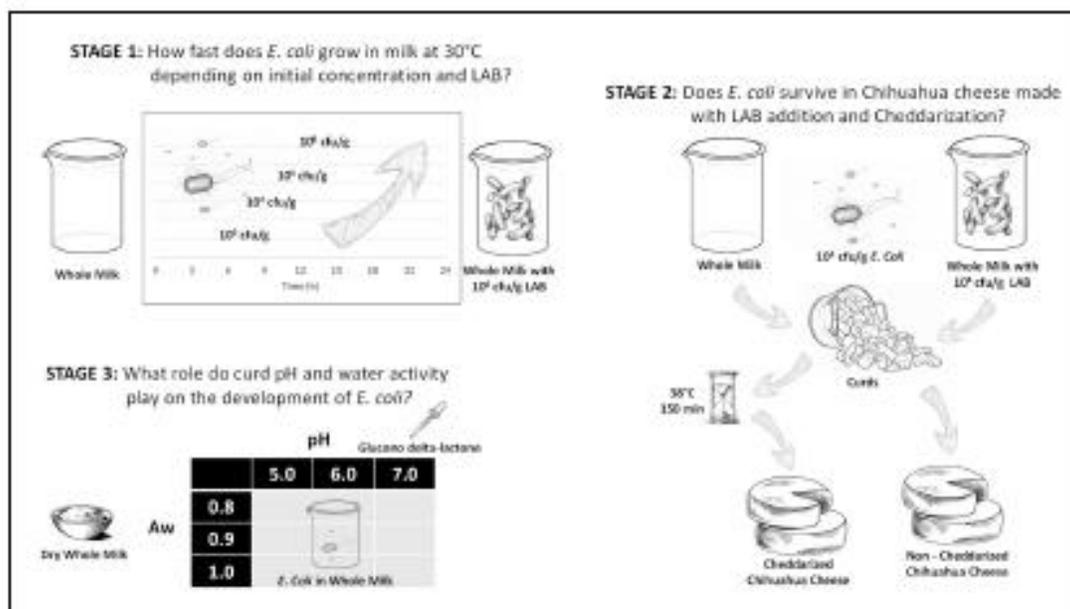


Figure 1. Experimental stages of the study.

During the first part of the study, the growth of *E. coli* in liquid milk was characterized to evaluate its proliferation under commonly found environmental conditions starting from four different initial *E. coli* concentrations. During this stage, the effect of the presence of a significant amount of LAB on the growth of *E. coli* in liquid milk was also evaluated.

Once *E. coli* growth in milk was characterized, a complete manufacturing process of Chihuahua cheese where slightly contaminated milk is used (100 *E. coli* cfu/g) was investigated. This initial *E. coli* concentration level is something that may be found in poorly controlled commercial processes, mainly due to post-pasteurization contamination or deficient pasteurization conditions. The ability of lactic acid bacteria to control the development of *E. coli* was evaluated on this second stage of the study, specifically in regard to the effectiveness of the cheddarization process, a stage where the LAB activity is promoted.

Finally, in the third stage of the study, a factorial experiment was designed to evaluate the joint effect of water activity and pH on the inhibition of *E. coli* in milk curds during the early steps of the manufacturing process in such a way that it was possible to determine the individual contribution of each factor on *E. coli* survival, as well as identifying possible interactions between them.

### 2.1. Bacterial Strains

In the present study, the *E. coli* strain ATCC 25922 and the lactic culture R-703 (CHR HANSEN Laboratories, Orsholm, Denmark, containing *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) were used.

### 2.2. Preparation of *E. coli* and LAB Inocula

The *E. coli* strain was activated by adding a small portion of the lyophilized microorganism in LB Broth (Lennox, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), incubating it at 37 °C for 24 h. Subsequently, an aliquot was sown in a petri dish (LB agar), and after incubation, a colony was transferred to a flask containing 50 mL of milk. It was then incubated at 37 °C while stirring at 180 rpm for 24 h until a final concentration of 10<sup>9</sup> cfu/g was reached, corresponding to the early stationary stage of population development. In order to prepare the LAB inoculum, 5.8 mg of lactic culture R-703 (CHR HANSEN containing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) was weighed and added to 50 mL of milk and incubated at 37 °C with stirring at 180 rpm for 24 h until reaching a concentration of 10<sup>8</sup> cfu/g.

### 2.3. Effect of the Initial Concentration on the Growth of *E. coli* in Milk

Commercial ultra-pasteurized milk was used to measure the development of *E. coli* populations in milk depending on its initial concentration. Milk samples were inoculated with four initial concentrations of *E. coli* ATCC 25922 (10<sup>0</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>, and 10<sup>6</sup> cfu/g) and were incubated at a constant temperature of 30 °C for 30 h. Additionally, the development of *E. coli* populations was studied in milk previously inoculated with LAB at an initial concentration of 10<sup>6</sup> cfu/g to evaluate the inhibitory capacity of LAB over *E. coli* populations in liquid milk. The concentration of *E. coli* and LAB in milk, as well as the pH, were measured every 3 h. This incubation temperature was selected considering it is close to the temperature found in freshly milked non-refrigerated milk and coincides with the temperature used at the beginning of cheese manufacturing processes.

### 2.4. Effect of the Presence of LAB and Cheddarization on the Survival of *E. coli* in Chihuahua Cheese

Chihuahua cheese was made from pasteurized *E. coli*-free milk (63 °C for 30 min). After tempering milk at 30 °C, *E. coli* was added to obtain an initial concentration of 100 cfu/g. Next, the milk inoculated with *E. coli* was separated into two batches. One batch was added with LAB to obtain an initial concentration of 10<sup>6</sup> cfu/g, while the other was processed without adding LAB as a control treatment. From this point, both batches

were processed similarly by adding chymosin (CHY-MAX<sup>®</sup> M, CHR Hansen, Orsholm, Denmark) in a proportion of 0.02% and resting for 30 min to allow curdling. After this stage, curd was cut into cubes of approximately 1 cm<sup>3</sup> and cooked at 38 °C for 30 min. Once cooked, the curd was drained and separated once again into two batches: (1) Curd without cheddarization, which was immediately salted (2% sodium chloride), pressed, vacuum packaged in sterile bags, and stored at 4 °C, and (2) Curd subjected to cheddarization, which was dry incubated at 38 °C for 150 min before being salted, pressed, and packaged before storage at 4 °C. *E. coli* and LAB were quantified in liquid milk at the beginning of the manufacturing process and in the finished cheese after one week of refrigerated storage.

### 2.5. Effect of the pH and Water Activity on the Survival of *E. coli* in Curd

Milk curd conditions were simulated from commercial ultra-pasteurized milk standardized to 3 pH levels (7, 6, and 5) and three water activity levels (1.0, 0.9, 0.8) in a completely randomized factorial design resulting in nine treatments. Milk acidity was modified with glucono delta-lactone (Sigma-Aldrich), while water activity was controlled by the addition of low-heat whole milk powder. The development of *E. coli* was evaluated every 3 h for 24 h at 30 °C in each of the different treatments. Subsequently, the curd was stored in refrigeration at 4 °C for an extended period of four months to evaluate the survival or resurgence of *E. coli* under the conditions studied. The study of curds for an extended period of refrigerated storage was intended to determine whether the studied conditions (pH and Aw) were sufficient by themselves to ensure permanent control of *E. coli*. This extended storage period does not constitute a processing step in conventional Chihuahua cheese manufacturing processes.

### 2.6. Determination of pH and Aw

The pH measurement in milk, curd, and cheese was carried out using a potentiometer (HANNA instruments HI5221-01, Woonsocket, RI, USA) following the methodology described in the NOM-F-317-S-1978. On the other hand, water activity was determined using a standard laboratory water activity meter (AquaLab Series 3, Pullman, DC, USA).

### 2.7. Bacterial Quantification

Lactic acid bacteria were counted by the pour plate method using dilutions and culturing on sterile M17 agar (DIBICO, Cuautitlán Izcalli, México) with incubation in anaerobiosis for 24 h. Likewise, the pour plate method for coliform bacteria on Violet Red Bile Agar (Bioxon, Cd. México, México) with subsequent incubation at 37 °C for 24 h was used to determine coliforms [25].

### 2.8. Statistical Analysis

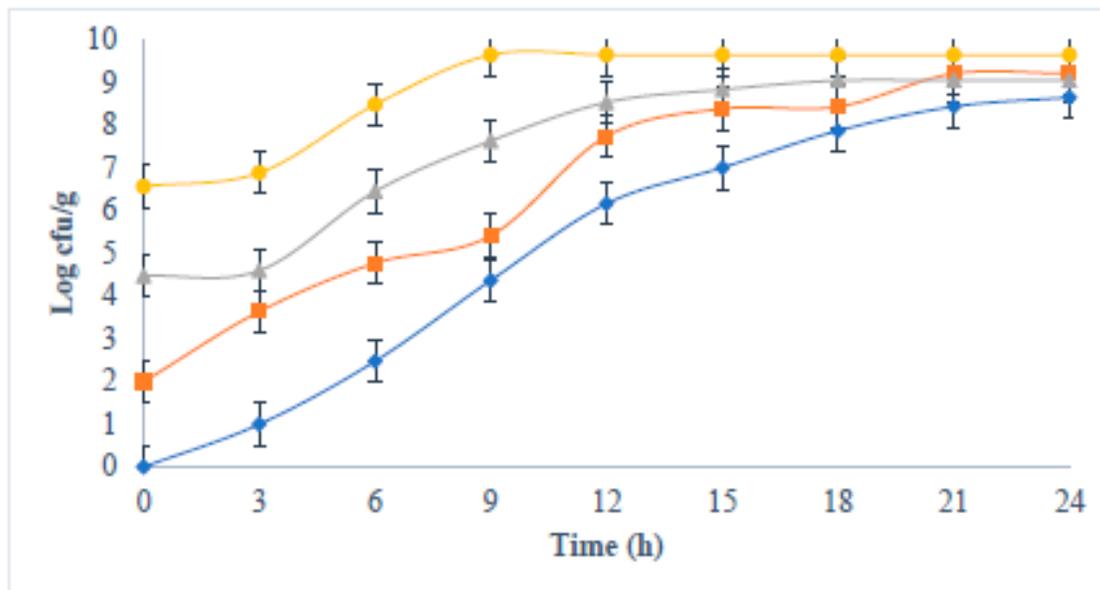
All experiments were performed in triplicate. The analysis of variance (ANOVA) was used to identify the main effects and interactions. In addition, Tukey's range test was used to identify significant differences between means at a level of ( $p < 0.05$ ). All statistical analyses were performed using Minitab 18 Statistical Software.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Development of *E. coli* in Milk from Four Different Initial Concentrations

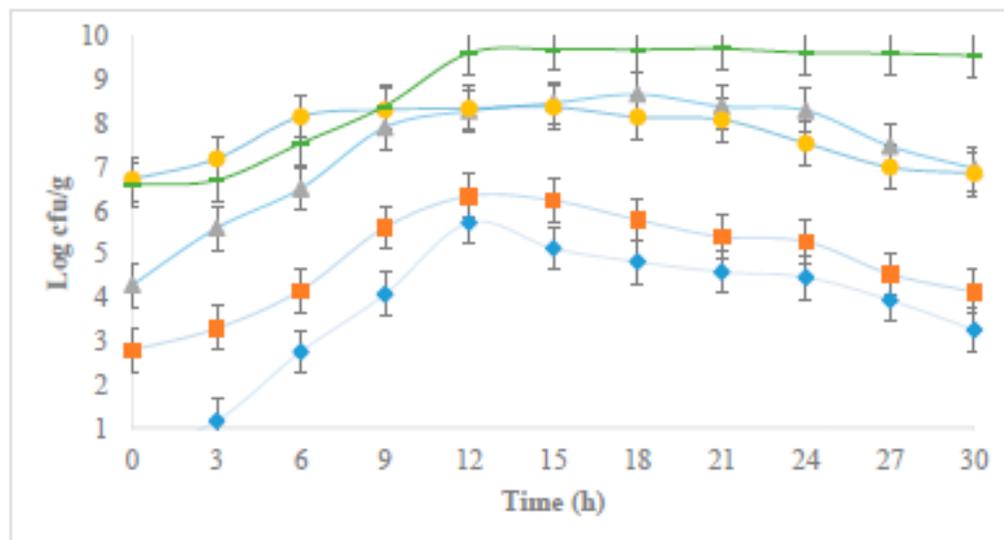
Figure 2 shows the development of *E. coli* in milk incubated at 30 °C. In all cases, *E. coli* showed sustained exponential growth until reaching a maximum value of approximately 10<sup>9</sup> (stationary phase). The concentration of the initial *E. coli* inoculum played an essential role in defining the time required to reach the stationary phase being 24, 21, 15, and 6 h for treatments 10<sup>0</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>, and 10<sup>6</sup> cfu/g, respectively. These results confirm that milk is an excellent medium for the development and proliferation of *E. coli*. Similarly, the growth rate of *E. coli* provides a clear scenario of the risk involved in storing unprocessed or refrigerated milk, even when initial contamination levels are very low. Previous studies describe the proliferation of several *E. coli* strains during the production of cheese made from raw milk

inoculated with *E. coli* ( $10^1$  and  $10^3$  cfu/g), reporting an increase in *E. coli* counts during processing of approximately 3.5 decimal logs and finding significant differences between the strains studied, as well as between the initial *E. coli* inoculum levels studied [22,26].

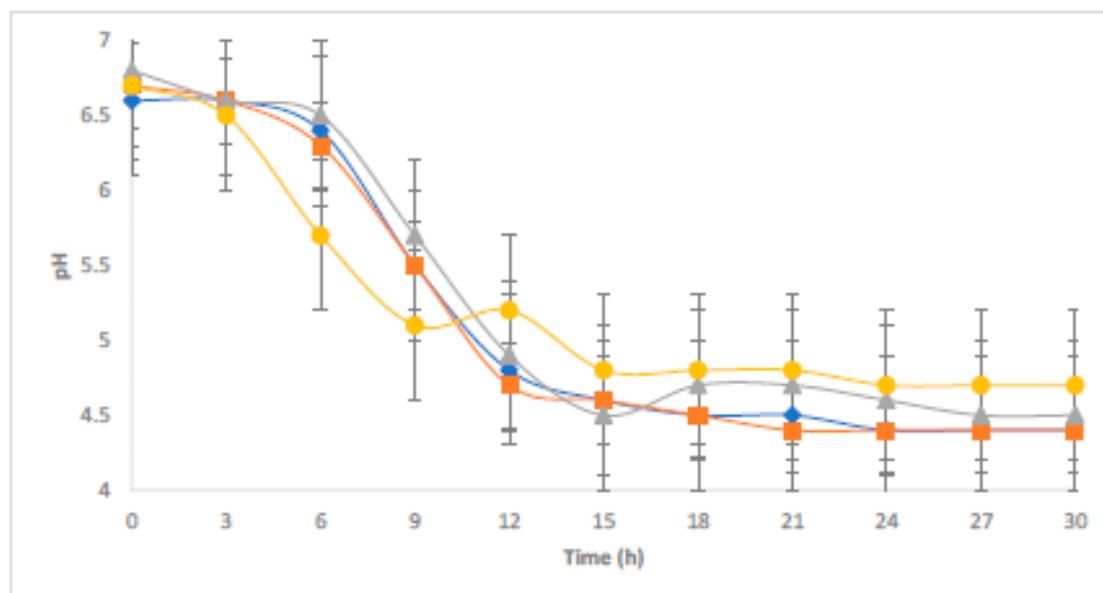


**Figure 2.** Development of *E. coli* in ultra-pasteurized milk incubated at 30 °C for 24 h, inoculated with four initial concentrations of *E. coli*:  $10^0$  (◆),  $10^2$  (■),  $10^4$  (▲),  $10^6$  (●) cfu/g.

Figure 3 shows the development of *E. coli* incubated at 30 °C in milk previously inoculated with  $10^5$  cfu/g of LAB. Similar to that observed in milk not inoculated with LAB, all treatments significantly increased the concentration of *E. coli* during the first 12 h of incubation, showing exponential growth. However, after 12 h, an inhibitory effect caused by the presence of LAB can be observed, which likely limited the development of *E. coli* through pH reduction (Figure 4), competition for nutrients, and synthesis of lactic acid or some other bacteriostatic substance [15], preventing all treatments from reaching the maximum concentration of  $10^9$  cfu/g observed in milk without LAB. In the case of milk added with LAB, the maximum levels of *E. coli* proliferation observed were  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^8$ , and  $10^8$  cfu/g for treatments with initial *E. coli* concentrations of  $10^0$ ,  $10^2$ ,  $10^4$ , and  $10^6$  cfu/g, respectively. These observed maximum concentrations of *E. coli* were further reduced during the remaining 18 h of monitoring, reaching final values of  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ , and  $10^6$  cfu/g, respectively, implying an additional reduction of about two logarithmic cycles caused by the presence of LAB. Although promising, the inhibitory effect of LAB observed in this study cannot be considered sufficient from a public health standpoint since the final concentrations of *E. coli* are at considerably high levels in all treatments despite the observed reduction. Previous studies evaluating the ability of LAB to inhibit the development of *E. coli* in liquid milk demonstrate practically null control after *E. coli* populations exceed  $10^4$  cfu/g [27]. Inhibitory effects on other pathogens, such as *Salmonella* spp., observed as a result from the pH decrease caused by LAB have been previously reported, emphasizing that the type of chemical species responsible for acidification may play a vital role in defining the intensity of the observed effect [28]. The relative abundance of protonated lactic acid in particular, rather than pH suppression itself, has been reported as a critical factor defining the effectiveness of LAB in reducing *E. coli* populations [29].



**Figure 3.** Development of *E. coli* in ultra-pasteurized milk inoculated with lactic acid bacteria  $10^6$  cfu/g (-) incubated at 30 °C for 30 h, with four initial concentrations of *E. coli*:  $10^0$  (◆),  $10^2$  (■),  $10^4$  (▲),  $10^6$  (●) cfu/g.

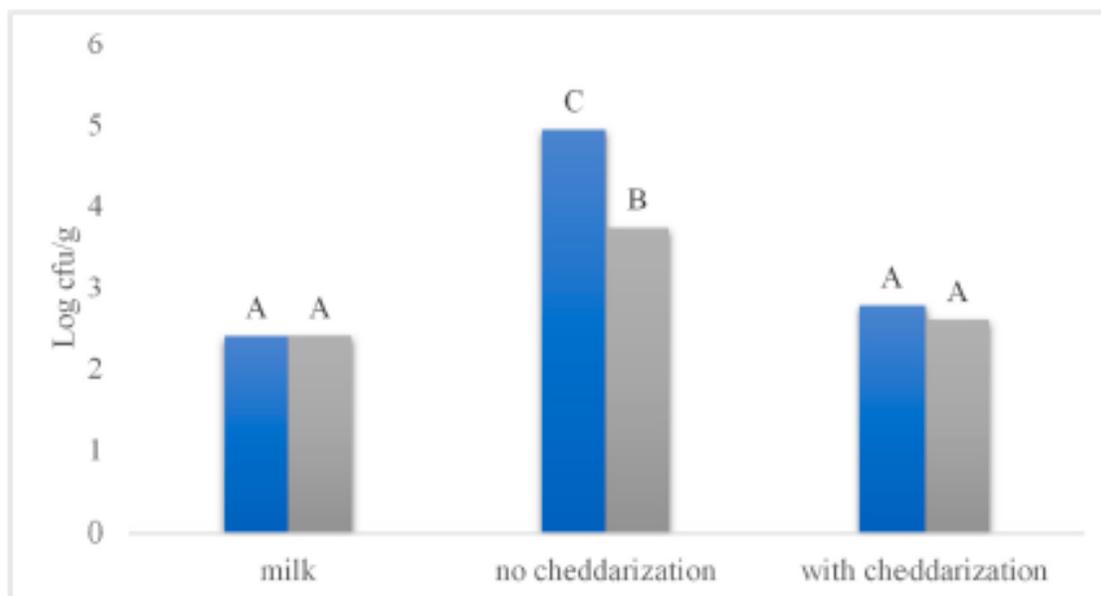


**Figure 4.** Development of pH in milk at 30 °C for 30 h. Milk was inoculated with a lactic culture ( $10^6$  cfu/g) and four initial concentrations of *E. coli*:  $10^0$  (◆),  $10^2$  (■),  $10^4$  (▲),  $10^6$  (●) cfu/g.

### 3.2. Development of *E. coli* during the Chihuahua Cheese-Making Process

Figure 5 shows the development of the *E. coli* population in the different Chihuahua cheese production processes studied. The initial concentration of *E. coli* of  $10^2$  cfu/g increased rapidly during the curdling, cooking, and draining stages, reaching a maximum level at the end of the process of  $10^5$  cfu/g in the cheese without LAB addition or cheddarization. A cheese with this high concentration of *E. coli* undoubtedly poses a health risk. An increased concentration of *E. coli* during the cheese manufacturing process, starting from the draining stage has been previously reported, indicating that bacterial cells tend

to multiply and remain trapped in the three-dimensional casein structure while whey is expelled in the later stages of the process [30]. However, it is crucial to note that, although this treatment (no LAB addition, no Cheddarization) did not experience a very drastic change in pH (6.2), given the absence of LAB inoculum, the *E. coli* population did not reach levels of  $10^8$  cfu/g as would have happened in the case of liquid milk (pH 6.7) after 12 h of elapsed time (Figure 2). This indicates the presence of a preservation effect inherent to the manufacturing process, possibly related to salt addition and water activity reduction [13]. It is also important to consider that pasteurized milk (such as the one used in this study) has a natural microbiota of non-pathogenic microorganisms in a concentration in the order of  $10^2$  cfu/g [31]. The presence of these microorganisms may also have played a role in the observed inhibitory effect, although this effect is probably marginal given their low concentration.



**Figure 5.** Concentration of *E. coli* in Chihuahua cheese manufactured without the addition of Lactic Acid Bacteria (blue bars) and with addition of lactic acid bacteria (gray bars). *E. coli* concentration was determined on milk prior to cheese manufacture, on finished Chihuahua cheese in which no cheddarization was conducted, and on finished Chihuahua cheese that was manufactured employing the cheddarization processing step. Bars with the same superscript letter are not statistically different.

On the other hand, cheese made without cheddarization but from milk added with LAB showed a less pronounced increase in the concentration of *E. coli*, reaching a maximum concentration at the end of the process of  $10^3$  cfu/g, which implies a difference of two logarithmic cycles compared to treatment without LAB addition, and an increase of only one logarithmic cycle compared to the initial concentration of *E. coli* in milk. This greater inhibitory power of cheese inoculated with LAB can undoubtedly be related to the pH decrease (5.5), the synthesis of organic acids, and possibly other bacteriostatic substances, as well as to the competitive inhibition caused by the presence of a high LAB concentration from the beginning of the process [32]. Previous studies [33] have demonstrated the ability of LAB, such as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, to inhibit the development of pathogenic microorganisms such as *E. coli* and *Salmonella enteritidis*, basing its effectiveness on the rapid production of lactic acid, and the consequent rapid pH decrease.

Finally, the cheddarization process proved to be the most relevant stage of the Chihuahua cheese manufacturing process in terms of limiting the development of *E. coli*.

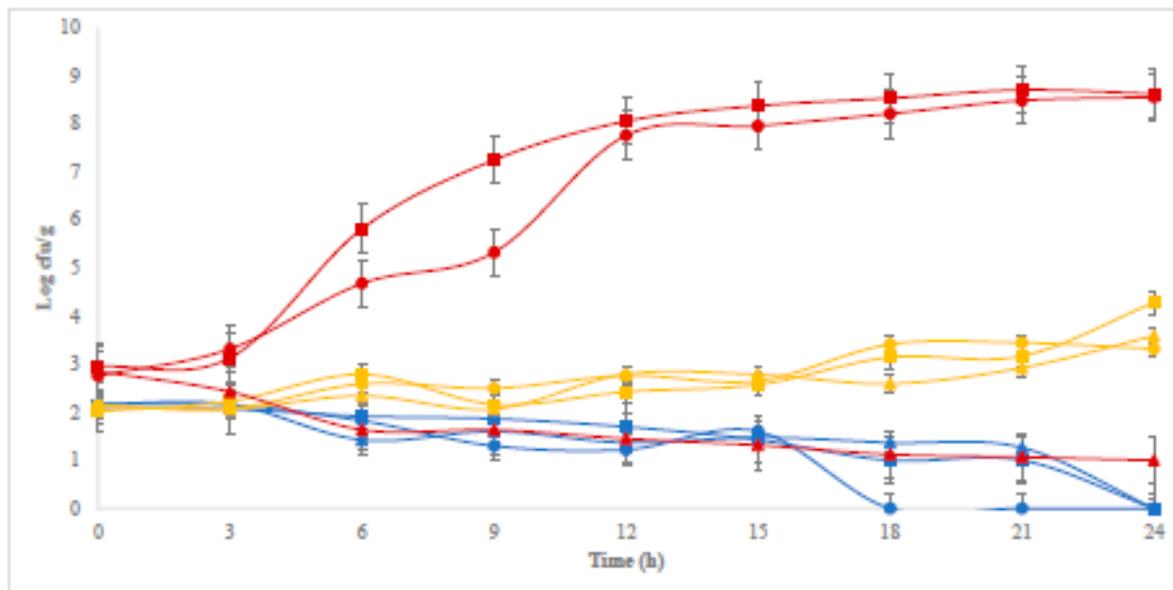
Figure 5 shows how the cheese made from milk inoculated with LAB and the one manufactured without adding LAB benefit both from an incubation period at 38 °C for 150 min after draining the curd and before salting and pressing. The results of this study demonstrate how cheddarization generates conditions that promote the proliferation of beneficial microorganisms, even in cases where a large amount of specific LAB has not been added at the beginning of the process. All cheddarized cheeses studied maintained their *E. coli* population within the original inoculum level of  $10^2$  cfu/g, showing an effective bacteriostatic effect. Although the treatment with the addition of LAB and cheddarization shows an apparently lower concentration of *E. coli* than the cheddarized treatment without the addition of LAB, both were statistically indistinguishable compared to the concentration of *E. coli* in milk at the beginning of the process. As mentioned before, the pasteurized milk used in this study contains limited amounts of LAB, bacteria capable of surviving the pasteurization process, which take advantage of the incubation conditions provided by cheddarization, matching the effect obtained with the initial addition of high concentrations of LAB. Previous studies conducted on raw and pasteurized milk artificially contaminated with different *E. coli* strains during refrigerated storage showed a reduced concentration of *E. coli* after the second day of cold storage in non-pasteurized milk, which showed a much larger populations of LAB and total aerobic plate count than pasteurized milk by that time of the refrigerated storage [34]. In addition, cheddarization favors the decrease of  $A_w$  and pH, both critical factors on the inhibition of undesirable microorganisms. As pH decreases below 5.4, the growth of gas-forming organisms such as coliforms markedly decreases [35].

### 3.3. Effect of pH and Water Activity on the Growth of *E. coli* in Simulated Curds

Figure 6 shows the development of *E. coli* in simulated curds monitored for 24 h at 30 °C with different combinations of pH and water activity. Statistical analysis of the data revealed a significant effect ( $p < 0.05$ ) of water activity and of the interaction between pH and water activity. Water activity proved to be the most relevant factor defining *E. coli* growth. While simulated curds adjusted to 0.8 water activity show the ability to inhibit *E. coli* growth within the 24 h studied, curds with water activity of 0.9 showed only bacteriostatic capacity. Finally, curd with water activity of 1.0 allows the growth of *E. coli* without any restriction, showing a behavior similar to that observed in liquid milk (Figure 2). pH control through glucono delta-lactone addition, on the other hand, does not seem to cause a relevant effect on the development of *E. coli* under the conditions studied, except for the treatment of water activity 1.0 and pH 5, which showed significant *E. coli* inhibition capacity, attributable entirely to the low pH employed. Results similar to those obtained in the present study, suggesting interactions between pH and water activity in controlling *E. coli* growth, have been reported before [36].

The follow-up of the *E. coli* population in the simulated curds studied during extended storage at 4 °C (Table 1) revealed that treatments with a water activity of 0.8 effectively eradicated the *E. coli* population presenting “Undetectable” counts at day 1, 63, and 126 of extended storage, regardless of the pH employed. Treatments with 0.9 water activity, on the other hand, showed a continuous bacteriostatic capacity, presenting counts in the order of  $10^3$  cfu/g still on day 1 of storage, which were reduced to  $10^2$  cfu/g after 63 days, reaching levels of “Non-Detectable” at 126 days of extended refrigerated storage. Finally, curds with a water activity of 1.0 maintained high concentrations of *E. coli* throughout the extended storage period studied, presenting concentrations of  $10^8$ ,  $10^5$ , and  $10^4$  cfu/g after 1, 63, and 126 days, respectively. As mentioned before, the treatment of water activity 1.0 and pH 5.0 showed a different behavior than other treatments with water activity 1.0, presenting total growth inhibition of *E. coli* from day 63 to 126. Previous studies have reported the survival of *E. coli* in various cheese varieties for extended storage times. For example, Schlessler, Gerdes [19] (2006) report survival of *E. coli* for 60 days in Cheddar cheese made with unpasteurized milk, inoculated with a cocktail of five *E. coli* strains at an initial concentration of  $10^5$ ,  $10^3$ ,  $10^1$  cfu/g and stored at 7 °C. Something similar was observed in Cheddar cheese made with raw and pasteurized milk artificially enriched

with  $10^5$ ,  $10^3$ , and  $10^1$  cfu/g of *E. coli* O157:H7 stored at 15 °C. In this case, although coliform bacteria naturally present in raw milk were completely inactivated at five weeks of storage, artificially inoculated *E. coli* was able to survive the entire 60-day storage period, suggesting that the maturation process alone is not sufficient to ensure complete inactivation of contaminating pathogens [37]. Finally, a study conducted on Gouda and Cheddar cheeses made from raw milk contaminated with *E. coli* O157:H7 at a level of approximately 20 cfu/g and stored at 9 °C showed survival after 60 days at average levels of 25 and 5 cfu/g in Cheddar and Gouda, respectively, observing detectable levels of *E. coli* after selective enrichment for more than 270 days in both types of cheese [30].



**Figure 6.** *E. coli* concentration in simulated curds standardized to three pH levels and three water activity ( $A_w$ ) levels monitored for 24 h at 30 °C. Red lines correspond to treatments of  $A_w$  0.8, yellow lines to  $A_w$  0.9, and blue lines to  $A_w$  1.0. Round symbols represent pH 7.0 treatments, pH 6.0 treatments are represented by squares, and pH 5.0 treatments are represented by triangles.

**Table 1.** Growth of *E. coli* (cfu/g) in simulated curds during extended storage at 4 °C.

$A_w$	pH	Day 1	Day 63	Day 126
0.8	7.0	ND	ND	ND
0.8	6.0	ND	ND	ND
0.8	5.0	ND	ND	ND
0.9	7.0	$2.10 \times 10^3$	$6.60 \times 10^2$	ND
0.9	6.0	$1.91 \times 10^3$	$1.50 \times 10^2$	ND
0.9	5.0	$3.98 \times 10^3$	$1.80 \times 10^2$	ND
1.0	7.0	$3.60 \times 10^8$	$9.00 \times 10^5$	$5.30 \times 10^4$
1.0	6.0	$4.30 \times 10^8$	$2.90 \times 10^5$	$1.00 \times 10^4$
1.0	5.0	$1.00 \times 10$	ND	ND

ND, not detected.

#### 4. Conclusions

The present study demonstrates that the inoculation of LAB in milk prior to cheese manufacture may be capable of moderately controlling the development of *E. coli* populations during Chihuahua cheese manufacturing. However, this effect is limited at its best to a bacteriostatic effect dependent on the initial concentration of *E. coli*. By itself,

LAB inoculation can hardly be considered as a satisfactory means to eradicate *E. coli* of cheese completely.

The use of the cheddarization step was shown to be a relevant strategy to deter the increase of the population of *E. coli* during the Chihuahua cheese manufacture process. This observation results relevant as the cheddarization process is sometimes considered only as a texturing step in which the development of casein fibers modifies the physical structure of cheese, hence disregarding it as a relevant unit operation from a food safety point of view. The results of the present study demonstrate that cheddarization is capable of controlling the increase of the *E. coli* population even when no LAB starters are added to milk. Therefore, the cheddarization step becomes an essential step to reduce the risk of *E. coli* presence in Chihuahua cheeses that are produced in artisanal manufacture processes that rely exclusively on the presence of native LAB for the development of acidity in the manufacture process.

Finally, this study demonstrated the importance of reducing the water activity of curds as much as possible during the cheese manufacturing process, especially in the early steps of curdling and cooking, since this parameter turned out to be the most critical in defining the survival of *E. coli* in Chihuahua cheese.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.R.S.-A.; Methodology, N.A.C.-E, C.H.A.-M. and N.G.-M.; Formal analysis, G.L.O.-O, N.G.-M. and D.R.S.-A.; Investigation, N.A.C.-E; Data curation, C.H.A.-M.; Writing—original draft, N.A.C.-E; Writing—review & editing, G.L.O.-O, C.H.A.-M, N.G.-M. and D.R.S.-A.; Funding acquisition, D.R.S.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the article.

**Acknowledgments:** Author Chacón-Flores is grateful for the support of the National Council of Science and Technology (CONACYT) granted through a scholarship to pursue a doctorate in science within the program of the Center for Research in Food and Development unit Cuauhtémoc.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Cu, G.d.I.R.G.; Sánchez, B.M.; Vázquez, R.C. Calidad de La Leche Cruda. In Proceedings of the Primer Foro Sobre Ganadería Lechera de La Zona Alta de Veracruz, Veracruz, Mexico, 5 March 2010.
2. Fuentes Fanegas, M.; Londoño Zapata, A.; Durango Zuleta, M.; Gutiérrez Buiticá, M.; Ochoa Agudelo, S.; Sepulveda Valencia, J. Antimicrobial Capacity of Native Lactic Acid Bacteria Isolated from Double Cream Cheese and Colombian Quesillo. *Biotecnol. Sect. Agropec. Agroind.* **2017**, *15*, 45–55.
3. Sánchez, L.; Tromps, J. Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Rev. Salud Anim.* **2014**, *36*, 124–129.
4. Walstra, P.; Wouters, T.M.; Geurts, T.M. *Dairy Science and Technology*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2006.
5. Tsegaye, M.; Ashenafi, M. Fate of *Escherichia coli* O157: H7 during the processing and storage of Ergo and Ayib, traditional Ethiopian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *103*, 11–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Barrantes, X.; Railey, D.; Arias, M.L.; Chaves, C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157: H7. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2004**, *54*, 293–297.
7. de la Rosa-Hernández, M.C.; Cadena-Ramírez, A.; Téllez-Jurado, A.; Gómez-Aldapa, C.A.; Rangel-Vargas, E.; Chávez-Urbiola, E.A.; Castro-Rosas, J. Presence of Multidrug-Resistant Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, Enteropathogenic *Escherichia coli*, and Enterotoxigenic *Escherichia coli* on Fresh Cheeses from Local Retail Markets in Mexico. *J. Food Prot.* **2018**, *81*, 1748–1754. [[CrossRef](#)]
8. González-Córdova, A.F.; Yescas, C.; Ortiz-Estrada, Á.M.; de los Ángeles De la Rosa-Alcaraz, M.; Hernández-Mendoza, A.; Vallejo-Cordoba, B. Invited review: Artisanal Mexican cheeses. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 3250–3262. [[CrossRef](#)]
9. NMX-F-738-COFOCALEC-2017; Sistema Producto Leche Alimento-Lácteo-Queso-Chihuahua-Denominación. Especificaciones y Métodos de Prueba. Diario Oficial de la Federación 18 (DCXCIII). Cofocalec: Guadalajara, Mexico, 2017.
10. Van Hekken, D.L.; Tunick, M.H.; Tomasula, P.M.; Corral, F.J.M.; Gardea, A.A. Mexican Queso Chihuahua: Rheology of fresh cheese. *Int. J. Dairy Technol.* **2007**, *60*, 5–12. [[CrossRef](#)]
11. Olson, D.W.; Van Hekken, D.L.; Tunick, M.H.; Tomasula, P.M.; Molina-Corral, F.J.; Gardea, A.A. Mexican Queso Chihuahua: Functional properties of aging cheese. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 4292–4299. [[CrossRef](#)]
12. Hayaloglu, A. Cheese: Microbiology of Cheese. In *Reference Module in Food Science*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016. [[CrossRef](#)]

13. Gibson, A.M.; Roberts, T. The effect of pH, water activity, sodium nitrite and storage temperature on the growth of enteropathogenic *Escherichia coli* and salmonellae in a laboratory medium. *Int. J. Food Microbiol.* **1986**, *3*, 183–194. [\[CrossRef\]](#)
14. Kornacki, J.L.; Marth, E.H. Fate of nonpathogenic and enteropathogenic *Escherichia coli* during the manufacture of Colby-like cheese. *J. Food Prot.* **1982**, *45*, 310–316. [\[CrossRef\]](#)
15. Rash, K.; Kosikowski, E. Influence of lactic acid starter bacteria on enteropathogenic *Escherichia coli* in ultrafiltration prepared Camembert cheese. *J. Dairy Sci.* **1982**, *65*, 537–543. [\[CrossRef\]](#)
16. Govaris, A.; Papatheodorou, D.K.; Papatheodorou, K. Behavior of *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture and ripening of feta and telemeese cheeses. *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 609–615. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Leuschner, R.G.; Boughtflower, M.P. Laboratory-scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, and Dublin. *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 508–514. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Lekkas, C.; Kakouri, A.; Paleologos, E.; Voutsinas, L.P.; Kontominas, M.G.; Samelis, J. Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 C. *Food Microbiol.* **2006**, *23*, 268–276. [\[CrossRef\]](#)
19. Schlessler, J.; Gerdes, R.; Ravishankar, S.; Madsen, K.; Mowbray, J.; Teo, A.-L. Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157: H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurized milk. *J. Food Prot.* **2006**, *69*, 990–998. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Wahi, S.; Bansal, S.; Ghosh, M.; Ganguli, A. Growth and survival of *Escherichia coli* O157: H7 during manufacture and storage of Indian cheese (paneer). *Foodborne Pathog. Dis.* **2006**, *3*, 184–189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Raeisi, M.; Tajik, H.; Razavi, R.S.; Maham, M.; Moradi, M.; Hajimohammadi, B.; Naghili, H.; Hashemi, M.; Mehdizadeh, T. Essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculoides*) antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in culture media and Iranian white cheese. *Iran. J. Microbiol.* **2012**, *4*, 30.
22. Peng, S.; Hoffmann, W.; Bockelmann, W.; Hummerjohann, J.; Stephan, R.; Hammer, P. Fate of Shiga toxin-producing and generic *Escherichia coli* during production and ripening of semi-hard raw milk cheese. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 815–823. [\[CrossRef\]](#)
23. Adhikari, A.; Yemireddy, V.K.; Costello, M.J.; Gray, P.M.; Salvadalena, R.; Rasco, B.; Killinger, K. Effect of storage time and temperature on the viability of *E. coli* O157: H7, *Salmonella* spp., *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium sporogenes* vegetative cells and spores in vacuum-packed canned pasteurized milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *286*, 148–154. [\[CrossRef\]](#)
24. Sharma, A.; Shivaprasad, D.; Chauhan, K.; Taneja, N.K. Control of *E. coli* growth and survival in Indian soft cheese (paneer) using multiple hurdles: Phytochemicals, temperature and vacuum. *LWT* **2019**, *114*, 108350. [\[CrossRef\]](#)
25. Da Silva, N.; Taniwaki, M.H.; Junqueira, V.C.A.; de Arruda Silveira, N.F.; Okazaki, M.M.; Gomes, R.A.R. *Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2018.
26. Bagel, A.; Sergentet, D. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Milk Fat Globules. *Microorganisms* **2022**, *10*, 496. [\[CrossRef\]](#)
27. Dambrosio, A.; Capuozzo, F.; De Palo, F.; Mottola, A.; Storelli, M.M.; De Rosa, M.; Matrella, R.; Quaglia, N.C. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in raw and mild pasteurised donkey milk treated with high pressure. *Int. Dairy J.* **2023**, *136*, 105486. [\[CrossRef\]](#)
28. Chung, K.C.; Goepfert, J. Growth of *Salmonella* at low pH. *J. Food Sci.* **1970**, *35*, 326–328. [\[CrossRef\]](#)
29. Oh, J.-H.; Vinay-Lara, E.; McMinn, R., Jr.; Glass, K.A.; Johnson, M.E.; Steele, J.L. Evaluation of NaCl, pH, and lactic acid on the growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a liquid Cheddar cheese extract. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 6671–6679. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. D'amico, D.J.; Druart, M.J.; Donnelly, C.W. Behavior of *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk. *J. Food Prot.* **2010**, *73*, 2217–2224. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Bluma, A.; Ciprovica, I. Diversity of lactic acid bacteria in raw milk. *Res. Rural Dev.* **2015**, *1*, 157–161.
32. Yang, E.; Fan, L.; Jiang, Y.; Doucette, C.; Fillmore, S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express* **2012**, *2*, 48. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Mufandaedza, J.; Viljoen, B.; Feresu, S.; Gadaga, T. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *108*, 147–152. [\[CrossRef\]](#)
34. Otero, V.; Santos, J.A.; Rodriguez-Calleja, J.M.; Garcia-Lopez, M.-L. Behavior of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in ewe milk stored at different temperatures and during the manufacture and ripening of a raw milk sheep cheese (Zamorano style). *J. Dairy Sci.* **2022**, *105*, 6827–6835. [\[CrossRef\]](#)
35. Kosikowski, E.V.; Mistry, V.V. *Cheese and Fermented Milk Foods*, 3rd ed.; University of Wisconsin-Madison: Madison, WI, USA, 1997; Volume 1.
36. Juneja, V.K.; Mukhopadhyay, S.; Ukuku, D.; Hwang, C.-A.; Wu, V.C.; Trippareddi, H. Interactive Effects of Temperature, pH, and Water Activity on the Growth Kinetics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104: H4. *J. Food Prot.* **2014**, *77*, 706–712. [\[CrossRef\]](#)
37. Chon, J.-W.; Kim, J.-W.; Song, K.-Y.; Lim, J.-S.; Bae, D.; Kim, H.; Seo, K.-H. Fate and survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 during ripening of cheddar cheeses manufactured from unpasteurized raw milk. *LWT* **2020**, *133*, 109944. [\[CrossRef\]](#)

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El manejo de la temperatura empleada en proceso de manufactura de productos lácteos, así como las temperaturas medioambientales son muy propicias para el desarrollo de *E. coli*. Por estos motivos, resulta de gran relevancia tomar las medidas necesarias para evitar que la leche se mantenga en este rango de temperaturas por periodos prolongados de tiempo, ya que esto puede implicar un grave riesgo a la salud del consumidor en pocas horas, aún en el caso de bajos niveles iniciales de contaminación por *E. coli*.

El proceso de manufactura del queso probó ser una estrategia que permite inhibir aún más el desarrollo de *E. coli*, especialmente cuando se emplea la adición de bacterias ácido lácticas y sobre todo cuando se lleva a cabo la Cheddarización de la cuajada. La cheddarización genera condiciones que permiten la proliferación de microorganismos benéficos, inclusive en aquellos casos en que no se ha adicionado una gran cantidad de bacterias ácido lácticas específicas al inicio del proceso. La actividad de agua durante el proceso de manufactura de quesos es el parámetro más significativo definiendo la sobrevivencia de *E. coli*.

Es importante señalar que en este trabajo se evaluaron condiciones extremas de pH y  $A_w$  en cuajada, mismas que no se encuentran en un proceso normal de elaboración de queso Chihuahua. Los resultados obtenidos nos indican que entre más baja sea la  $A_w$  y el pH mayor es la inhibición de *E. coli*. Entonces es interesante poder observar en un trabajo futuro cuales son las cantidades de  $A_w$  y pH a las que se puede llegar en un proceso de elaboración de queso, ya que estos elementos observados son muy importantes desde el punto de vista de la conservación del alimento por inhibición de patógenos, pero, surge la duda de cuáles son los cambios que pueden llegar a provocar en las características sensoriales del queso terminado.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Adhikari, A., Yemmireddy, V. K., Costello, M. J., Gray, P. M., Salvadalena, R., Rasco, B., & Killinger, K. (2018). Effect of storage time and temperature on the viability of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium sporogenes* vegetative cells and spores in vacuum-packed canned pasteurized milk cheese. *International journal of food microbiology*, 286, 148-154.
- Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera*: Reverté.
- Aurelio, R. (1982). *Tecnología de la leche* (Segunda edición ed.). San José, Costa Rica
- Axelsson, L., & Ahrné, S. (2000). Lactic acid bacteria *Applied microbial systematics* (pp. 367-388): Springer.
- Badui Dergal, S. (2016). *Química de los alimentos*: México, Pearson Educación.
- Bran Taracena, R. A. (1986). Evaluación de algunas características organolépticas, físico-químicas y bacteriológicas en leche y sub-productos en los mercados municipales de la ciudad capital de Guatemala.
- Brennan, N. M., Cogan, T. M., & Loessner y S. Scherer M. (2004). *Bacterial surface-ripened cheeses* (Vol. 2).
- Cardona, F. (2019). Actividad del agua en alimentos: concepto, medida y aplicaciones. *Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València. Artículo. España.*
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370.
- Chen, L., Daniel, R. M., & Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13(4), 255-275.
- COFOCALEC, & A.C., C. p. e. F. d. l. C. d. l. L. y. s. D. (2011). Norma Mexicana NMXF-738-COFOCALEC-2011 Sistema Producto LecheAlimentos-Lácteos-Queso-Chihuahua-Denominación. Especificaciones y Métodos de Prueba. Diario Oficial de la Federación 18(DCXIII). 70.
- Collins, E. (1981). Heat resistant psychrotrophic microorganisms. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, 64(1), 157-160.
- Cu, G. d. l. R. G., Sánchez, B. M., & Vázquez, R. C. (2010). Calidad de la leche cruda. *Primer foro sobre ganadería lechera de la zona alta de Veracruz.*
- Del Campo, J. (2005). Microbiología de los alimentos . DAA Mossel, B. Moreno, CB Struijk (eds.). *International Microbiology*, 8(4), 298-299.
- Dubach, J. (1980). *El ABC para la quesería rural del Ecuador*. Retrieved from
- FAO, F., OMS, P., & UNICEF. (2020). *La seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo*. Retrieved from

- Flores, A. d. M. (2018). Variedades de Queso 2: La Maduración en los tipos de queso.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). *Fundamentals of cheese science*: Springer.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L., Cogan, T. M., & Guinee, T. P. (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects*: Elsevier.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L.H., Cogan, T. M. and Guinee T. P. . (2004). *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology* (Third edition ed. Vol. Volume 2 Major Cheese Groups).
- Fuquay, J. W., Fox, P.F., McSweeney, L.H. (2011). *Encyclopedia of dairy sciences* (J. W. Fuquay, Fox, P.F., McSweeney, L.H. Ed. Second ed.). London: Fuquay, J. W., Fox, P.F., McSweeney, L.H.
- González Cortés, M. d. C., Fernández Sánchez, L., Avila Jiménez, M., Luna Rojas, M. T. A., Soto Téllez, M. d. I. L., Solís Correa, H. E., & Raygoza Maceda, M. I. (2010). Manual de laboratorio de reacciones y enlace químico: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, División de ....
- Govaris, A., Papageorgiou, D. K., & Papatheodorou, K. (2002). Behavior of *Escherichia coli* O157: H7 during the manufacture and ripening of feta and telemes cheeses. *Journal of Food Protection*, 65(4), 609-615.
- Granum, P. (1994). *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 61S-66S.
- Gutiérrez-Méndez, N., B., Vallejo-Cordoba, A. F., González-Córdova, G. V., Nevárez-Moorillón., & Rivera-Chavira, B. (2008). Evaluation of Aroma Generation of *Lactococcus lactis* with an Electronic Nose and Sensory Analysis. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, 91(1), 49-57.
- Hayaloglu, A. (2016). *Cheese: Microbiology of Cheese*.
- Hernandez, A. G. D. (2010). *Tratado de nutrición/Nutrition Treatise: Composición Y Calidad Nutritiva De Los Alimentos/composition and nutritional quality of foods* (Vol. 2): Ed. Médica Panamericana.
- Jonson, M., & Paulus, K. (2005). La Operación de Salado del Queso. *Revista Mundo Lácteo y Cárnico*.
- Juarez, C. E. (1995). *Estudio comparativo entre la calidad bacteriológica de quesos frescos y quesos secos en diez plantas procesadoras de productos lácteos.*, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Keating, P. F., & Gaona Rodríguez, H. (1986). *Introducción a la lactología/Introducción a la lactología*.
- Kornacki, J. L., & Marth, E. H. (1982). Fate of nonpathogenic and enteropathogenic *Escherichia coli* during the manufacture of Colby-like cheese. *Journal of Food Protection*, 45(4), 310-316.
- Kosikowski, E. V., Mistry, V.V. (1997). *Cheese and fermented milk foods* (3rd ed. Vol. 1).
- Lekkas, C., Kakouri, A., Paleologos, E., Voutsinas, L. P., Kontominas, M. G., & Samelis, J. (2006). Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 C. *Food microbiology*, 23(3), 268-276.

- Leuschner, R. G., & Boughtflower, M. P. (2002). Laboratory-scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium*, Enteritidis, and Dublin. *Journal of Food Protection*, 65(3), 508-514.
- López de Alcaide, N. (1988). Caracterización desde el punto de vista físico-químico del queso blanco llanero. *Rev. Fac. Cienc. Vet.*, 131-140.
- Lopez Diaz, J. A., & Martinez Ruiz, N. R. (2018). Perfil sensorial y fisicoquímico del queso chihuahua considerando las preferencias del consumidor. *Agrociencia*, 52(3), 1405-3192.
- Lowrie, R. J., Kalab, M., & Nichols, D. (1982). Curd Granule and Milled Curd Junction Patterns in Cheddar Cheese Made by Traditional and Mechanized Processes<sup>1,2</sup>. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, 65(7), 1122-1129. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82321-7
- Lucius, L., Van Slyke, Ph.D., Charles, A. Publow, A.B. (1910). *The science and practice of cheese making*.
- Magariños, H. (2000). Producción higiénica de la leche cruda. *Guatemala: Producción y Servicios Incorporados*, 6.
- McSweeney, P. L. H. (2007). *Cheese problems solved*.
- Meyer, M. R. (1987). *Elaboración de productos lácteos*. Retrieved from
- Murtagh, T. (1993). En el principio (enciclopedia galáctica).
- Parra Huertas, R. A. (2010). Bacterias ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93-105.
- Peng, S., Hoffmann, W., Bockelmann, W., Hummerjohann, J., Stephan, R., & Hammer, P. (2013). Fate of Shiga toxin-producing and generic *Escherichia coli* during production and ripening of semihard raw milk cheese. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, 96(2), 815-823.
- Raeisi, M., Tajik, H., Razavi, R. S., Maham, M., Moradi, M., Hajimohammadi, B., . . . Mehdizadeh, T. (2012). Essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus*) antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in culture media and Iranian white cheese. *Iranian journal of microbiology*, 4(1), 30.
- Ramirez Ramirez, J. C., Rosas Ulloa, P., Velazquez Gonzalez, M. Y., Ulloa, J. A., & Arce Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *CONACYT*.
- Rash, K., & Kosikowski, F. (1982). Influence of lactic acid starter bacteria on enteropathogenic *Escherichia coli* in ultrafiltration prepared Camembert cheese. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, 65(4), 537-543.
- Renye, J. A., Somkuti, G. A., Paul, M., & Van Hekken, D. L. (2009). Characterization of antilisterial bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolates from Hispanic-style cheeses. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(2), 261-268.
- Revilla, A. (1982). *Tecnología de la leche: procesamiento, manufactura y análisis*: IICA, San José (Costa Rica).
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos

de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44, 464-475.

- Romero del Castillo, R. S., & Mestres Lagarriga, J. (2004). *Productos lácteos Tecnología* (E. UPC Ed.).
- Romero del Castillo Shelly, M., & Mestres Lagarriga, J. (2004). *Productos lácteos: tecnología: Edicions UPC*.
- Schlesser, J., Gerdes, R., Ravishankar, S., Madsen, K., Mowbray, J., & Teo, A.-L. (2006). Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157: H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurized milk. *Journal of Food Protection*, 69(5), 990-998.
- Shirai, K., Guerrero, I., & Lara, P. (1996). Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*, 47, 125-137.
- SSA., & NOM-243-SSA1-2010, N. O. M. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
- Tunick, M. H., D. L., Van Hekken, F. J., Molina-Corral, P. M., Tomasula, J., Call, J., Luchansky, J., & Gardea, A. A. (2008). Queso Chihuahua: manufacturing procedures, composition, protein profiles, and microbiology. *International Journal of Dairy Technology*, 61 (1), 62-69.
- Van Hekken, D. L., Drake, M. A., Corral, F. J. M., Guerrero-Prieto V. M., & Gardea, A. A. (2006). Mexican Chihuahua Cheese: Sensory Profiles of Young Cheese. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, 89(10), 3729-3738.
- van Netten, P., & Kramer, J. M. (1992). Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. *International journal of food microbiology*, 17(2), 85-99.
- Varela, G., & Grotiuz, G. (2008). Fisiología y metabolismo bacteriano. *Uruguay, Editorial Cefa*, 43-58.
- Vásquez, F. C. M., Martínez, G. R., Mancera, V. M. M., Ávila, L. E. O., & Vargas, M. R. (2007). Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (departamento de Boyacá). *Revista de Medicina Veterinaria*(14), 61-83.
- Vásquez, S. M., Suárez, H., & 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.
- Villegas de Gante, A. (2004). *Tecnología Quesera* (Primera ed.): Editorial trillas.
- Wahi, S., Bansal, S., Ghosh, M., & Ganguli, A. (2006). Growth and survival of *Escherichia coli* O157: H7 during manufacture and storage of Indian cheese (paneer). *Foodborne Pathogens & Disease*, 3(2), 184-189.