

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

**EFFECTO DE LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA
LACTOPEROXIDASA EN LECHE SOBRE LA CALIDAD Y
VIDA DE ANAQUEL DEL QUESO FRESCO**

POR:

ELBA YAMILE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

TESIS APROBADA POR LA
**COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE
ORIGEN ANIMAL**

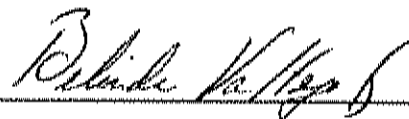
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

JULIO DE 2008

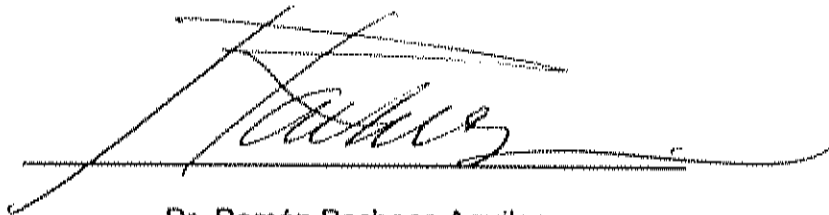
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Ing. Agroindustrial Elba Yamile Martínez Rodríguez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



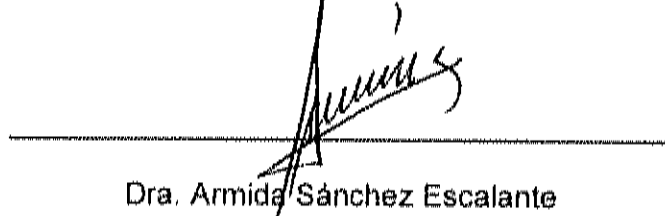
Dra. Belinda Vallejo Galland

Directora de Tesis



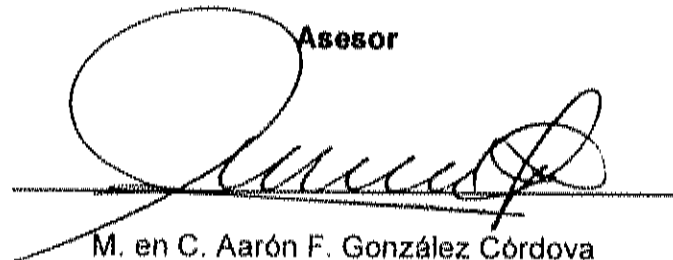
Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Asesor



Dra. Armida Sánchez Escalante

Asesor



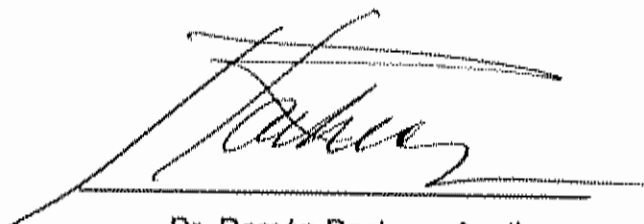
M. en C. Aarón F. González Córdova

Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** en primer lugar por darme la oportunidad de vivir y enseñarme a descubrir que sólo con Él todo es posible.

A mi **Familia** por confiar en mí, apoyarme con sus oraciones y dejarme aprender de mis propias experiencias.

A mi **Familia Zamorana**, especialmente a **los seres más especiales** que de lejos fueron un estímulo importante, gracias Marvin, Luis, Jorge, Francisco, Frank, Silvia, Cecilia, Flor, Andrea y Sara.

A la **Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México** por la beca otorgada para continuar con mis estudios de postgrado.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, (CIAD. A.C.)** por aceptarme como parte de su equipo de profesionales y permitirme aprender de su personal administrativo, técnico y académico.

A mi **Directora de Tesis**, Dra. Belinda Vallejo Galland, por la oportunidad de realizar éste proyecto, por sus sugerencias para completar el desarrollo del mismo y por una nueva opción para continuar en un proceso formativo. Muchas gracias.

A mi **Comité de Tesis** integrado por el M. en C. Aarón F. González Córdova, la Dra. Armida Sánchez Escalante y el Dr. Ramón Pacheco Aguilar, por el apoyo y los consejos brindados durante en esta trayectoria.

A la **Dra. Ana María Calderón de la Barca**, por su colaboración durante mi proceso de aplicación al programa, arribo y estancia en el país. Mi agradecimiento sincero por sus consejos y apoyo continuo.

De igual forma, agradezco a **Doña Nena, Mama Chela y Don Manuelito** por enseñarme a través de sus experiencias de vida, regalarme su cariño sincero y permitirme considerarles personas especiales.

A **mis nuevas hermanas, Ancu y Diana** por haberse convertido en mi familia y apoyarme en cada paso. No olviden que cuentan conmigo, siempre las llevaré en mi corazón y desearé lo mejor para cada una de Uds. Dios las bendiga.

Agradezco de manera muy especial a la **Dra. María Torres Llanez**, por su disposición para enseñarme tópicos del área de microbiología y tecnología de lácteos. Gracias por todo el apoyo, motivación y la amistad compartida.

A los **M. en C. Carmen Estrada, Juan Pablo Valenzuela, Guillermina y María Lugo** por sus enseñanzas técnicas durante la fase experimental de éste trabajo.

A mi **panel sensorial y personal del centro de acopio**, por su tiempo, disposición y colaboración permanente.

Al **personal de la biblioteca** Don Gerardo y Luis, por facilitarme la búsqueda de la información y por su amistad.

A todos **mis compañeros de la generación** por los momentos compartidos, pero de manera especial a **Mis Amigos** "Marisol, Paola, Emmanuel, Irlanda, Luis, Karla, Ismael, Erika y David" por permitirme ser parte de sus vidas y regalarme momentos de alegría.

DEDICATORIA

A Dios

Por hacer de cada momento una oportunidad para aprender, mejorar y descubrir lo magnífico de su bondad. Seguirás siendo mi principio y mi fin Señor.

A Mi Familia

Porque a pesar de la distancia siempre han sido un pilar fundamental en mi vida, es ese ejemplo de amor, fortaleza y tenacidad lo que me enseña a ser constante.

**“Quien busca la justicia y la
misericordia, hallará vida,
prosperidad y honor”**

Proverbios 20:21

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Manufactura de Queso en México.....	3
Sistemas de Producción.....	3
Clasificación de Quesos Mexicanos.....	3
Factores que Determinan la Calidad del Queso Fresco.....	4
Calidad de la Leche.....	4
Contaminación de la Leche por Microorganismos.....	6
Cultivos Iniciadores.....	7
Generalidades de los cultivos iniciadores.....	7
Principales cultivos iniciadores en quesos.....	8
EL Sistema Lactoperoxidasa.....	9
Enzima Lactoperoxidasa.....	10
Iones Tiocianato.....	11
Peróxido de Hidrógeno.....	12
Mecanismo de Acción del SLP.....	12
Aplicación del SLP.....	14
Eficacia del SLP sobre la Calidad Microbiológica de la Leche.....	14
Uso del SLP en el Procesamiento de Lácteos.....	15
Análisis Sensorial y Vida de Anaquel.....	16
OBJETIVOS.....	17
General.....	17
Específicos.....	17

MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Obtención de Leche.....	19
Cultivos Lácticos.....	19
Paquete de Reactivo Comercial.....	19
Selección del Proveedor de Leche.....	19
Evaluación del Efecto de la Activación del SLP en Leche Cruda Almacenada a 4 °C y 35 °C.....	21
Activación del SLP y su Efecto en Leche Cruda.....	21
Monitoreo de Células Somáticas, Mesófilos Aerobios y Coliformes Totales en Leche Cruda.....	22
Análisis de Cuenta de Células Somáticas.....	23
Análisis de Cuenta de Mesófilos Aerobios y Coliformes Totales.....	24
Análisis Microbiológicos en Queso Fresco.....	26
Manufactura de Queso Fresco.....	26
Proceso de Obtención de Queso Fresco.....	27
Efecto del SLP sobre los Cultivos Lácticos Iniciadores.....	31
Análisis de la Composición Química y Parámetros Físicoquímicos.....	32
Evaluación Sensorial y Vida de Anaquel.....	33
Selección y Entrenamiento de Jueces.....	33
Análisis e Interpretación de Resultados.....	36
Vida de anaquel.....	39
Determinación del Rendimiento de la Cuajada.....	41
Diseño y Análisis Estadístico.....	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
Características del Centro de Acopio.....	43
Evaluación de la Calidad de la Leche Cruda con Respecto a Monitoreos de Células Somáticas, Mesófilos Aerobios y Coliformes Totales.....	46

Efecto del SLP sobre el Crecimiento de Mesófilos Aerobios en Leche Cruda Almacenada a 4 °C y 35 °C.....	48
Efecto del SLP sobre el Crecimiento de Coliformes Totales en Leche Cruda Almacenada a 4 °C y 35 °C.....	51
Efecto del SLP en la Composición Química y Parámetros Fisicoquímicos de la Leche Cruda.....	54
Evaluación de la Calidad Microbiológica, Rendimiento, Composición Química y Parámetros Fisicoquímicos del Queso Fresco.....	56
Calidad Microbiológica.....	56
Rendimiento.....	62
Composición Química y Parámetros Fisicoquímicos.....	63
Efecto del SLP sobre el Crecimiento de los Cultivos Iniciadores de <i>Lactococcus lactis spp. lactis</i>	64
Actividad Proteolítica y Mediciones de pH de cultivos iniciadores de <i>Lactococcus lactis spp. lactis</i>	67
Evaluación Sensorial y Vida de Anaquel de Leche y Queso Fresco.....	69
Leche.....	69
Queso.....	71
CONCLUSIONES.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	77

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismo de reacción de la enzima LP (Kussendrager y van Hooijdonk, 2000).....	13
Figura 2.	Esquema modelo para selección de proveedores de materia prima mediante su aseguramiento de calidad (adaptado de Hoeksema y Papadopoulos, 2006).....	20
Figura 3.	Evaluación del SLP activado en leche cruda y almacenada a 4 °C y 35 °C.....	23
Figura 4.	Esquema del proceso de activación de los cultivos iniciadores utilizados para la elaboración de queso Fresco (adaptado de Seifu <i>et al.</i> , 2003).....	28
Figura 5.	Esquema del proceso de manufactura de queso Fresco sin adición de cultivos lácticos (Torres-Llanez, 2002).....	29
Figura 6.	Esquema del proceso de manufactura de queso Fresco con adición de cultivos lácticos (Torres-Llanez, 2002).....	30
Figura 7.	Esquema de evaluación del efecto inhibitorio del SLP sobre cultivos iniciadores (Seifu <i>et al.</i> , 2003).....	32
Figura 8.	Esquema de las instalaciones del centro de acopio y establos de producción lechera.....	45
Figura 9.	Conteo de células somáticas (a), microorganismos de mesófilos aerobios (b) y microorganismos de coliformes totales (c) durante un periodo de 14 días consecutivos.....	47
Figura 10.	Crecimiento de microorganismos de mesófilos aerobios en leche testigo (leche cruda) y leche tratada con SLP almacenada durante 15 h a 4 °C (a, b) y 35 °C (c, d).....	48

Figura 11.	Monitoreo del crecimiento de mesófilos aerobios en leche tratada con SLP y leche testigo (leche cruda) almacenada durante 15 h a 4 °C (a) y a 35 °C (b). Efecto del SLP en el crecimiento de microorganismos de mesófilos aerobios durante la fase de activación a 25 °C por 3 h (c).....	49
Figura 12.	Crecimiento de microorganismos de coliformes totales en leche testigo (leche cruda) y leche tratada con SLP almacenada durante 15 h a 4 °C (a, b) y 35 °C (c, d).....	52
Figura 13.	Monitoreo del crecimiento de microorganismos de coliformes totales en leche tratada con SLP y leche testigo (leche cruda) almacenada durante 15 h bajo refrigeración a 4 °C (a) y 35 °C (b). Efecto del SLP en el crecimiento de microorganismos de coliformes totales durante la fase de activación a 25 °C durante 3 h (c).....	53
Figura 14.	Comportamiento de la composición química vs. parámetro químico y fisicoquímico de leche monitoreada durante 14 días consecutivos.....	55
Figura 15.	Crecimiento de microorganismos de mesófilos aerobios (a), coliformes totales (b) y hongos y levaduras (c) en quesos elaborados con leche cruda tratada con SLP y leche testigo (leche cruda) almacenados durante 15 días.	57
Figura 16.	Crecimiento de microorganismos de mesófilos aerobios (a), coliformes totales (b) y hongos y levaduras (c) en quesos elaborados con leche pasteurizada tratada con SLP y leche testigo (leche pasteurizada) almacenados durante 15 días.	58
Figura 17.	Crecimiento de microorganismos de mesófilos aerobios (a), coliformes totales (b) y hongos y levaduras (c), en quesos	59

	elaborados con leche pasteurizada tratada con SLP y cultivos iniciadores de <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>	
Figura 18.	Desarrollo de la población microbiana de los seis tratamientos para queso Fresco analizado por 15 días: Cuenta viable total (a), coliformes totales (b) y hongos y levaduras (c).....	60
Figura 19.	Rendimiento (%) de seis tratamientos para queso Fresco manufacturado bajo las mismas condiciones.....	63
Figura 20.	Valores promedio del crecimiento (Log_{10} UFC mL^{-1}) y producción de ácido láctico % (v/v) de las cepas C ₁ y C ₂ , en leche tratada con SLP y leche testigo (sin tratamiento de SLP).	65
Figura 21.	Crecimiento y producción de acidez de cultivos lácticos (<i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i>), en leche pasteurizada tratada con SLP y leche testigo durante 8 h de incubación a 30 °C.....	66
Figura 22.	Actividad proteolítica (a) y pH (b) durante el desarrollo de dos cepas de <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> (C ₁ y C ₂) inoculadas en leche estéril, en un período de incubación de 48 h a 30 °C.....	69
Figura 23.	Vida de anaquel de leche pasteurizada tratada con SLP y leche testigo (leche pasteurizada).....	71
Figura 24.	Vida de anaquel de queso Fresco evaluado durante 16 días.....	75

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Especificaciones para leche entera según la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003.....	5
Tabla 2.	Cultivos iniciadores en queso Fresco (Robinson, 1993).....	9
Tabla 3.	Definición de tratamientos experimentales.....	21
Tabla 4.	Escala de valores de células somáticas y su porcentaje de pérdidas económicas de producción de establos lecheros (NMC y USDA, 1985).....	25
Tabla 5.	Definición de tratamientos experimentales para evaluar el efecto inhibitorio del SLP sobre cultivos iniciadores (Seifu <i>et al.</i> , 2003).....	31
Tabla 6.	Generalidades de los proveedores de leche, acopio y tipo de análisis al momento de la recepción.....	44
Tabla 7.	Análisis composicional de leche tratada con SLP y leche cruda (testigo).....	54
Tabla 8.	Composición química y parámetros fisicoquímicos de queso Fresco.....	64
Tabla 10.	Grado de aceptabilidad de queso Fresco elaborado con cepas de origen vegetal y lácteo.....	72

ANEXOS

Anexo 1.	Cuestionario de selección de panelistas.....	34
Anexo 2.	Prueba de Comparación Múltiple (Textura).....	38
Anexo 3.	Prueba de Comparación Múltiple (Sabor).....	39
Anexo 4.	Vida de Anaquel de Queso Fresco.....	40

RESUMEN

La contaminación microbiana generada durante la fase de recolección y transporte de leche cruda, es la principal causa de deterioro de su calidad. Por esta razón, Organismos Internacionales, como la FAO (Food and Agriculture Administration) han promovido investigaciones sobre el uso del sistema lactoperoxidasa (SLP) como alternativa de solución. El SLP actúa mediante la activación de la enzima lactoperoxidasa por la adición y reacción de una fuente externa de tiocianato y peróxido. La reacción tiene como consecuencia el bloqueo del metabolismo bacteriano; su eficiencia está determinada por la temperatura de almacenamiento de la leche durante su transporte. El objetivo de este trabajo de Investigación fue evaluar el efecto de la activación del SLP en leche cruda sobre la calidad del queso Fresco elaborado a partir de ésta. La fase Inicial del estudio comprendió la evaluación de la activación del SLP sobre la calidad microbiológica y composición de la leche cruda y vida de anaquel de la leche pasteurizada. Se evaluaron dos tratamientos (Leche cruda + SLP) almacenados a 4 °C y 35 °C y se compararon con sus dos respectivos testigos (Leche cruda sin activación del SLP). Los análisis microbiológicos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre ambos, tratamiento y testigo, La composición química de la leche tratada con el SLP, la cual no presentó diferencia significativa ($P \geq 0.05$) con respecto al testigo. La segunda fase del estudio, comprendió la evaluación de la vida de anaquel de leche pasteurizada tratada con SLP y leche testigo. La vida de anaquel de la leche pasteurizada tratada con SLP fue incrementada en un 20%, ya que el período fue extendido de 15 a 18 días mientras que la del testigo fue de 15 días. La fase final del estudio, comprendió la evaluación del efecto del SLP sobre cepas de *Lactococcus lactis* spp.lactis (C1 y C2), la evaluación microbiológica de queso Fresco además de su composición, rendimiento y vida de anaquel.

efecto del SLP sobre dos cultivos Iniciadores (cepas de *Lactococcus lactis* spp./act/s, C1 y C2). y se demostró el SLP no Inhibe su crecimiento (UFC/mL), ni la producción de ácido láctico ($P \geq 0.05$). Igualmente, se determinó la actividad proteolítica de los mismos cultivos a las 0, 6, 12, 24 y 48 h. En el ensayo se demostró que la cepa C2 es más proteolítica y acidificante que la cepa C1 ($P < 0.05$). Se realizaron monitoreos microbiológicos (cuenta total de mesófilos aerobios, coliformes totales, hongos y levaduras) y análisis de composición (pH, grasa, humedad, proteína y sólidos totales) durante los 0, 2, 5, 10, 12 y 15 días a seis diferentes tratamientos de queso Fresco. En los parámetros microbiológicos evaluados existió diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos. Sin embargo, los parámetros de composición, humedad, proteína y sólidos totales, no fueron afectados por el SLP ($P > 0.05$). Los quesos elaborados con leche pasteurizada tratada con SLP presentaron mayor rendimiento (5%). El análisis sensorial, determinó que los quesos de mayor aceptación fueron los elaborados con leche tratada con SLP y más la adición del cultivo láctico C1. La vida de anaquel para ambos quesos fue incrementada en un 46%. Los resultados de la investigación mostraron que la conservación de leche cruda con la activación del SLP, permitió mejorar la calidad microbiológica tanto en leche como en queso Fresco. sin afectar su composición química, rendimiento y calidad sensorial; además, de extender su vida de anaquel.

INTRODUCCIÓN

La calidad reducida tanto en leche cruda como pasteurizada, es una consecuencia del crecimiento y actividad metabólica de microorganismos psicrótrofos, que se desarrollan incluso a temperaturas de refrigeración. Aunque la mayoría de estos microorganismos son destruidos con procesos térmicos, algunos tienen el potencial para producir enzimas proteolíticas y lipolíticas resistentes a dichos procesos. Estas enzimas tienen la capacidad de degradar las proteínas y la grasa en los alimentos, y pueden de esta manera reducir su vida de anaquel (Boor *et al.*, 1998). Por ello, la industria demanda el almacenamiento prolongado tanto en leches crudas como en leches pasteurizadas, para tener como resultado productos lácteos de mejor calidad. Por lo que se busca mejorar la calidad microbiana inicial de la leche cruda con efecto sobre la calidad final de los productos derivados de su procesamiento (López, 2004).

El queso es considerado un sistema complejo y su producción depende de factores de producción y de la interacción de microorganismos. En México, la producción de queso Fresco en el año 2004 superó las 41,736 toneladas, lo que representa el 38% del total de la producción de queso en el país (SAGARPA, 2005). El queso Fresco es elaborado con leche entera o parcialmente descremada; de textura suave, cremosa y con alto contenido de humedad (Torres *et al.*, 2006).

La principal problemática del queso Fresco es su limitada vida de anaquel, ya que el manejo inadecuado de la leche cruda durante su fase de recolección y transporte, ocasiona una proliferación acelerada de microorganismos que deterioran su calidad. Las pérdidas por efecto del inadecuado sistema de transporte son un problema importante en la producción lechera de los países en desarrollo. Los productores a pequeña escala podrían incrementar su participación en la producción, procesamiento y comercialización si logran reducir sus pérdidas por mala calidad (FAO, 2005).

Lo que ha fomentado un creciente interés por estudiar sistemas antimicrobianos naturales de aplicación industrial. Uno de ellos es el sistema lactoperoxidasa (SLP) (Kussendrager y van Hooijdonk., 2000; Seifu *et al.*, 2005), compuesto por la enzima lactoperoxidasa, tiocianato y peróxido de hidrógeno (Althaus *et al.*, 2001). La reacción de los tres componentes genera compuestos intermedios con efecto bacteriostático y bactericida sobre algunos microorganismos (AESA/MSC, 2005).

A pesar de que el queso Fresco es un producto susceptible de contaminación, muy pocos estudios han evaluado el efecto del uso del SLP sobre su calidad y vida de anaquel. Por esto, se considera importante evaluar el efecto de este sistema en un estudio que integre la evaluación de parámetros de composición, microbiológicos y sensoriales en queso Fresco.

ANTECEDENTES

Manufactura de Queso en México

Sistemas de Producción

En México existen 3 sistemas de producción de leche: el intensivo, el de traspatio y el de doble propósito. Los tres sistemas destinan su producción a la manufactura de quesos, pero la principal cantidad de leche para producir quesos proviene del sistema de doble propósito (Villegas de Gante, 2004). Los tres sistemas de producción difieren en cantidad y calidad de la leche, debido al grado de tecnificación utilizado en cada uno.

A nivel nacional se producen al menos 30 tipos de quesos diferentes, sin considerar algunas variantes entre regiones que incrementarían esta cifra. La mayoría de los quesos son manufacturados a partir de leche cruda, con técnicas artesanales y carentes de control de calidad (Villegas de Gante, 2004). Con la cual, los quesos elaborados bajo estas condiciones presentan un mínimo de higiene y calidad sanitaria constante (Seifu *et al.*, 2004a). Esto trae como consecuencia la obtención de productos heterogéneos, en cuanto a su calidad microbiológica, composicional y sensorial.

Clasificación de Quesos Mexicanos

Según la Norma Oficial Mexicana (NOM-121-SSA1-1994), clasifica a los quesos en tres grupos: frescos, maduros y procesados, existiendo dentro de cada grupo diferentes subdivisiones. Otra clasificación la menciona Villegas de Gante (2004), clasifica los quesos mexicanos como: auténticos, análogos y procesados de acuerdo al tipo de leche, aditivos y textura de los mismos.

La NOM-121-SSA1-1994, define los quesos frescos como: "Productos de alto contenido de humedad, sabor suave, sin corteza, con ingredientes opcionales y un período de vida de anaquel corto; que requieren de condiciones de refrigeración". Dentro de la misma norma, el queso Fresco se subdivide en tres tipos: frescales, de pasta cocida y acidificados. La norma especifica que el queso Fresco debe carecer de sabores y olores diferentes a los típicos de la leche. El resultado de la prueba química de fosfatasa residual no debe ser superior a 12 UFC/g y el único aditivo permitido es cloruro de calcio al 0.02%. Finalmente, desde el punto de vista microbiológico el conteo de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* debe ser negativo.

Factores que Determinan la Calidad del Queso Fresco

Existen varios factores que determinan la calidad del queso Fresco como producto terminado, entre los que se incluyen: la genética y el manejo de los animales. Además, las prácticas de ordeño durante la fase de producción lechera y los respectivos procesos de manufactura en las industrias también son claves. Sin embargo, se consideran como factores determinantes de su calidad, la leche cruda y la selección de un adecuado cultivo iniciador (Villegas de Gante, 2004).

Calidad de la Leche

La leche es un producto fresco, obtenido del ordeño higiénico e interrumpido de vacas sanas, es un fluido limpio, libre de calostro y materias extrañas a su naturaleza; con olor, color, sabor y aspecto característico. La calidad de la leche, como de cualquier otro producto o insumo, hace referencia al ajuste de sus especificaciones. Las mismas que son definidas a partir de su composición química, cualidades organolépticas y microbiológicas establecidas según la normatividad de cada país (Vargas, 2006).

La NOM-155-SCFI-2003, para leche y fórmulas lácteas, establece los límites máximos y mínimos de sus componentes (Tabla 1). De acuerdo a esto se establece que al momento de la recepción de la misma es la acidez. Además, debe estar libre de residuos de antibióticos, conservadores o sustancias químicas no reguladas. Los límites de acidez por lo general son limitados, y su análisis es estricto (Vargas, 2006). De tal forma, el monitoreo de la calidad de la leche durante su recepción y procesamiento garantizan la obtención de productos de calidad uniforme (Villegas de Gante, 2004).

Los valores fuera de lo establecido por la NOM-155-SCFI-2003, automáticamente, indican un rechazo de la materia prima; debido a que al ser evaluado el producto final bajo los mismos parámetros, resulta sencillo detectar incumplimientos. Por otra parte, los tratamientos térmicos (pasteurización, esterilización) a los que se somete la leche durante la fase productiva, no causan ningún cambio drástico en los valores de su composición química, sino más bien en su calidad microbiológica (Vargas, 2006).

Tabla 1. Especificaciones para leche entera según la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003.

Especificaciones	Límite
Densidad a 15°C, g/ml	1.029 mín
Grasa butírica g/L	30 mín
Acidez (expresada como ácido láctico), g/L	1.3 mín - 1,7 máx
Sólidos no grasos de la leche, g/L	8.3 mín
Lactosa, g/L	43 min - 50 máx
Caseína, g/L	21 mín

Así, cualquier cambio sobre en la composición química debe ser realizado a través del manejo de los establos lecheros, mediante el control de factores endógenos como la especie o raza del animal, la carga genética, el estado fisiológico y eventuales estados patológicos (Vargas, 2006), lo que

posiblemente afectaría de manera directa la calidad fisicoquímica de la leche y derivados.

Contaminación de la Leche por Microorganismos

Las principales causas de contaminación microbiana en leche se relacionan con problemas de limpieza de los equipos al momento de la ordeña. Kyozaire (2003) asoció la presencia de *Bacillus cereus* y *Enterococcus faecalis* con malas prácticas de sanitización en la fase de ordeña en sistemas de producción intensivo y semi-intensivo.

Se ha reportado que los principales microorganismos patógenos en leche cruda y quesos son *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas fluorescens* (Rodríguez *et al.*, 1997; McLay *et al.*, 2002). De igual forma, vacas mastíticas o con infección en las glándulas mamarias, incrementan notablemente la cuenta total microbiana; expresada como unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL). No existen cifras oficiales de los contenidos bacterianos de la leche en diferentes zonas de México. Sin embargo, resultados de investigaciones desarrolladas en otras regiones, en la mayoría de los casos indicaron que al momento de la entrega, la leche presenta un alto contenido microbiano (Hazard, 1997).

En general, una alta cuenta de microorganismos en la leche o en sus derivados, son un indicativo de inadecuadas condiciones sanitarias durante su producción y almacenamiento, situación que conduce a una limitada vida de anaquel. Por otro lado, las cuentas microbianas elevadas en leche cruda, indican contaminación durante las operaciones de ordeño, manipulación o almacenamiento, o bien un deficiente sistema de refrigeración. La leche almacenada bajo refrigeración, permite mantener en un grado aceptable su calidad y disminuye el deterioro por efecto del crecimiento microbiano (Zeng *et al.*, 2007).

Cultivos Iniciadores

Generalidades de los cultivos iniciadores. Un cultivo iniciador es una mezcla de bacterias ácido lácticas (BAL), que transforman la lactosa en ácido láctico mediante procesos controlados de fermentación (Robinson y Wilbey, 1998; Leroy y De Vuyst, 2004). De igual forma, se producen ácido láctico, ácido acético, etanol y compuestos aromáticos que contribuyen a la formación de perfiles sensoriales en diferentes alimentos (Leroy y De Vuyst, 2004). Actualmente, el desarrollo de técnicas moleculares ha permitido identificar cepas BAL aislados de diferentes fuentes. El objetivo principal es mejorar las propiedades funcionales de los cultivos iniciadores, para desarrollar características sensoriales específicas en los productos fermentados. Gracias a esto último algunas características de sabor y aroma en variedades de quesos artesanales han sido mejoradas (Ross *et al.*, 2000).

Los cultivos iniciadores son clasificados en dos grupos de acuerdo a su viabilidad a diferentes temperaturas. Se conocen como cultivos mesófilos aquellos que se desarrollan entre 20 - 30°C y termófilos a aquellos entre 30 - 45°C. La selección del cultivo a utilizar es dependiente de la variedad y tipo de queso. Por lo general, los cultivos mesófilos se utilizan en la producción de quesos suaves y los termófilos en algunas variedades de quesos madurados (Fox, 1987). El uso de cultivos iniciadores en la producción de alimentos genera cambios deseables en atributos específicos como sabor y aroma (Seifu *et al.*, 2005).

Las bacterias ácido lácticas producen cambios en los perfiles de sabor y aroma de los alimentos, gracias a procesos metabólicos y bioquímicos como la glicólisis, proteólisis y lipólisis (Pérez *et al.*, 2003). Así, se generan compuestos como ácido láctico, ceto-ácidos, ésteres, aldehídos, compuestos azufrados, alcoholes y ácidos carboxílicos, por mencionar los más importantes (Robinson y Wilbey, 1998), que son responsables del sabor y aroma en los productos lácteos fermentados. En general, la diversidad de los

microorganismos y sus funciones, son factores que determinan los atributos sensoriales de los alimentos (Peláez y Requena, 2005). Lo anterior deja manifiesto de que la calidad final de los productos, puede ser afectada por una inadecuada selección del cultivo iniciador y las condiciones del procesamiento.

Principales cultivos iniciadores en quesos. Los cultivos más utilizados son *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus* y algunas especies del género *Leuconostoc* (Walstra *et al.*, 1999). Por su función, algunas bacterias de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* se consideran cultivos acidificantes y aromatizantes (Villegas de Gante, 2004). La clasificación de los microorganismos de mayor importancia en procesos de manufactura de quesos, de acuerdo a su función de productoras de gas y sabores típicos en algunos alimentos (Tabla 2) fue propuesta por Robinson (1993).

Se han realizado investigaciones sobre el aislamiento y caracterización de cepas de algunos tipos de quesos y leches de diferentes especies. Morales *et al.* (2003), agruparon cepas de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* y *cremoris*, y *Lactococcus lactis* spp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Las cepas fueron aisladas de muestras de leche de oveja y quesos elaborados a partir de la misma, empleando técnicas moleculares (PCR) para su identificación. De la misma forma, Pérez *et al.* (2003), aislaron y caracterizaron tecnológicamente 130 tipos de bacterias ácido lácticas específicas de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* de queso Tenerife. En todos los casos, los resultados mostraron que las cepas desarrollaban un perfil de sabor y aroma en productos lácteos, con potencial aplicabilidad a nivel industrial.

Tabla 2. Cultivos iniciadores en queso Fresco (Robinson, 1993).

Tipo	Función
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Producción de ácido
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Producción de ácido
<i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	Producción de sabor, gas y ácido
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Producción de gas y sabor
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Alta producción de ácido en gran escala
<i>Lactobacillus helveticus</i>	
<i>Streptococcus durans</i>	Alta producción de ácido y sabor intensas
<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Producción de gas y sabor

El Sistema Lactoperoxidasa

El sistema lactoperoxidasa (SLP) está compuesto por la enzima lactoperoxidasa (LP), presente de manera natural en la leche. El ión tiocianato como fuente de (SCN^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Reiter y Härnult, 1984; Fonteh *et al.*, 2005; Adolphe *et al.*, 2006). En el sistema, la enzima LP cataliza la oxidación de los iones SCN^- en presencia de H_2O_2 , que a su vez generan productos reactivos como: iones hipotiocianatos, ácidos cianosulfurosos y cianosulfúricos de amplia actividad antimicrobiana (Barret *et al.*, 1999; Kussendrager y van Hooijdonk, 2000; Fonteh *et al.*, 2005; Seifu *et al.*, 2005).

El SLP es considerado un antimicrobiano natural (Bosch *et al.*, 2000; Seifu *et al.*, 2005). Su uso ha sido propuesto como método alternativo de bio-preservación de leche cruda, lácteos (Kelly y Fox, 2006) e incluso otros

alimentos (Seifu *et al.*, 2005). Este sistema se explota ya de manera comercial, existiendo un incremento en su uso y aplicabilidad en procesos industriales. Las propiedades del SLP y el aumento por restringir el uso de aditivos químicos, han incrementado su aplicación (Kussendrager y van Hooijdonk, 2000).

Enzima Lactoperoxidasa

La enzima LP (EC 1.11.1.7) pertenece a la familia de las peroxidases. Forma parte de un grupo natural de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, que se encuentran en plantas y animales, incluyendo al hombre (Kussendrager y van Hooijdonk, 2000). Su función es catalizar la oxidación de diversos componentes en presencia de H₂O₂ (Reiter y Hårnolv, 1984; Adolphe *et al.*, 2006), resultando en la producción de compuestos químicos con efecto bacteriostático y bactericida.

La concentración de la enzima LP depende de la especie animal, tipo de alimentación y período de lactancia (Althaus *et al.*, 2001, Fonteh *et al.*, 2002). En leche bovina se han registrado niveles de 30 mg/L (Bosch *et al.*, 2000), lo que constituye el 0.5% de las proteínas del suero (de Wit y van Hooydonk, 1996). Para valorar la actividad de la LP se han utilizado sustratos como pirogalol, O-dianisidina y O-fenilendiamina. Pero por ser considerados inestables y tóxicos han sido sustituidos por ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenztiazolina-6-ácido sulfónico) (Zapico, 1993) como sustrato de la reacción.

La enzima LP es una glicoproteína con un grupo hemo (protoporfirina IX), constituida por 612 aminoácidos (Cals *et al.*, 1991). Sin embargo, en un estudio realizado por Boots y Floris (2005), fue reportado que la enzima está constituida por 608 residuos aminoácidos. La LP tiene un peso molecular de 78 kDa y un punto isoeléctrico de 9.6 (Kussendrager y van Hooijdonk, 2000).

Para su aislamiento y caracterización, ha sido empleada la técnica de cromatografía de intercambio catiónico (Hernández *et al.*, 1990).

La enzima LP es resistente a la acción de enzimas proteolíticas, como la tripsina y termolisina, pero es ligeramente susceptible a quimotripsina. Desde el punto de vista fotoquímico, la enzima se inactiva cuando es expuesta a la luz en presencia de riboflavina y oxígeno, bajo determinadas condiciones (Hernández *et al.*, 1990). Además, es sensible al calor aunque mantiene su actividad incluso después de haberse sometido a temperaturas de pasteurización (72 °C por 15 segundos) (Barret *et al.*, 1999). Sin embargo, a medida que la temperatura es incrementada a aproximadamente 80 °C, la actividad de la enzima decrece, hasta no ser detectada (Marks *et al.*, 2001). La resistencia de la enzima a temperaturas de pasteurización ha sido objeto de estudio, pero pocos estudios se han realizado acerca del efecto del SLP sobre los cultivos iniciadores utilizados en la elaboración de productos lácteos fermentados.

Iones Tiocianato

El ión tiocianato (SCN^-) se encuentra ampliamente distribuido en tejidos y secreciones animales; ha sido encontrado en glándulas mamarias, salivares, tiroides, en el estómago, riñón y algunos fluidos biológicos como el plasma y linfa (Reiter y Hårmulv, 1984; Kussendrager y van Hooijdonk, 2000). Otras posibles fuentes de SCN^- son los glucosinolatos y los glucósidos cianogénicos (AESA/MSC, 2005). La concentración de SCN^- en leche bovina varía de 1 a 15 ppm, dicha variación ha sido asociada al régimen alimenticio, la raza y salud de los animales. Sin embargo, para activar el SLP se requiere de 15 ppm de iones SCN^- (Seifu *et al.*, 2005).

Peróxido de Hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es el tercer componente del SLP y generalmente no es detectado en leche (FAO, 2000). Sin embargo, durante el período de lactancia el tejido de las glándulas mamarias es metabólicamente muy activo y el compuesto puede ser generado (Reiter y Härnultv, 1984), siendo rápidamente reducido por acción de otras enzimas. También, puede generarse de manera endógena por polimorfismo nuclear de leucocitos o por microorganismos catalasa-negativos. Otra fuente de H_2O_2 , es la actividad metabólica de las bacterias ácido lácticas (BAL) propias de la leche o agregadas como cultivo iniciador. Las bacterias del género *Lactobacillus* spp. y *Lactococcus* spp. producen cantidades suficientes del compuesto en condiciones aerobias (Reiter y Härnultv, 1984). Por lo tanto, el SLP puede ser activado, por el peróxido de hidrógeno producido por las BAL.

Cuando las cantidades de H_2O_2 no son las suficientes para activar el SLP, el compuesto puede ser agregado de manera exógena (Björck *et al.*, 1975). Los compuestos más utilizados comercialmente para proveer de H_2O_2 al sistema son percarbonato de sodio y peróxido de magnesio (Kussendrager y van Hooijdonk, 2000). Otro químico utilizado es peroxihidrato de carbonato de sodio (Adolphe *et al.*, 2006) y la dosificación es dependiente de las diferentes marcas comerciales disponibles en el mercado.

Mecanismo de Acción del SLP

El SLP actúa en presencia de la enzima LP, de SCN^- y H_2O_2 (Barrett *et al.*, 1999; Seifu *et al.*, 2005; Fonteh *et al.*, 2005). La enzima LP cataliza la peroxidación de SCN^- y algunos haluros, generando compuestos con actividad antimicrobiana (Kussendrager y van Hooijdonk, 2000). El compuesto de mayor producción es el hipotiocianato (OSCN) (Ratner y

Prince, 1999), ácidos cianosulfurosos (HO_2SCN) y ácidos cianosulfúricos (HO_3SCN), los cuales son considerados fuertes agentes antimicrobianos (Barrett *et al.*, 1999). Su efecto bacteriostático y bactericida sobre algunas especies de microorganismos, es atribuido a los productos intermedios producidos en la reacción.

La acción antimicrobiana del SLP se debe a la oxidación de los grupos sulfhidrilos de las proteínas, lo que genera alteración de las funciones celulares como la integridad de las membranas y los sistemas de transporte, e inhibición del metabolismo de ciertas enzimas (Elliot *et al.*, 2003). En el proceso de activación del SLP ocurren 3 fases que originan la formación de compuestos con efecto antimicrobiano. En la primera fase, la enzima LP cataliza la oxidación de SCN^- en presencia de H_2O_2 . En las fases siguientes, se forman los compuestos antimicrobianos (hipotiocianatos, ácidos cianosulfurosos y cianosulfúricos). El modelo más completo sobre la explicación del mecanismo del sistema fue propuesto por de Wit y van Hooijdonk en 1996 (Figura 1).

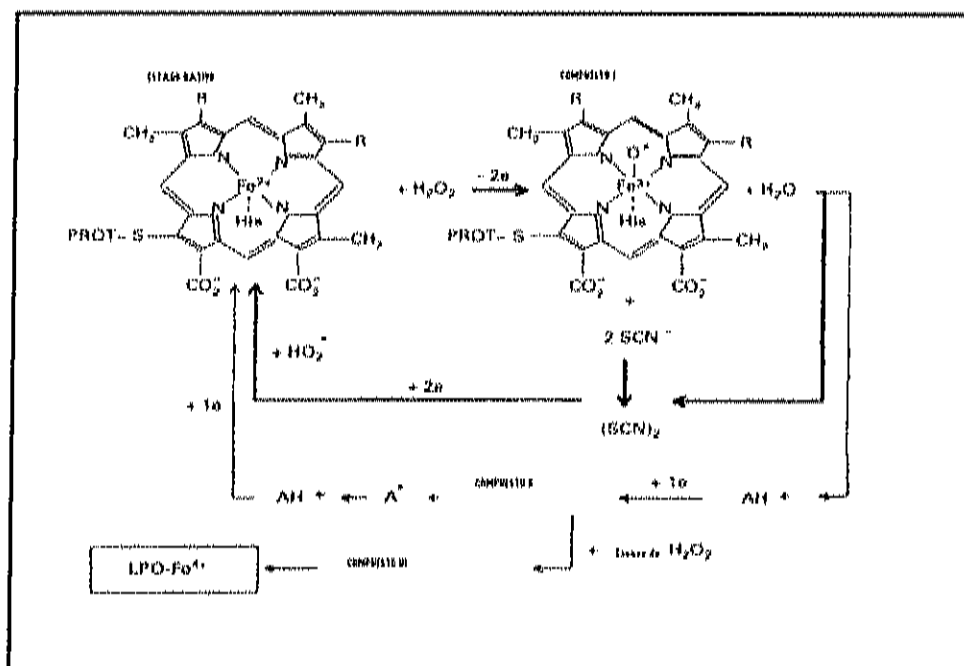


Figura 1. Mecanismo de reacción de la enzima LP (Kussendrager y van Hooijdonk, 2000).

Aplicación del SLP

Eficacia del SLP sobre la Calidad Microbiológica de la Leche

La eficacia del SLP en el mejoramiento de la calidad microbiológica de leche cruda, ha sido demostrada experimentalmente en diferentes regiones y especies animales. La primera investigación sobre el SLP fue realizada por Hansen (1924). A partir de los 70's Björck *et al* (1975), se realizaron varias investigaciones que explicaron los conceptos claves y principios del mecanismo.

Según Björck *et al.* (1975), la activación del SLP en leche cruda genera productos de oxidación a partir del tiocianato. Estos productos inhiben el crecimiento de bacterias gram-negativas como *Pseudomonas* y *Escherichia coli*. Por otra parte, Reiter y Hårnulf (1984) postularon al SLP como un método de preservación de leche cruda bajo condiciones de refrigeración o en ausencia de la misma. Posteriormente, Gaya *et al.* (1991) demostraron la eficacia del sistema contra *L. monocytogenes* en leche cruda refrigerada a 4 °C y 8 °C. Sin embargo, se considera que la eficiencia del sistema está directamente relacionada con la calidad microbiológica inicial de la leche y la temperatura durante su transporte a los centros de acopio y plantas industriales.

Actualmente, las investigaciones se han dirigido a evaluar efectos combinados del SLP con otros mecanismos de preservación. Rodríguez *et al* (1997) reportaron un efecto sinergista al combinar diferentes bacteriocinas con el SLP contra *Listeria monocytogenes* en leche almacenada a 4 °C. Además, McLay *et al.* (2002) aplicaron el SLP en combinación con monolaurín y evaluaron su efecto contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Otro tipo de investigaciones han sido enfocadas a estudiar efectos combinados entre altas presiones hidrostáticas y el SLP (García-Graells *et*

al., 2003). Los resultados han sido efectivos contra microorganismos patógenos y actualmente los sistemas son considerados agentes antimicrobianos.

Uso del SLP en el Procesamiento de Lácteos

Según Björck (1978), la leche cruda sin activación del SLP se mantiene sin crecimiento de psicrótofos (microorganismos que pueden crecer a temperaturas entre -5 y 5 °C, aún cuando su temperatura óptima sea 18 °C) por un período de 48 h a 5 °C. Sin embargo, al activar el SLP utilizando concentraciones de 0.25 mM de tiocianato y peróxido de hidrógeno, el período de duración de la leche se ve incrementado a 5 días, si la leche es almacenada a 4 °C. En general, el efecto bactericida del SLP es dependiente de la temperatura y la duración aproximada para su acción es de 4 h a 30 °C, (Björck, 1978).

Las primeras evaluaciones del SLP enfatizaban su uso como método de preservación de leche cruda, sin embargo en la actualidad se recomienda su aplicación en otros productos como hortalizas (Seifu *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la activación del SLP en leche pasteurizada (72 °C por 15 segundos) mejora sus atributos de calidad. Sin embargo, no ocurre lo mismo en leche sometida a 80 °C por 15 segundos (Barret *et al.*, 1999). Por lo tanto, la efectividad del SLP a nivel industrial podría ser dependiente de las condiciones de procesamiento de los diferentes alimentos.

La activación del SLP en productos lácteos fermentados también ha sido investigado. Seifu *et al.* (2004b), reportaron que la activación del SLP mejora la calidad microbiológica y el sabor de queso Gouda, sin afectar su composición química. Por otra parte, en yogurt la concentración de sólidos y proteínas no se ve afectada al activar el sistema (Hirano *et al.*, 1998; Özer *et al.*, 2003). Sin embargo, la función del cultivo iniciador es inhibida al utilizar

concentraciones >10 ppm de los sustratos para activar el SLP (Khalid y Masud, 2004), afectando los atributos de calidad del yogurt con respecto a la textura.

Por los beneficios mencionados sobre la aplicación del SLP, es importante realizar investigaciones que evalúen la utilización del SLP sobre parámetros microbiológicos, de composición y sensoriales de queso Fresco, que permitan obtener un producto de mejor calidad y mayor vida de anaquel. El SLP podría ser considerado como un método natural de preservación de leche cruda, principalmente en lugares de clima tropical, donde por razones económicas y/o técnicas, no sea fácil implementar condiciones óptimas para su preservación, durante la primera fase en la producción de leche.

Análisis Sensorial y Vida de Anaquel

Ojeda (2005), definió el análisis sensorial como la identificación, el análisis y la interpretación de los atributos de un producto que se perciben a través de los cinco sentidos: vista, olfato, gusto, tacto y oído. La cata de un producto es realizada con el objetivo de comunicar y contribuir a la toma de decisiones con respecto a la calidad del mismo. Por ello, es importante prestar atención a los resultados de éste tipo de análisis que pueden ser utilizados en 4 casos diferentes:

- a) Comprobar si la calidad del producto se ajusta con los objetivos y especificaciones.
- b) Decidir si se considera algún cambio en la formulación de un producto.
- c) Promocionar el producto.
- d) Buscar la aprobación del cliente.

Para ello, se han desarrollado diferentes pruebas o índices cuantitativos, utilizados tanto para describir objetivamente la calidad, como para permitir obtener un nivel de calidad satisfactorio y constante. Los alimentos son perecederos por naturaleza y durante el procesamiento, distribución y almacenamiento, están expuestos a numerosos factores, que podrían afectar sus condiciones organolépticas y disminuir su período útil, antes de su consumo o término conocido como "vida de anaquel" (Santillán, 2006). La implementación de dichas técnicas permitirá a las empresas obtener información acerca de si la calidad del producto se ajusta o no a las especificaciones.

Finalmente, por ser la contaminación microbiana durante la fase de recolección y transporte de la leche cruda la principal causa del deterioro de su calidad. Se considera la activación del sistema lactoperoxidasa como una alternativa de preservación de la leche cruda, con efecto sobre la calidad de la leche pasteurizada y una mayor vida de anaquel del queso Fresco obtenido a partir de ésta.

OBJETIVOS

General

- Evaluar el efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa sobre la calidad microbiológica y vida de anaquel de leche pasteurizada y queso Fresco elaborado a partir de ésta.

Específicos

1. Determinar el efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa en leche cruda sobre la composición química, parámetros fisicoquímicos y la calidad microbiológica.

2. Determinar el efecto de la activación del sistema lactoperoxidasa sobre la calidad microbiológica, composición química, rendimiento y parámetros fisicoquímicos de queso Fresco.
3. Evaluar el efecto del sistema lactoperoxidasa sobre el crecimiento de las bacterias ácido lácticas de los cultivos iniciadores utilizados en la elaboración del queso Fresco.
4. Determinar la calidad sensorial y vida de anaquel de leche pasteurizada y queso Fresco obtenidos a partir de leche cruda tratada con el sistema lactoperoxidasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Leche

La leche cruda de bovinos, fue proporcionada por el centro de acopio (CA) de la Asociación Ganadera Local de Productores de Leche de Hermosillo de la Unión Ganadera Regional de Sonora (UGRS) (Hermosillo, Sonora, México). Las muestras fueron mezclas de leches de diferentes productores.

Cultivos Lácticos

Las cepas de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* (C₁ y C₂), se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Lácteos, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (Hermosillo, Sonora, México).

Paquete de Reactivo Comercial

Los análisis microbiológicos para microorganismos mesófilos aerobios, coliformes totales, hongos y levaduras, se realizaron utilizando paquetes de reactivos comerciales RIDA®COUNT (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania); adquiridos a través de su representante en México, R-Biopharm AG (México D. F., México).

Selección del Proveedor de Leche

El proveedor de leche fue seleccionado con base en el esquema propuesto por Hoeksema y Papadopoulus (2006) (Figura 2). El esquema inicia con la identificación de los cuatro factores principales que alteran la calidad de leche cruda a nivel de establos como son: el estado de salud de los animales, su

manejo y control, el tipo de sistema de producción y las condiciones ambientales. Bajo estos parámetros, los centros de acopio seleccionan a los establos que cumplan con estándares de calidad establecidos por la normativa de cada país. Una vez caracterizados los establos, se definen los tipos de análisis a realizar en la leche al momento de ser recibida; se selecciona el sistema de transporte, y se establecen relaciones comerciales con plantas procesadoras.

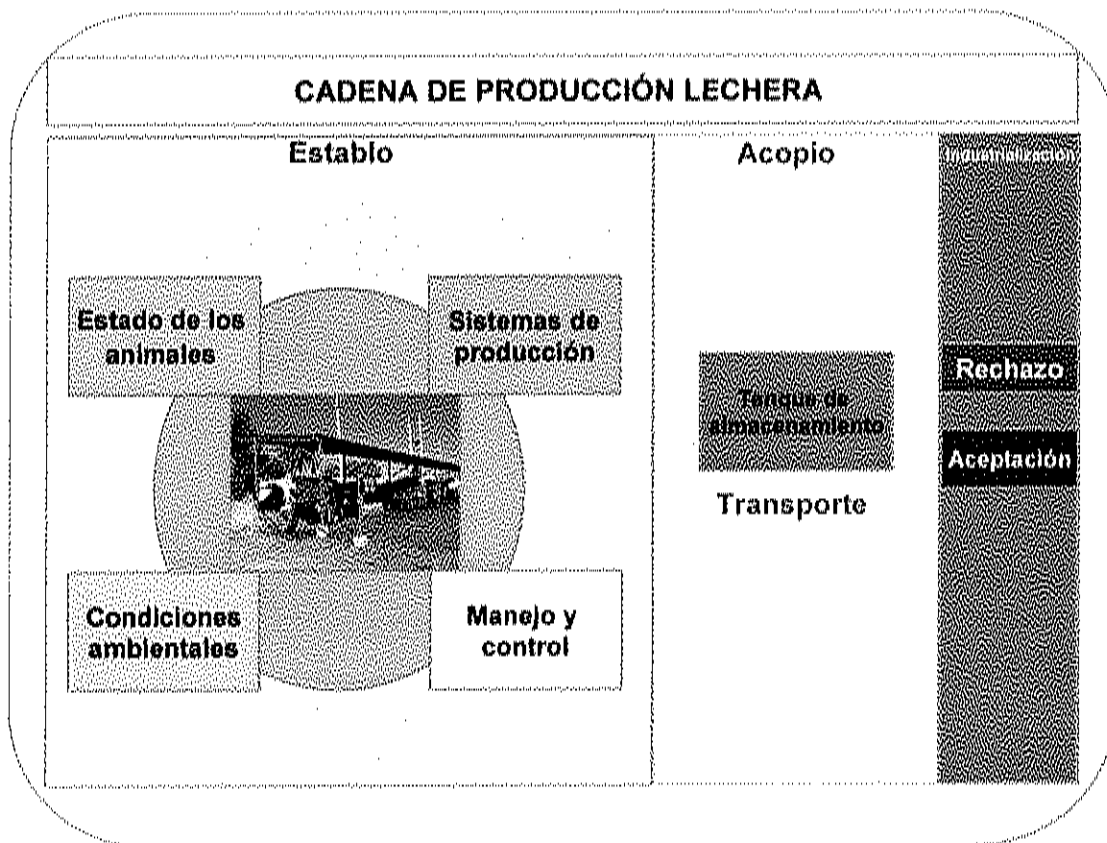


Figura 2. Esquema modelo para selección de proveedores de materia prima mediante un sistema de aseguramiento de calidad (adaptado de Hoeksema y Papadopoulos, 2006).

Evaluación del Efecto de la Activación del SLP en Leche Cruda Almacenada
a 4 °C y 35 °C

Se establecieron 4 tratamientos experimentales con el objetivo de evaluar el efecto de la activación del SLP en leche cruda almacenada a temperaturas de 4 °C y 35 °C (Tabla 3).

Tabla 3. Definición de tratamientos experimentales.

Descripción del tratamiento	Tipo de tratamiento	Temperatura de almacenamiento
Leche cruda	Testigo	4°C
Leche cruda + SLP	Tratamiento	4°C
Leche cruda	Testigo	35°C
Leche cruda + SLP	Tratamiento	35°C

Activación del SLP y su Efecto en Leche Cruda

Muestras de leche cruda de bovinos fueron recolectadas en instalaciones de la UGRS (Hermosillo, Sonora, México), las muestras fueron transportadas en recipientes de plástico de aproximadamente 15 L de capacidad. Los valores promedio de temperatura al momento de la recolección de la leche fluctuaban entre 2 °C – 5 °C y el pH fue de 6.7. Una vez obtenidas las muestras, fueron transportadas a la planta piloto del Laboratorio de Lácteos a 4 °C.

Para la activación del SLP en leche cruda se utilizó Acténine B.S® (Bio serae, Bram, Francia), que contiene rhodanide de sodio (fuente de SCN⁻) y percarbonato de sodio (fuente de H₂O₂). Estos sustratos, se adicionaron según las conversiones sugeridas por el proveedor Bio serae (1 y 1.5 g de cada sustrato respectivamente por cada 50 L de leche). Para activar el sistema, 2 L de leche se separaron en dos frascos estériles de 1.000 mL de capacidad, correspondientes a los tratamientos y testigos del experimento.

Posteriormente se pesaron 0.02 g de rhodanide de sodio y 0.03 g de percarbonato de sodio, basado en las conversiones del producto comercial Acténine B.S®. Los productos pesados se agregaron a las muestras de leche con temperatura de 25 °C; las sustancias de rhodanide de sodio y percarbonato de sodio fueron añadidos en primer y segundo orden, respectivamente. El intervalo de tiempo estipulado entre la adición de uno y otro compuesto fue 1 minuto, incubándose posteriormente por 3 h. Después de la activación del sistema, las dos muestras de leche se distribuyeron en cuatro frascos estériles de vidrio de 500 mL, identificadas como testigos (leche cruda) y tratamientos (leche cruda + SLP) y fueron almacenados a 4 °C y 35 °C por 3 horas.

Se realizaron análisis sobre parámetros microbiológicos y de composición al momento de ser recibida de la leche (hora 0), y al final del periodo de activación del sistema (hora 3). Posteriormente, se continuaron los análisis microbiológicos durante 15 h en intervalos de 5 horas. Se consideró como variables de respuesta a los conteos microbiológicos de mesófilos aerobios y coliformes totales en UFC mL⁻¹ (Seifu *et al.*, 2004b), y los resultados de los análisis fisicoquímicos de acidez titulable, grasa, proteína, humedad y pH (AOAC, 2000), como se presenta en el esquema general (Figura 3).

Monitoreo de Células Somáticas, Mesófilos Aerobios y Coliformes Totales en Leche Cruda

Con el objetivo de determinar fluctuaciones con respecto a la cuenta de células somáticas (CCS), mesófilos aerobios y coliformes totales, se realizó un seguimiento durante 14 días a muestras de mezclas de leche recolectadas directamente del tanque de almacenamiento del CA (Hermosillo, Sonora, México). Las muestras se recolectaron en recipientes plásticos con capacidad

para 15 L, y siendo la temperatura promedio de la leche al momento de su recolección para este caso fue de 4 °C.

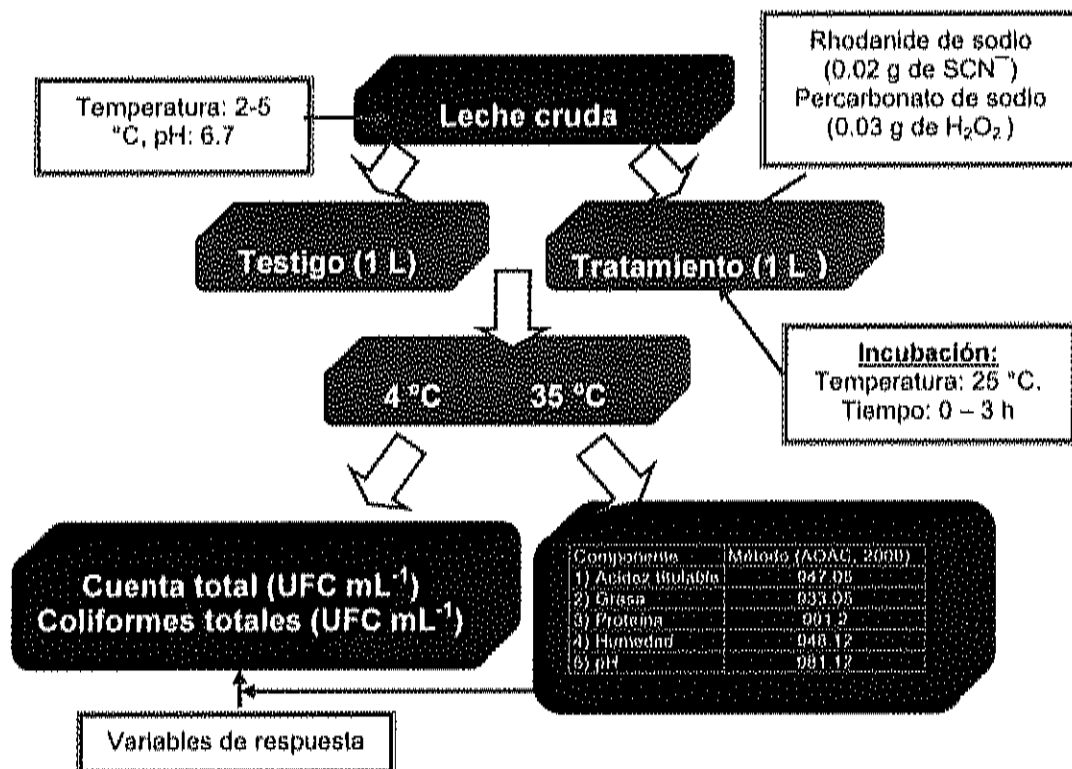


Figura 3. Evaluación del SLP activado en leche cruda y almacenada a 4 °C y 35 °C.

Análisis de Cuenta de Células Somáticas

Se realizó un estudio durante un período de 14 días en el CA. Se estableció que la leche del CA es una mezcla de un total de 11 productores, con un promedio de 220 vacas Holstein cada uno, y una producción de 24 litros por animal. El sistema de ordeño de los establos es mecánico y se realiza dos veces al día para cada caso.

En el CA, después de la recolección matutina de la leche, se procedió a la toma higiénica de una muestra de leche de 50 mL de la parte alta del tanque de almacenamiento. Para la determinación del CCS por mL de leche se utilizó la Prueba de Wisconsin (WMT, por sus siglas en inglés), siguiendo el procedimiento indicado por Ávila *et al.* (2007). El método consistió en tomar una muestra de 3 mL de leche y añadirle 3 mL del reactivo para la prueba. El reactivo se preparó mezclando una solución 25 mL de azul bromocresol (Diagmastin®, Sanfer, S.A. de C.V., México, D.F.) como producto comercial y 25 mL de agua, en una relación (1:1). Los datos fueron valorados en tablas establecidas por el Concilio Nacional de Mastitis (NMC, por sus siglas en inglés) en colaboración con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) en 1985, a partir de extensos estudios en Estados Unidos y otros países. La tabla relaciona resultados de WMT, CCS y pérdida de producción por establo (Tabla 4).

Análisis de Cuenta de Mesófilos Aerobios y Coliformes Totales

Se realizó una dilución inicial transfiriendo 1 mL de leche a 9 mL de solución estéril de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%, según el paquete de reactivos comerciales RIDA®COUNT (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania). Se utilizaron tubos de ensayo de 13 mL de capacidad. Las muestras se homogeneizaron a 2200 rpm por 1.5 minutos utilizando un Mini Vortexer MV1 (IKA Works Inc, Wilmington N.C., USA). Además, cinco diluciones seriadas se llevaron a cabo a partir de la dilución 10^{-1} , transfiriendo 1 mL de la muestra homogeneizada a 9 mL de solución estéril de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9% (v/v). Igualmente se procedió a homogeneizar las mezclas con las diferentes diluciones (Seifu *et al.*, 2004a). La cuenta de mesófilos aerobios y coliformes totales se determinó utilizando el método de cuenta total en placa como método tradicional y con el paquete de reactivos comerciales RIDA®COUNT (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania). Para la siembra se añadió 1 mL y 1

μ L de cada dilución, respectivamente según el método empleado, y se incubó a 35 °C por 24 h en una incubadora (VWR, Batavia IL, USA).

Tabla 4. Escala de valores de células somáticas y su porcentaje de pérdidas económicas de producción en hatos lecheros (NMC y USDA, 1985).

Valor	Conteo de Células Somáticas (CSS/mL)	Pérdida de producción (%)
3	140000	
4	185000	5%
5	195000	
6	210000	
7	240000	
8	305000	8%
9	350000	
10	385000	
11	430000	
12	480000	
13	515000	
14	585000	
15	620000	
16	675000	
17	730000	
18	780000	9 a 18%
19	855000	
20	920000	
21	980000	
22	1055000	
23	1130000	
24	1200000	
25	1280000	
26	1380000	
27	1440000	
28	1525000	
29	1610000	
30	1700000	19 a 25%
31	1800000	
32	1920000	
33	2030000	
34	2180000	
35	2280000	

Análisis Microbiológicos en Queso Fresco

Se pesaron 10 g de muestra de cada tratamiento y testigo, las cuales fueron diluidas por separado en 90 mL de una solución búffer de fosfatos (pH 7.2) y homogeneizadas a 2200 rpm por cinco minutos con un Mini Vortexer MV1 (IKA Works Inc, Wilmington N.C., USA). Las diluciones seriadas se hicieron en búffer de fosfatos (pH 7.2), las cuales se sembraron por vertido o estriado en placa. Se utilizó una incubadora y un contador de colonias (VWR, Batavia IL, USA), los medios y las especificaciones según Torres-Llanes (2002) para aislar los microorganismos en estudio se detallan a continuación.

- a. Conteo total bacteriano: Se determinó sobre agar para conteo en placa (PCA, Difco, USA), incubados a 30 °C por 48 h.
- b. Coliformes totales: Se determinó sobre agar rojo violeta (VRBA, Difco, USA), incubados a 30 °C por 24 h.
- c. Mohos y levaduras: Se determinó sobre agar de papa dextrosa con ácido tartárico al 10% (1.8 mL de ácido tartárico por 100 mL de medio), incubados a 25 °C por 5 días.

Manufactura de Queso Fresco

Previo a la manufactura de los diferentes tratamientos de queso Fresco se activó el SLP en leche cruda. Se utilizaron 20 L de leche para cada tratamiento propuesto.

Los tratamientos fueron:

Queso 1: Elaborado a partir de leche cruda no tratada con SLP.

Queso 2: Elaborado a partir de leche cruda tratada con SLP.

Queso 3: Elaborado a partir de leche pasteurizada no tratada con SLP.

Queso 4: Elaborado a partir de leche pasteurizada tratada con SLP.

Queso 5: Elaborado a partir de leche pasteurizada tratada con SLP + Cultivo láctico C₁.

Queso 6: Elaborado a partir de leche pasteurizada tratada con SLP + Cultivo láctico C₂.

Proceso de Obtención de Queso Fresco

Se elaboraron dos lotes de queso Fresco por tratamiento acorde a la metodología descrita por Torres-LLanez en el (2002), con la variante de activar el SLP en la leche cruda como se ha descrito previamente (Figura 3). Así, se utilizó leche entera de bovino, la cual se pasteurizó a una temperatura de 65 °C por 30 minutos. La leche se enfrió hasta alcanzar 35 °C, temperatura a la que se adicionaron 10⁸ UFC mL⁻¹ de los cultivos lácticos. Posterior a la inoculación, la leche se sometió a reposo por un período de 2 h. Los cultivos lácticos se activaron 1% (v/v) en leche en polvo estéril reconstituida al 10% (p/v) y se incubaron a 30 °C durante 8 y 16 h (Figuras 4 y 5) para los diferentes tratamientos. Además, se adicionó cloruro de calcio CaCl₂ 0.02% (p/v) y renina (15 mL/100 L de leche). Después de agregar la renina, la leche se sometió a reposo durante 1 h para iniciar el proceso de coagulación enzimática. Una vez formada la cuajada, se cortó con una espátula estéril y se desueró. Finalmente, se añadió sal (3 g/L), se depositó la cuajada en los moldes y se almacenó a 4 °C por 8 h (Figura 6). Los quesos elaborados para cada tratamiento fueron sometidos a evaluación sensorial.

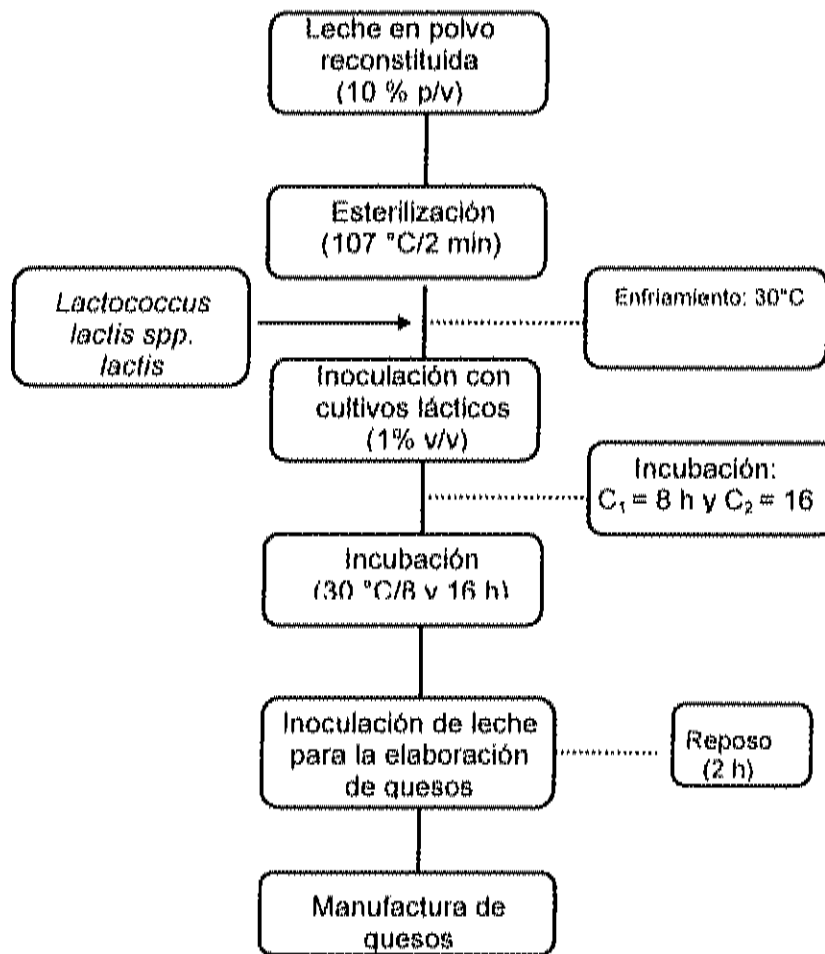


Figura 4. Esquema de activación de los cultivos iniciadores utilizados para la elaboración de queso Fresco (adaptado de Seifu *et al.*, 2003).

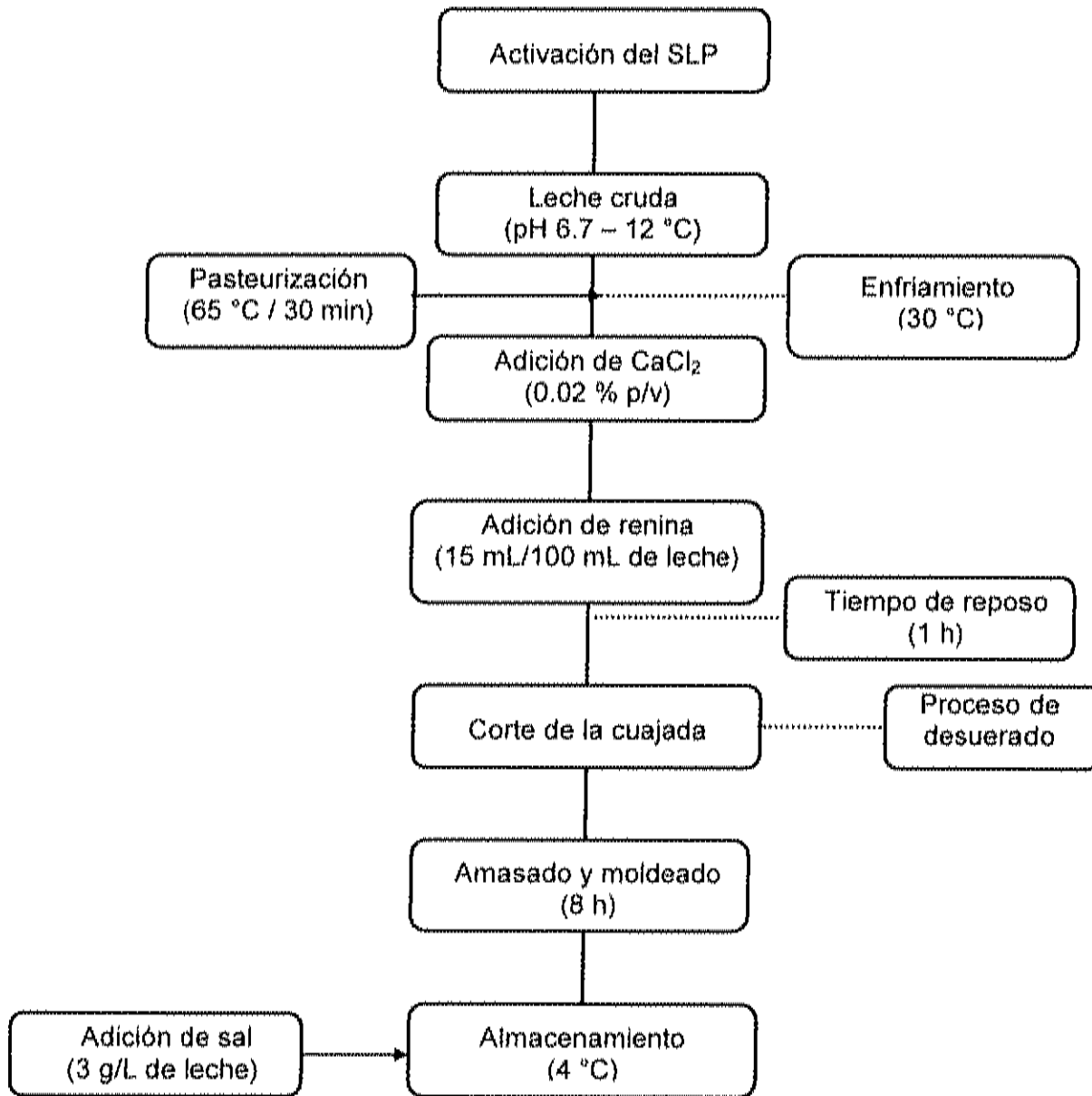


Figura 5. Esquema del proceso de manufactura de queso Fresco sin adición de cultivos lácticos (Torres-Llenez, 2002).

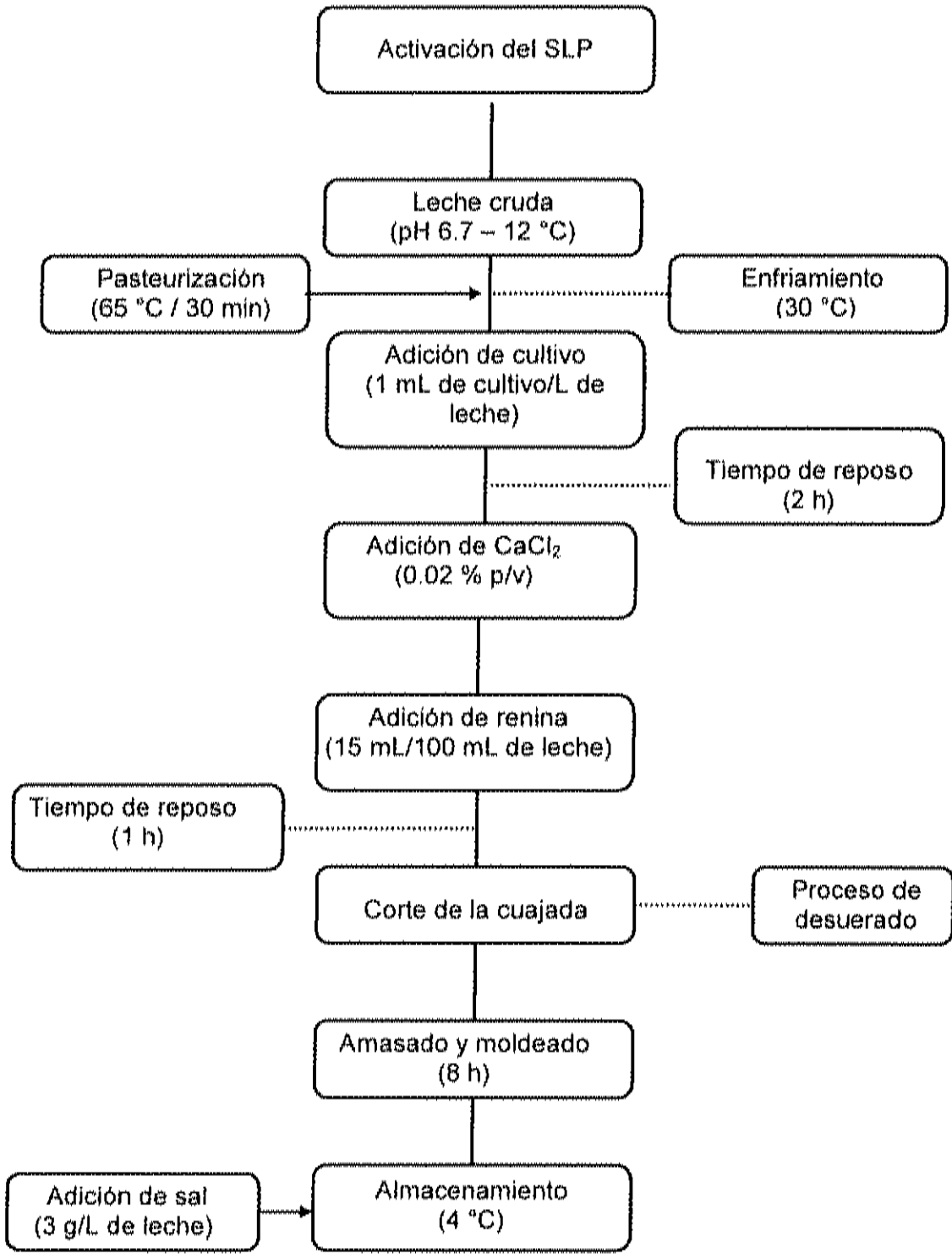


Figura 6. Esquema del proceso de manufactura de queso Fresco con adición de cultivos lácticos (Torres-Llanez, 2002).

Efecto del SLP Sobre los Cultivos Lácticos Iniciadores

Los cultivos iniciadores de *Lactococcus lactis spp. lactis* se activaron en leche en polvo estéril, reconstituida al 10% (p/v) y se incubaron a 30 °C durante 8 y 16 h. Se establecieron dos testigos de 250 mL cada uno, a los cuáles se les activó el SLP, previo al proceso de pasteurización (65 °C/30 min). Posteriormente, 1% (v/v) de cada cultivo se inoculó en leche para los diferentes tratamientos (Tabla 5). Los cultivos inoculados en leche y los testigos (leche sin inocular) se incubaron a 30 °C durante 8 h. El efecto del SLP se determinó mediante el número de unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹) y la producción de acidez, expresada como % de ácido láctico (v/v) en intervalos de 2 h durante un período de incubación de 8 h (Seifu *et al.*, 2003) (Figura 7). Para el análisis de datos se utilizó una prueba de Wilcoxon Mann Whitney con el paquete estadístico NCSS versión 2.0.

Tabla 5. Tratamientos experimentales para evaluar el efecto inhibitorio del SLP sobre los cultivos iniciadores (Seifu *et al.*, 2003).

Cultivo láctico Iniciador	Tratamientos Experimentales
C ₁	Testigo 1 (Leche pasteurizada sin activación del SLP)
C ₁	Tratamiento 1 (Leche pasteurizada con activación del SLP)
C ₂	Testigo 2 (Leche pasteurizada sin activación del SLP)
C ₂	Tratamiento 2 (Leche pasteurizada con activación del SLP)

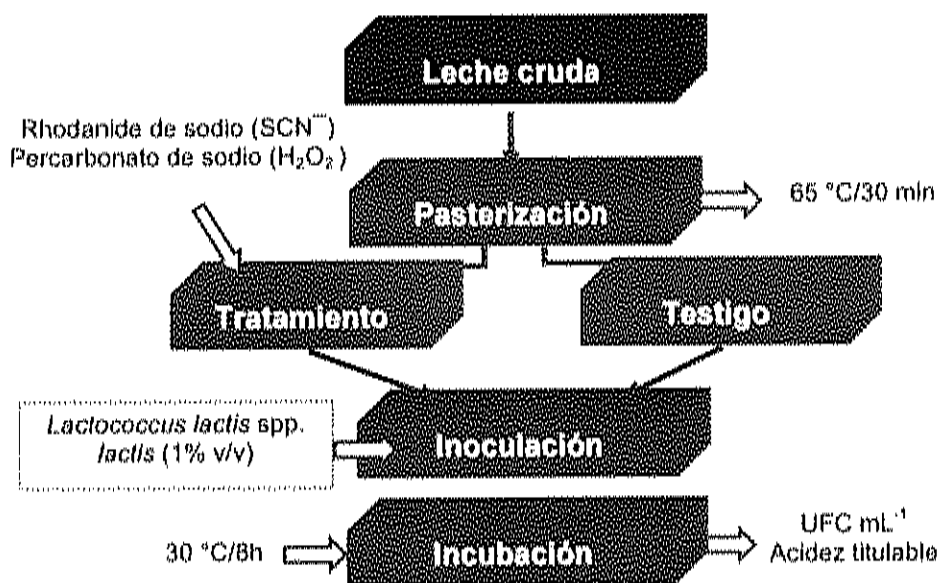


Figura 7. Esquema de evaluación del efecto inhibitorio del SLP sobre los cultivos iniciadores (Selfu *et al.*, 2003).

Análisis de la Composición Química y Parámetros Fisicoquímicos

El análisis de la composición química, tanto en leche como quesos, se realizó mediante determinaciones del porcentaje de grasa, proteína, humedad y sólidos totales. Se utilizó la metodología establecida por la AOAC (2000), los parámetros evaluados y su respectivo método fueron: grasa (933.05), proteína (991.2), humedad (948.12) y sólidos totales (por diferencia). Se realizaron análisis en leche cruda (testigo) y en leche tratada con el SLP (tratamiento). Además, se determinó la composición química en distintos lotes de leche recibidos durante 14 días consecutivos. Se realizó el mismo procedimiento en quesos de distintos lotes durante un período de 15 días. Para este caso, los monitoreos se realizaron en intervalos de 2 días. Por otra parte, se evaluaron los parámetros fisicoquímicos de acidez titulable y pH. Los métodos establecidos por la AOAC (2000) para cada uno de los casos

fueron: pH (981.12) y acidez titulable (947.05). El pH se midió utilizando un potenciómetro Orion-Modelo 710 (Orion Research Inc., USA).

Evaluación Sensorial y Vida de Anaquel

Selección y Entrenamiento de Jueces

Para el análisis sensorial y el estudio de la vida de anaquel de leche y queso Fresco, se seleccionó un panel de evaluación capaz de detectar diferencias en sabor, textura y apariencia general de leche y queso Fresco, comparadas con muestras de referencia. Para esto fue necesario realizar entrevistas formales a un grupo de personas y posteriormente realizar una selección preliminar de los jueces (Torres-Llanez, 2002).

Se entrevistó un total de 20 candidatos, de ambos sexos, todos miembros de la comunidad CIAD. La edad de los entrevistados fluctuó entre 22 y 35 años, siendo todos consumidores de queso Fresco, presentando buen estado de salud, y en algunos de los casos contaban de experiencia en evaluación sensorial; 80% de los panelistas tuvieron la posibilidad de participar en el estudio. La entrevista se realizó de manera individual, con el objetivo de poder establecer nexo con las personas, explicar la importancia del estudio, analizar su disponibilidad de tiempo y motivación por participar. Para obtener dicha información se diseñó un formulario (Anexo 1), donde se incluyeron los siguientes puntos:

- A. Datos generales (personales).
- B. Estado de salud (algún tipo de alergia o problema general).
- C. Hábitos alimenticios (tipo de alimentación, si fuma o no).
- D. Información adicional (interés por participar y disponibilidad de tiempo)



Anexo 1. *Cuestionario de preselección de panelistas*

Datos generales

Nombre: _____

Edad: _____

Género: M F

Fecha: _____
mes día año

Estado de salud

Por favor marque con una **X** si padece frecuentemente de algunas de las siguientes afecciones:

- | | | |
|--|-----------------------------|------------------------------|
| a) Gripe frecuente | Sí <input type="checkbox"/> | Noo <input type="checkbox"/> |
| b) Algún tipo de alergia (con efecto sobre las vías respiratorias) | Sí <input type="checkbox"/> | Noo <input type="checkbox"/> |
| c) Problemas de hipertensión | Sí <input type="checkbox"/> | Noo <input type="checkbox"/> |

NOTA: En caso de presentar algunos de estos síntomas durante el período de los entrenamientos y/o evaluaciones, por favor comunicar al líder del panel.

Hábitos alimenticios

- a) Mencione 4 tipos de alimentos que le disguste probar y/o comer:

- 1) _____ 3) _____
 2) _____ 4) _____

- b) ¿Se considera Ud. consumidor frecuente de comida rápida? Sí Noo
 c) ¿Ud. fuma? Sí Noo

d) ¿Indique de acuerdo a lo siguiente cómo considera Ud. que tiene habilidades para diferenciar grados de color, olor y sabor?

	Color	Olor	Sabor
Superior al promedio:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Promedio:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Por debajo del promedio:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Información adicional

a) Estaría dispuesto(a) a no fumar 30 minutos antes de una sesión de entrenamiento y/o evaluación, en caso de ser seleccionado como panelista?


Sí Noo

b) Estaría dispuesto(a) a participar en un panel sensorial para evaluar leche pasteurizada y queso fresco?

Sí Noo

c) Estaría dispuesto(a) a participar en las sesiones de evaluación que se realizarán durante los meses de febrero, abril y mayo?

Sí Noo

Muchas gracias, tenga un buen día. 

Con base en la información obtenida en la entrevista, se preseleccionaron 16 candidatos para ser sometidos a la selección final, mediante el uso de pruebas triangulares (Seifu *et al.*, 2004a). El principio de la prueba triangular consiste en proporcionar a los candidatos dos muestras iguales de un producto y una diferente, para distinguir su habilidad natural para discriminar. Se realizaron 13 sesiones sensoriales de 90 min/sesión y se consideró como criterio de selección un acierto del 85% en las respuestas de las pruebas triangulares aplicadas (Oporta-Tapia, 2007).

Participantes de ambos sexos fueron seleccionados, finalmente 11 participaron en la evaluación de leche y 8 en queso. Los jueces fueron entrenados para el caso de la leche, en detectar la aparición de malos sabores y clasificarla en buena y mala calidad. Para el caso del queso, los panelistas fueron entrenados en reconocer atributos típicos del queso de Fresco y distinguir la aparición de malos sabores. Para entrenar a los jueces, en parámetros de textura, gustos básicos y notas típicas de quesos. Se utilizó queso Regional, Panela, Feta, Cottage, Gouda, Mozzarella y Crema, con el objetivo de distinguir atributos de menor o mayor intensidad para cada tipo de queso y compararlo con un queso Fresco; habilidad que posteriormente utilizarían al momento de evaluar la vida de anaquel de un queso Fresco comparado con una referencia (Clark *et al.*, 2001).

Análisis e Interpretación de Resultados

El análisis sensorial de los quesos Frescos elaborados por cada tratamiento propuesto, se realizó mediante pruebas de diferenciación múltiple. El principio de esta prueba se basa en el grado de intensidad de un atributo de la muestra, seleccionado con base en una escala definida (Anexos 2 y 3). Los jueces reciben un juego t de muestras, codificados aleatoriamente con códigos compuestos por tres números. En la escala se le pregunta el grado de similitud (textura y sabor con el queso Fresco) para cada muestra, utilizando escalas específicas (Meilgaard *et al.*, 1999).

Anexo 2. Prueba de Comparación Múltiple (Textura).

Nombre: _____ Fecha: _____

Tipo de muestra: Queso Fresco Regional

Característica estudiada: Textura típica del queso Fresco

Instrucciones:

Pruebe las muestras (NO COMER) de izquierda a derecha y note la intensidad de la característica en estudio. Califique cada muestra de queso Fresco de acuerdo a la siguiente escala:

- | | |
|--------|---|
| 0
1 | Textura diferente al queso Fresco |
| 2
3 | Textura ligeramente similar al queso Fresco |
| 4
5 | Textura similar al queso Fresco |
| 6
7 | Textura muy similar al queso Fresco |
| 8
9 | Textura igual al queso Fresco |

Código de la muestra: _____

Escala: _____

Comentarios: _____

Gracias.

Anexo 3. Prueba de Comparación Múltiple (Sabor).

Nombre: _____ Fecha: _____

Tipo de muestra: Queso Fresco Regional

Característica estudiada: Sabor típico de queso Fresco

Instrucciones:

Pruebe las muestras de izquierda a derecha y note la intensidad de la característica en estudio. Califique cada muestra de queso Fresco de acuerdo a la siguiente escala:

0
1

No sabe a queso Fresco

2
3

Sabe ligeramente al queso Fresco

4
5

Sabe similar al queso Fresco

6
7

Sabe muy similar al queso Fresco

8
9

Sabe igual que el queso Fresco

Código de la muestra: _____

Escala: _____

Comentarios: _____

Gracias.

Para que la prueba tenga significancia estadística se requiere de un panel conformado por 8 jueces, en este estudio se trabajó con 8 jueces entrenados. Cada prueba se realizó por duplicado y los resultados se analizaron mediante análisis de varianza y comparación de medias por la prueba Tukey-Kramer, utilizando el paquete estadístico NCSS versión 6.0.

Vida de Anaquel

La vida de anaquel de leche y queso Fresco se determinó mediante la utilización de una escala no estructurada de 10 puntos. El extremo izquierdo de la escala con valor 0 representó una leche o queso Fresco de "mala calidad". Por otra parte, el extremo derecho de la escala con valor de 10, representó una leche o queso Fresco de "buena calidad" (Anexo 4). Los jueces recibieron un juego *t* de muestras, codificados aleatoriamente con códigos compuestos por tres números. Las pruebas se realizaron en intervalos de 4 días a partir del día primero y en días seguidos, después de una semana. Se consideró como muestras del primer día de evaluación, los quesos que tenían 24 horas de prensado refrigerados a 4 °C, posterior a su manufactura. Se consideró como fin de la vida de anaquel, el día en que el 50% más uno de los panelistas evaluaban la muestra con una nota menor a 5 en la escala establecida. Cada prueba se realizó por duplicado y los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de una vía; considerados como diferencias significativas los valores donde $P < 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico NCSS versión 6.0.

Anexo 4. Vida de Anaquel de Queso Fresco.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, CIAD A.C. Departamento de Tecnología de Alimentos de Origen Animal, DTAOA. Laboratorio de Calidad y Autenticidad	
Instrucciones: Pruebe cada una de las muestras codificadas que se le presentarán a continuación y determine la intensidad de la característica en estudio. Para la calificación de cada atributo utilice la escala propuesta.	
Evaluador: _____	Fecha : _____
Tipo de muestra: QUESO FRESCO.	Evaluación: Escala de 0 a 10, siendo 0 mala calidad y 10 buena calidad.
Calidad, código: _____	
Calidad, código: _____	
Calidad, código: _____	

Gracias 🌟

Determinación del Rendimiento de la Cuajada

El rendimiento de la cuajada de los tratamientos propuestos se determinó siguiendo la metodología de Bönish *et al.* (2007). Posterior a la coagulación de la leche, se procedió a centrifugar a 3000 g a 20 °C por 15 minutos, utilizando una centrífuga Beckman-Moledo JA -21 con rotor JA-20 (Beckman Coulter, USA). El suero separado de la cuajada en el proceso de centrifugado, se decantó y el sedimento se pesó gravimétricamente. El rendimiento, determinado en porcentaje, se calculó como el peso de la cuajada después de la centrifugación en relación al peso inicial de la leche, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso de la cuajada}}{\text{Peso de la leche}} \times 100$$

Diseño y Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó un diseño en bloques completamente al azar, de modelo estadístico: $Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + E_{ij}$.

En el experimento se utilizó como criterio de bloqueo los lotes de leche recibidos por día, con el objetivo de evitar el efecto por variación natural propia de la leche analizada por lote. Se recolectaron dos lotes diferentes de leche y cada parámetro fue evaluado por duplicado.

Las variables independientes fueron los tratamientos experimentales:

Testigo: Leche (sin activación del SLP).

Tratamiento: Leche (con activación del SLP).

Las variables dependientes fueron la composición (grasa, proteína, humedad y rendimiento), los parámetros fisicoquímicos (pH y acidez titulable) y las

cuentas microbiológicas (mesófilos aerobios, coliformes totales, hongos y levaduras).

Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 5% ($P < 0.05$); en los casos donde existieron diferencias significativas entre la media de los tratamientos y la media del testigo, se realizó una comparación por medio de contrastes ortogonales (Prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer). El análisis general se ejecutó mediante el programa o paquete estadístico con licencia actualizada, NCSS (Number Cruncher Statistical System) versión 6.0 (2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características del Centro de Acopio

La caracterización del centro de acopio se realizó mediante visitas consecutivas durante dos meses. Primeramente, se estableció un acercamiento con los productores y los supervisores de las instalaciones, desde la realización de los muestreos de leche, hasta su entrega. El objetivo de esta etapa fue identificar posibles factores que alteran la calidad de la leche, así como el mantenimiento de las condiciones higiénicas en los establos de producción. El centro de acopio dispone de 3 tanques con capacidad de almacenamiento de 15,000 litros cada uno. Uno de los tanques cuenta con sistema de refrigeración para mantener la leche en caso que existiesen problemas al momento del envío. El personal del centro está formado por 2 miembros, un laboratorista y un asistente, responsables de realizar el muestreo de la leche y los análisis respectivos, al momento de la recepción. La información general del número de productores, tipo de análisis y límites de aceptación o rechazo de lotes de leche al momento posterior a los análisis de plataforma, se presentan en la Tabla 6. Además, en la Figura 8 se muestra un esquema de las instalaciones.

Cada país tiene normativas, donde se establecen límites permitidos desde el punto de vista de denominaciones, especificaciones sanitarias y de composición. En México, dichas normas fueron elaboradas, aprobadas y publicadas como proyectos de normas mexicanas, bajo la responsabilidad del organismo de normalización "Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados, A.C." La norma NMX-F-720-COFOCALEC-2006 es específica para el transporte de leche cruda, desde las explotaciones lecheras hasta las plantas procesadoras, así como el manejo de la

recepción, filtración, enfriamiento y almacenamiento de la misma, en los centros de acopio.

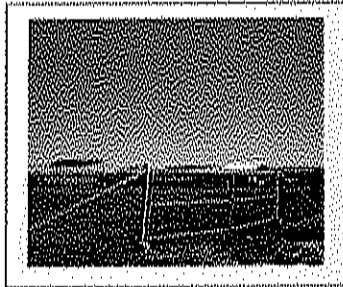
Tabla 6. Generalidades del centro de acopio y parámetros analizados en leche al momento de la recepción.

a) Centro de acopio.

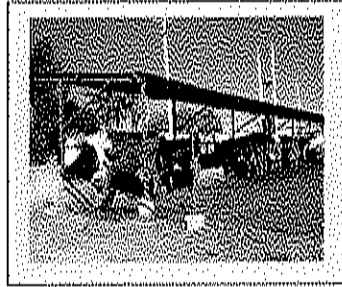
Parámetro	Especificación
Número de productores	11
Promedio de litros de leche/productor	2000
Tipo de transporte	Sin refrigeración
Tanques de almacenamiento	3 (15.000 L/cada uno)
Sistema de envío de leche	Rastra (23.000 L/día)
Distancia de entrega	4 h

b) Leche.

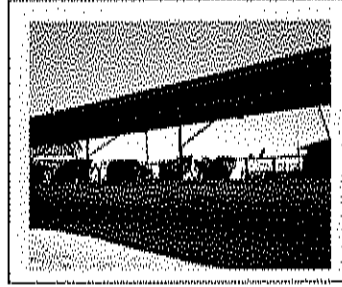
Análisis de leche	Límite permitido
Densidad a 15°C	1.029 g/mL
Crioscopia	menos 0.510 (menos 0.530) y menos 0.536 (menos 0.560)
Células somáticas	480.000 CCS/mL
Alcohol	Negativo
Resazurina	Buena
Antibióticos	Negativo



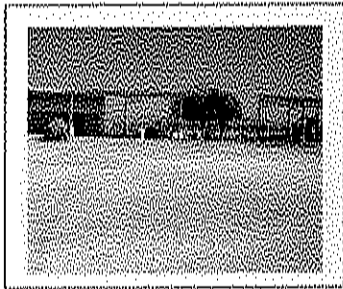
Finca de producción lechera.



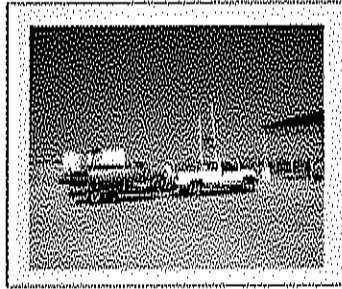
Sistema de manejo de animales.



Animales raza Holstein.



Vista frontal de las instalaciones.



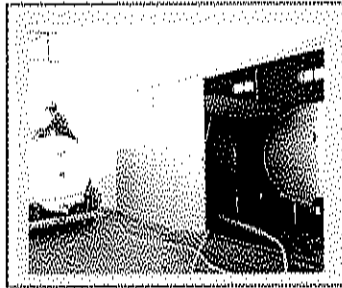
Sistema de entrega de leche.



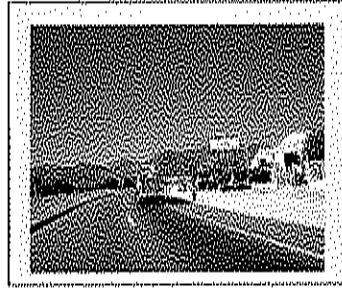
Muestreo de leche al momento de recibo.



Laboratorio de análisis de leche.



Tanques de almacenamiento.



Momento de envío de leche a planta industrial.

Figura 8. Esquema de las instalaciones del centro de acopio y establos de producción lechera.

Evaluación de la Calidad de Leche Cruda con Respecto a Monitoreos de Células Somáticas, Mesófilos Aerobios y Coliformes Totales

Las cuentas de células somáticas y mesófilos aerobios en mezcla de leche cruda monitoreada durante 14 días consecutivos se muestran en la Figura 9. Los conteos de células somáticas llevadas a cabo por medio de la Prueba de Wisconsin (WMT), fluctuaron en el rango de 240,000 y 430,000 CCS/mL. Las cuentas de este estudio fueron menores a las publicadas por Murphy (2007), donde se evaluó el contenido de células somáticas en fincas estadounidenses, y cuyos resultados mostraron una variación entre 300,000 y 700,000 CCS/mL. Las diferencias en las cuentas pueden atribuirse a la presencia de vacas con mastitis en los sistemas de producción.

Por otra parte, estos resultados indican que la leche se encuentra dentro de los límites de aceptación, en donde valores resultantes dentro del rango de 6 - 11, representan una pérdida de producción equivalente a 8 y 9% de litros de leche por establo. De tal manera, que si un animal de primera lactancia produce una leche con conteos alrededor de 200,000 – 500,000 CCS/mL, se generarían pérdidas de 375 L en la producción; lo que a un precio actual de \$4.05 por litro implica una disminución de los ingresos por animal de \$1,518.75 (Hazard, 1997; Martínez *et al.*, 2006).

Los niveles de crecimiento de microorganismos de mesófilos aerobios presentaron una media de 5.32 unidades logarítmicas, con una variación que osciló entre 4.22 y 6.17 log UFC mL⁻¹; mientras que los niveles de coliformes totales fueron 4.42 unidades logarítmicas, con una variación que osciló entre 3.16 y 5.90 log UCF mL⁻¹ (Figura 13); para el caso de mesófilos aerobios fueron mayores a los publicados por Murphy (2007), quien reportó valores de 3.69 y 4.51 log UFC mL⁻¹.

En general, las altas cuentas de mesófilos aerobios en relación con lo reportado en la literatura para la buena calidad sanitaria, indicaron que la

calidad microbiológica de la leche utilizada en este estudio podría ser mejorada. Se ha reportado que leche con cuentas $\geq 1,000$ UFC mL⁻¹ provienen de establos bajo un mal sistema de producción, cuentas elevadas en la leche se deben a una deficiente sanitización de equipos (ordeño, recolección y transporte) y/o presencia de vacas mastíticas (Murphy, 2007).

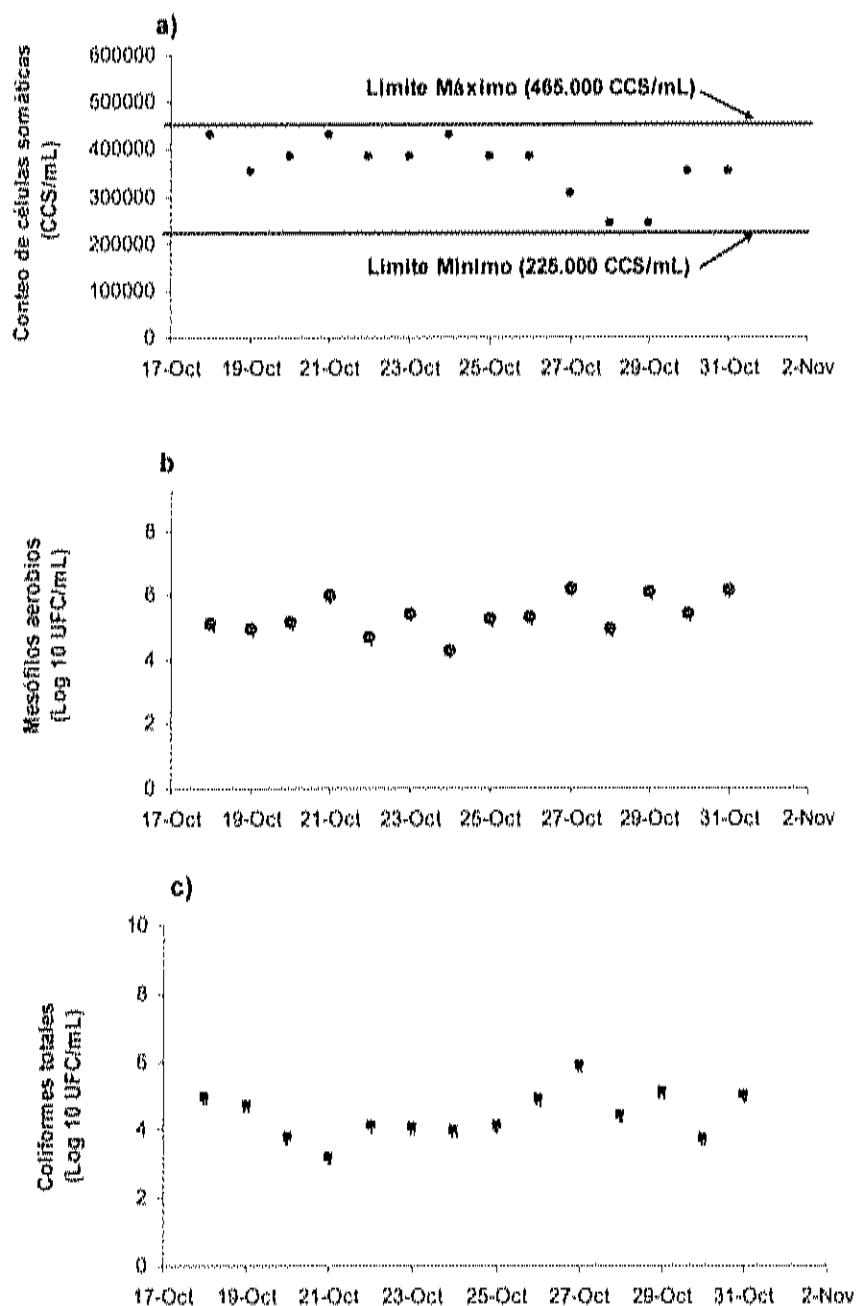


Figura 9. Conteo de células somáticas (a), microorganismos de mesófilos aerobios (b) y microorganismos de coliformes totales (c) durante un período de 14 días consecutivos.

Efecto del SLP sobre el Crecimiento de Mesófilos Aerobios en Leche Cruda
Almacenada a 4 °C y 35 °C

Las cuentas de microorganismos de mesófilos aerobios en leche cruda almacenada a 4 °C y 35 °C se muestran en la Figura 10. Los conteos estándares en placa y en petrifilm en leche tratada con SLP (Leche cruda + SLP) y testigo (Leche cruda), fueron similares ($P \geq 0.05$) durante la fase de activación del SLP (Figura 10c). Sin embargo, el conteo microbiológico en ambos tratamientos presentó una tendencia creciente a partir de la hora 3, cuando el almacenamiento fue a 4 °C, y a la hora 5, cuando fue a 35 °C. En general, los tratamientos fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) en todos los tiempos de evaluación posterior a la fase de activación del SLP (5, 10 y 15 h) (Figura 11a y 11b)

La ausencia de diferencias significativas durante la fase de activación del SLP (0 - 3 h) (Figura 11c), se puede atribuir a una etapa de equilibrio entre la generación de los compuestos intermedarios y la reacción de respuesta en los microorganismos. Por ende, los productos de oxidación de iones tiocianato catalizados por la enzima lactoperoxidasa, podrían ser explotados como una alternativa de conservación de la leche cruda (Björck *et al.*, 1975).

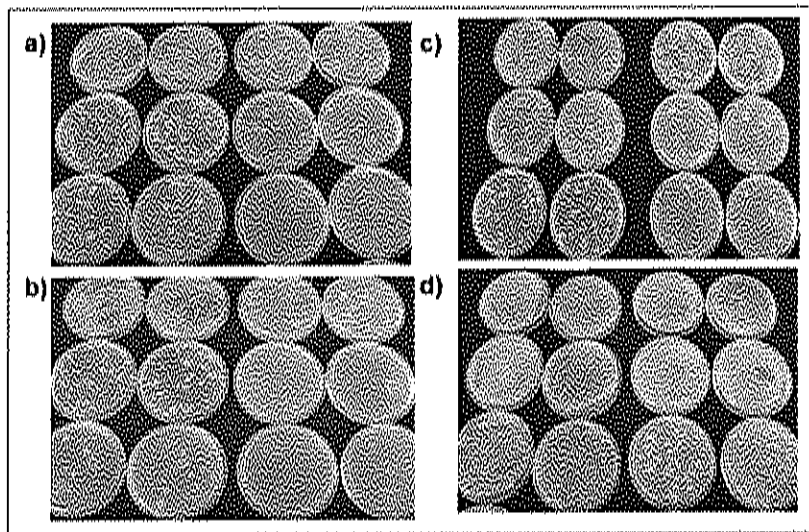


Figura 10. Crecimiento de microorganismos de mesófilos aerobios en leche testigo (leche cruda) y leche tratada con SLP almacenada durante 15 h a 4 °C (a, b) y 35 °C (c, d).

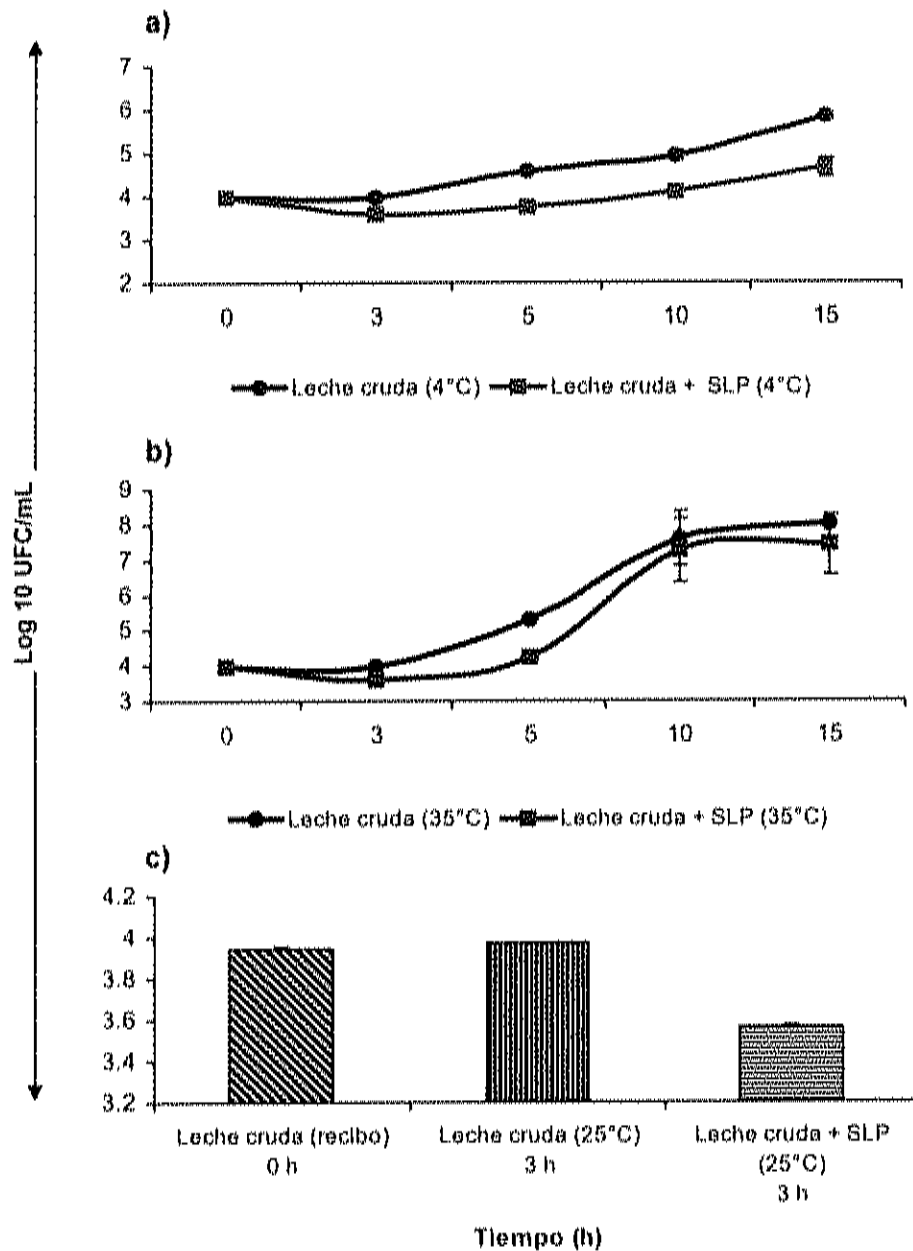


Figura 11. Monitoreo del crecimiento de mesófilos aerobios en leche tratada con SLP y leche testigo (leche cruda) almacenada durante 15 h a 4 °C (a) y a 35 °C (b). Efecto del SLP en el crecimiento de microorganismos de mesófilos aerobios durante la fase de activación a 25 °C por 3 h (c).

El SLP ha sido ampliamente estudiado en algunos países europeos y africanos, pero con énfasis en leche caprina debido a las preferencias de consumo en esos lugares. Los resultados reportados entre especie caprina y bovina son similares en comparación con otras especies, por lo que se tomarán como referencia para éste estudio. Zapico (1993) evaluó la aplicación del SLP para mejorar la calidad microbiológica de la leche de cabra. Este reportó como nivel promedio de microorganismos totales viables 5.61 unidades logarítmicas. En este estudio el conteo de microorganismos totales fue de 3.94 log UFC mL⁻¹. La diferencia de 1.67 log UFC mL⁻¹, podría atribuirse a una variación de la calidad microbiológica inicial de la leche utilizada en los estudios, más que a posibles variaciones genéticas entre la especie evaluada.

Las cuentas totales de mesófilos aerobios en leche tratada con el SLP y almacenada a 35 °C, fueron 4.20, 7.25 y 7.40 log UCF mL⁻¹ a las 5, 10 y 15 h, respectivamente. Mientras que para la leche control fueron 5.26, 7.58 y 8 log UCF mL⁻¹ (Figura 11b). El rápido crecimiento de estos microorganismos es debido a que la temperatura óptima para su desarrollo fluctúa entre 30 y 40 °C (FAO, 2005). Además, se observó que a partir de la hora 10, el desarrollo de los microorganismos empezó a decaer; posiblemente debido a que el efecto del SLP es enmascarado por una generación de acidez en el medio. La acidificación inició a partir de la hora 9, lo que coincide con Ponce *et al.* (2005) quienes reportaron, un tiempo de duración de la leche, en el rango 4 - 7 h, a temperaturas de 30 – 35 °C. Para el análisis de los datos se consideró como bloques a cada lote de leche utilizado para los ensayos; se encontró que el factor bloqueo fue significativo debido a la variación entre cada lote de leche. Por lo que, para este tipo de estudio es necesario considerar el bloqueo dentro del diseño experimental.

Efecto del SLP sobre el Crecimiento de Coliformes Totales en Leche Cruda Almacenada a 4 °C y 35 °C

Las cuentas de microorganismos de coliformes totales en leche cruda almacenada a 4 °C se ilustra en la Figura 12. Las cuentas en placa y en petrifilm en leche tratada con SLP (Leche cruda + SLP) y testigo (Leche cruda) fueron similares ($P \geq 0.05$) durante la fase de activación del sistema (Figura 13c). Las cuentas iniciales de coliformes totales en leche cruda al momento de la recepción (hora 0) fue de $3.10 \log \text{UCF mL}^{-1}$ y al final de la fase de activación del sistema (hora 3) fue de $4.49 \log \text{UCF mL}^{-1}$.

Por otro lado, a 4 °C ambas, la leche tratada con SLP y el testigo, presentaron un ligero crecimiento entre la hora 3 y 5 de evaluación. El crecimiento más acelerado de coliformes totales se observaron en la fase siguiente (5 - 10 h), pero fue a partir de la hora 10 donde observaron cambios significativos en el crecimiento (Figura 13a).

Por otro lado, en la Figura 13b se observa que a 35 °C la leche tratada con SLP y el testigo, presentaron un crecimiento similar a partir de la hora 3 hasta coincidir en un punto de igual desarrollo a la hora 10. Se observó una disminución en el desarrollo de los microorganismos en el caso de leche tratada con SLP. No ocurrió lo mismo en el testigo donde el crecimiento de los microorganismos fue constante.

Las cuentas de microorganismos de coliformes totales en leche tratada con SLP almacenada a 4 °C fueron 3.93 , 4.94 y $2.94 \log \text{UCF mL}^{-1}$ a las 5, 10 y 15 h, respectivamente; mientras que para el testigo fueron 4.52 , 5.81 y $4.62 \log \text{UCF mL}^{-1}$ a las mismas horas ($P < 0.05$) (Figura 12a). Las cuentas promedio de coliformes totales al momento de recibo de la leche (hora 0) en este estudio fue $3.10 \log \text{UFC mL}^{-1}$, dicho valor es muy similar a lo reportado por Zapico (1993) de $2.80 \log \text{UFC mL}^{-1}$. Este mismo autor, considera la evaluación de coliformes totales como el mejor indicador de contaminación.

Las principales fuentes de contaminación en leche cruda se atribuyen a animales enfermos, como vacas mastíticas. También, se debe al mal manejo en la producción, es decir equipos y animales sucios, aunado a un sistema de refrigeración deficiente durante el transporte de la leche (Boor *et al.*, 1998).

Las cuentas de microorganismos de coliformes totales en leche tratada con el SLP almacenada a 35 °C fueron 6.61, 7.96 y 6.73 log UCF mL⁻¹ a las 5, 10 y 15 h, respectivamente; mientras que en el testigo fueron 7.59, 8.0 y 7.93 log UCF mL⁻¹. Algunos informes sobre la capacidad de preservación de leche cruda mediante el SLP indican un tiempo de 6 – 10 h a temperaturas de 30 °C y de 8 – 12 h a temperaturas ambientales fluctuantes entre 25 – 32 °C (Ponce *et al.*, 2005). En este estudio, la leche tratada con el SLP presentó acidificación a la hora 9, mientras que el testigo inició el mismo proceso a la hora 6. En general, los tratamientos fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) a ambas temperaturas, durante los tiempos evaluados (5, 10 y 15 h) (Figura 13a y 13b).

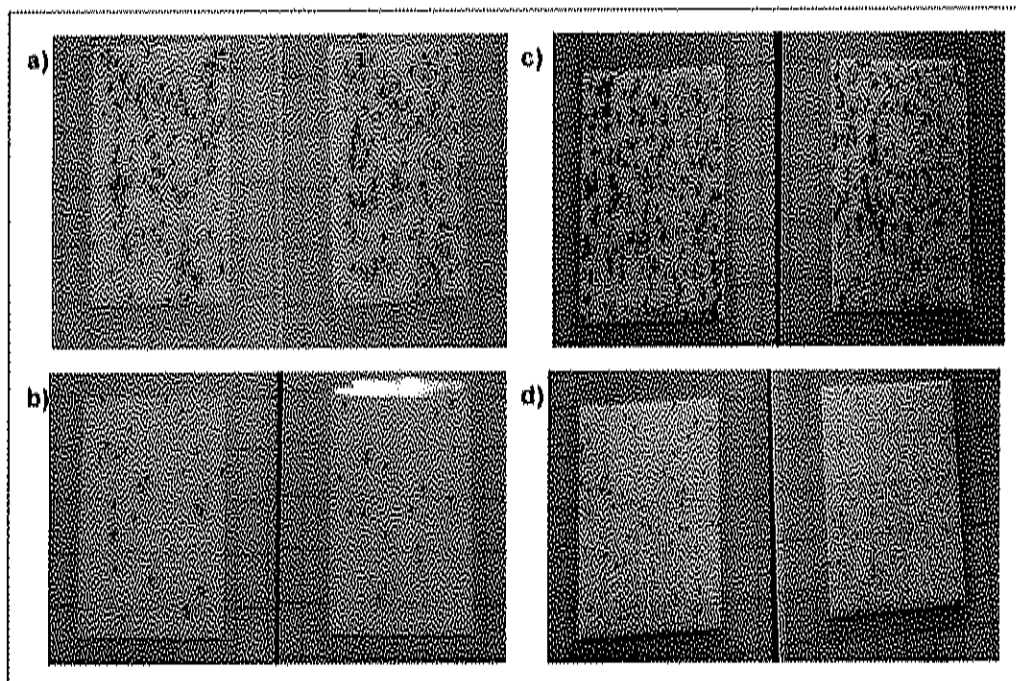


Figura 12. Crecimiento de microorganismos de coliformes totales en leche testigo (leche cruda) y leche tratada con SLP almacenada durante 15 h a 4 °C (a, b) y 35 °C (c, d).

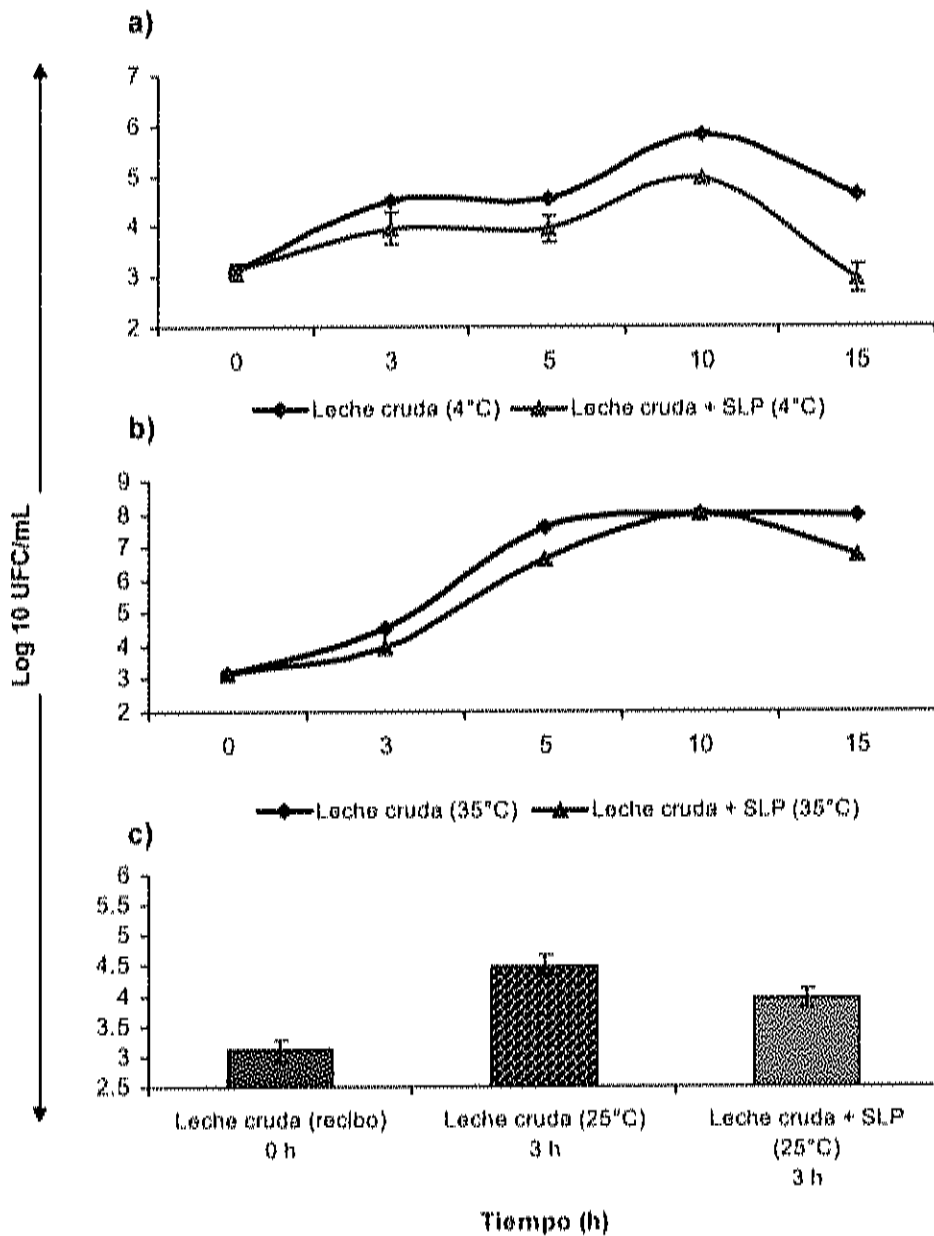


Figura 13. Monitoreo del crecimiento de microorganismos de coliformes totales en leche tratada con SLP y leche testigo (leche cruda) almacenada durante 15 h bajo refrigeración a 4 °C (a) y 35 °C (b). Efecto del SLP en el crecimiento de microorganismos de coliformes totales durante la fase de activación a 25 °C durante 3 h (c).

Efecto del SLP en la Composición Química y Parámetros Físicoquímicos
de la Leche Cruda

La composición de la leche bovina tiene valores medios de pH de 6.72, acidez titulable de 1.64 g/L, grasa de 3.60%, proteína de 2.86% y humedad de 87.75% (Tabla 7). Los contenidos de proteína, humedad y grasa en este estudio coinciden con lo reportado por Villegas de Gante (2004), donde el contenido de humedad fluctuó entre 87 - 88%, de proteína 2.8 - 3.5% y de grasa de 3.0 - 3.5%. Igualmente, los resultados de este estudio son similares con otros, donde se caracterizó la composición química de leche bovina en Estados Unidos a cargo de Chase (2000) en la Universidad de Cornell; reportándose para grasa 3.67% y para el contenido proteico un valor de 3.13%. La activación del SLP no afectó la composición química ni los parámetros físicoquímicos de la leche.

Tabla 7. Análisis composicional de leche tratada con SLP y leche cruda (testigo).

Parámetro*	Tratamientos	Valores \pm DE
pH	LC	6.73 \pm 0.02
	LC + SLP	6.69 \pm 0.00
Acidez (%)	LC	1.64 \pm 0.03
	LC + SLP	1.60 \pm 0.01
Grasa (%)	LC	3.60 \pm 0.08
	LC + SLP	3.65 \pm 0.10
Proteína (%)	LC	2.86 \pm 0.05
	LC + SLP	3.00 \pm 0.13
Humedad (%)	LC	87.75 \pm 0.49
	LC + SLP	88.63 \pm 2.14

* No existieron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre los parámetros evaluados en el tratamiento (leche cruda tratada con SLP) y testigo (leche cruda).

LC = Leche cruda (testigo).

LC + SLP = Leche cruda tratada con SLP.

Por otra parte, los valores de acidez titulable y pH en el testigo se encuentran dentro de los rangos normales de 1.29 – 1.32 g/L de ácido láctico y 6.5 – 6.7, respectivamente. La diferencia entre los valores de acidez titulable de este estudio en contraste con investigaciones previas (Osorio, 2005; Villegas de Gante, 2004), podría deberse a la alimentación. Lo anterior de manera indirecta refleja la riqueza de la leche cruda en sólidos no grasos. Así, es posible encontrar leches frescas de elevada acidez natural, sin que exista aún desarrollo de ácido láctico por vía microbiana a partir de la lactosa (Villegas de Gante, 2004).

Finalmente, la composición química de la leche monitoreada durante 14 días consecutivos se presenta en la Figura 14. Las fluctuaciones de los valores de los parámetros de grasa y proteína, se atribuye a la variación natural propia entre cada lote analizado. Sin embargo, no se registraron variaciones entre los valores de pH y acidez titulable en los mismos lotes. En general, la leche es un fluido de extrema variabilidad, de tal manera que es posible que no existan dos lotes de leche con la misma composición y estructura; aún tratándose de los mismos animales, por ejemplo la leche producida en la ordeña matutina es diferente a la producida en la vespertina (Villegas de Gante, 2004).

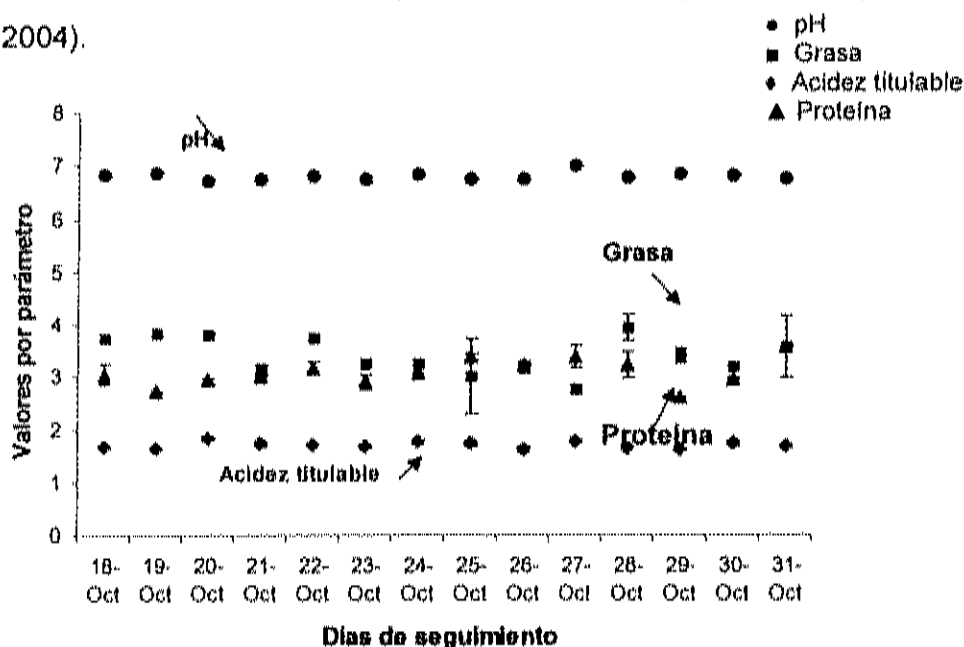


Figura 14. Comportamiento de la composición química vs. parámetro químico y físico-químico de leche monitoreada durante 14 días consecutivos.

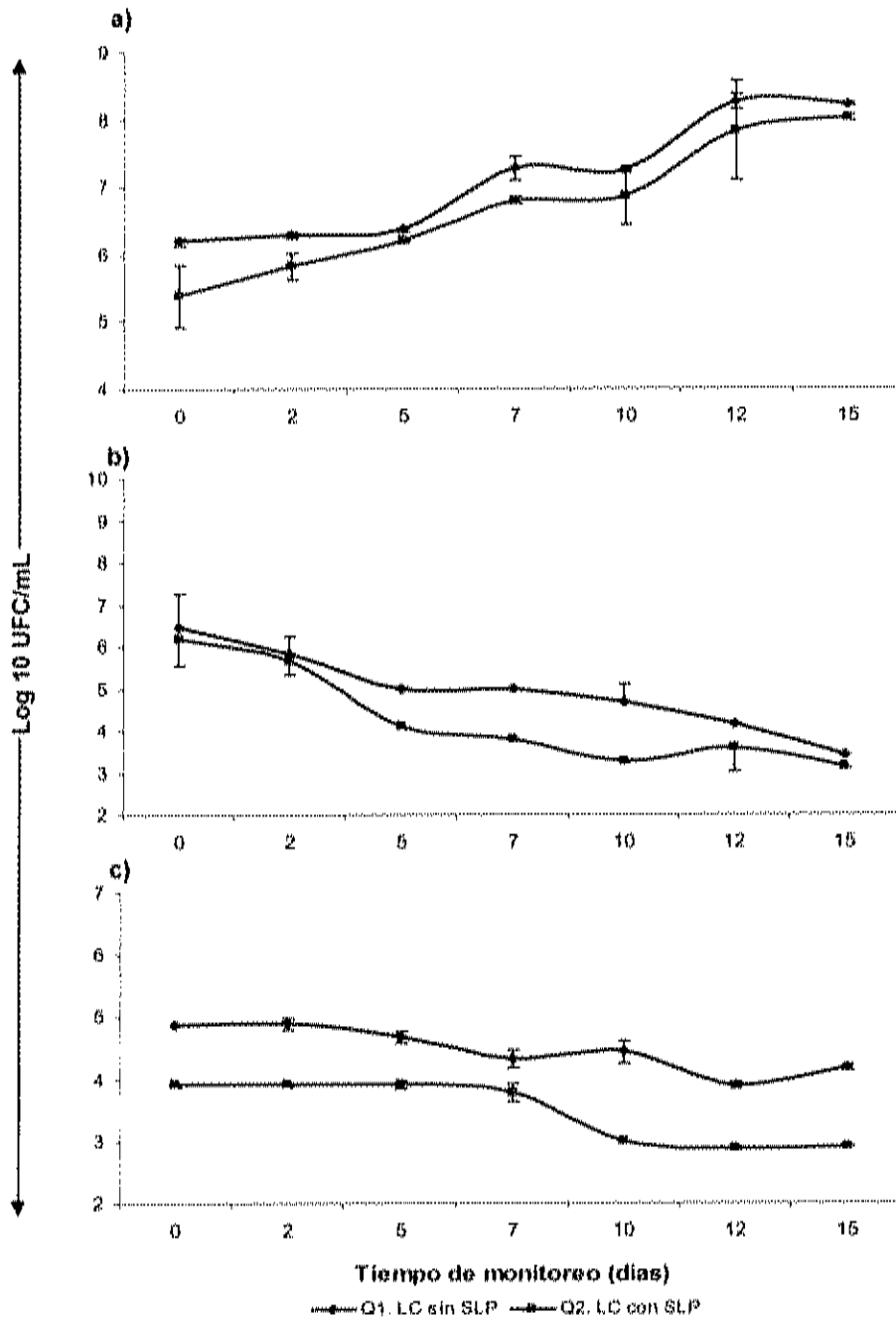


Figura 15. Crecimiento de microorganismos de mesófilos aerobios (a), coliformes totales (b) y hongos y levaduras (c) en quesos elaborados con leche cruda tratada con SLP y leche testigo (leche cruda) almacenados durante 15 días.

Evaluación de la Calidad Microbiológica, Rendimiento, Composición Química y Parámetros Fisicoquímicos del Queso Fresco

Calidad Microbiológica

El comportamiento de la población microbiana para los seis tratamientos en queso Fresco, monitoreados durante 15 días de almacenamiento se ilustran en las Figuras 15-17. La leche utilizada en la elaboración de los dos lotes para cada uno de los quesos procesados, presentó en la cuenta total de microorganismos un promedio de $3.94 \log \text{ UFC mL}^{-1}$. En un estudio realizado por Torres-Llenez (2002), se reportó para la cuenta total un valor de $6.17 \log \text{ UFC mL}^{-1}$, en un establo del mismo sector en donde se llevó a cabo esta investigación. Las variaciones de conteos microbianos en distintos establos se atribuye a sus diferencias propias en los sistemas de manejo. Aunque existen otros factores como la higiene de las instalaciones, la higiene de los animales y el manejo integral del ordeño, que también afectan directamente a la calidad de la leche (Ruegg, 2004). En general, las cuentas logarítmicas altas de microorganismos como mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales, hongos y levaduras, son considerados como los principales indicadores de la pobre higiene en los establos de producción.

Los conteos de los grupos microbianos investigados tuvieron en promedio 2.63 unidades logarítmicas más altas al día 15 que las registradas al inicio, para cuenta total, de 1.28 unidades logarítmicas en coliformes totales y 0.65 unidades logarítmicas en hongos y levaduras (Figura 18). El menor incremento durante los monitoreos se observó en hongos y levaduras (0.65 unidades logarítmicas); lo que podría indicar que este grupo de microorganismos no experimentaron su máximo desarrollo, ni fueron influyentes en el deterioro de la calidad microbiológica de los quesos en estudio.

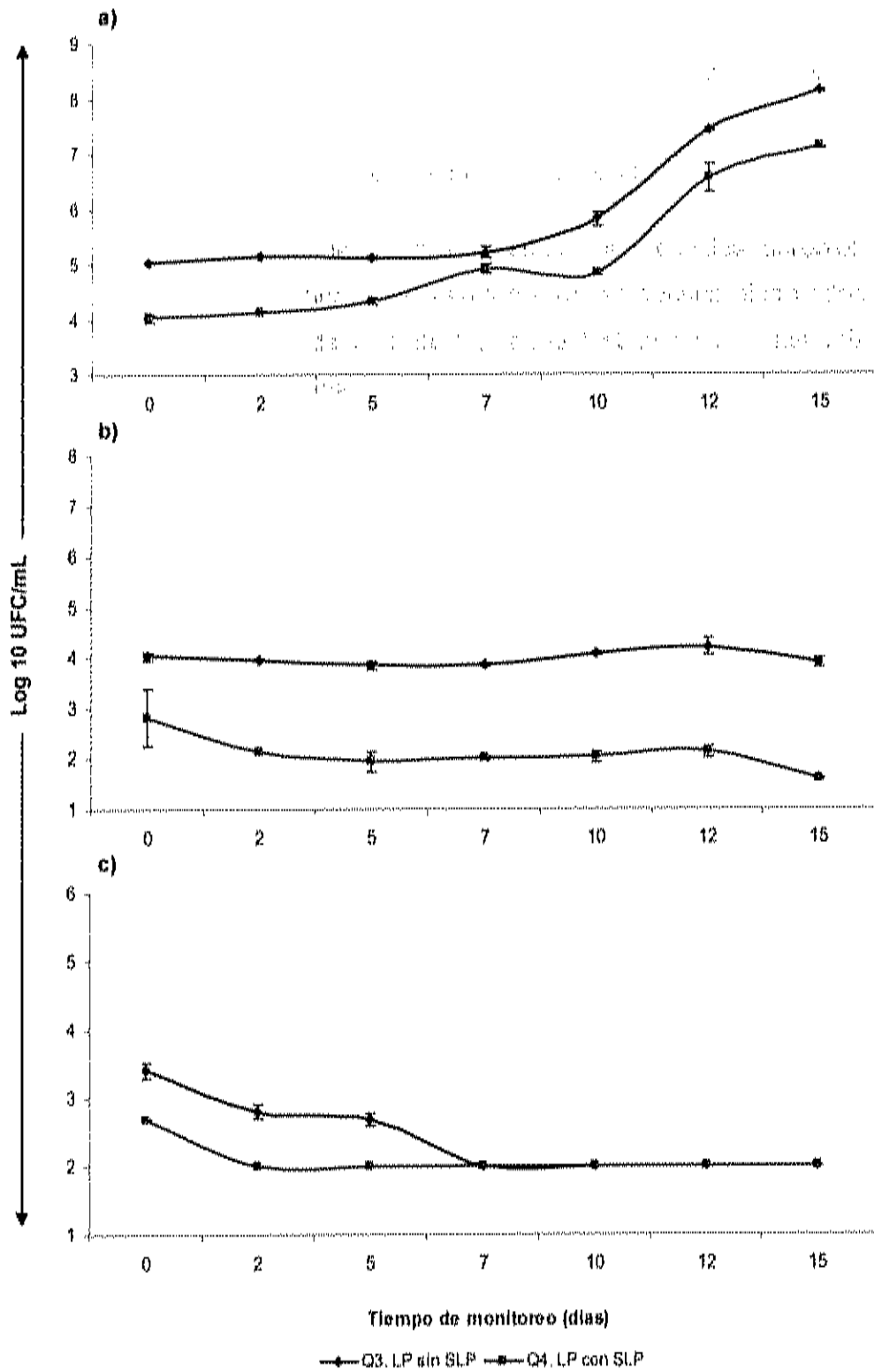


Figura 16. Crecimiento de microorganismos de mesófilos aerobios (a), coliformes totales (b) y hongos y levaduras (c) en quesos elaborados con leche pasteurizada tratada con SLP y leche testigo (leche pasteurizada) almacenados durante 15 días.

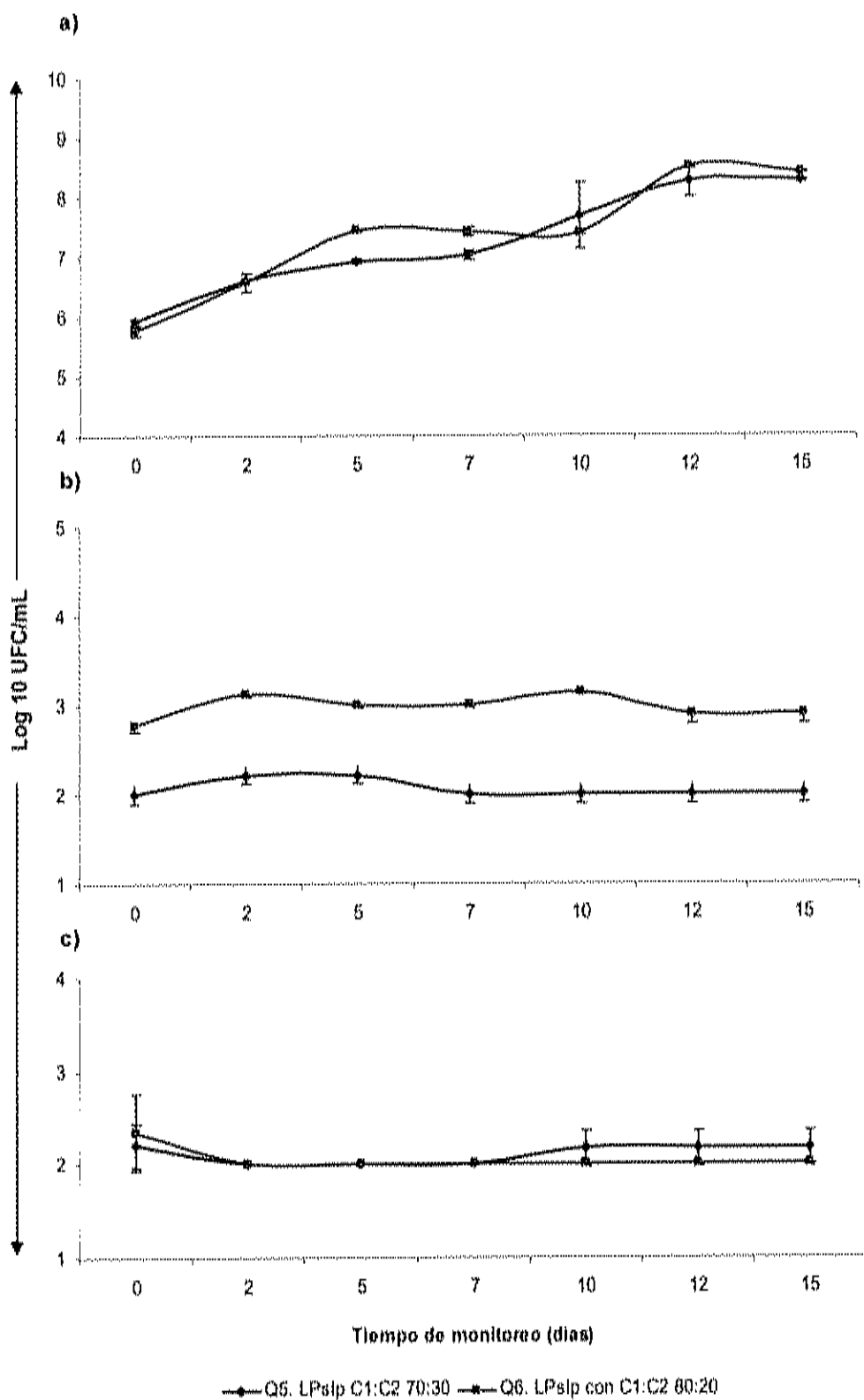


Figura 17. Crecimiento de microorganismos de mesófilos aerobios (a), coliformes totales (b) y hongos y levaduras (c), en quesos elaborados con leche pasteurizada tratada con SLP y cultivos iniciadores de *Lactococcus lactis* spp. *lactis*.

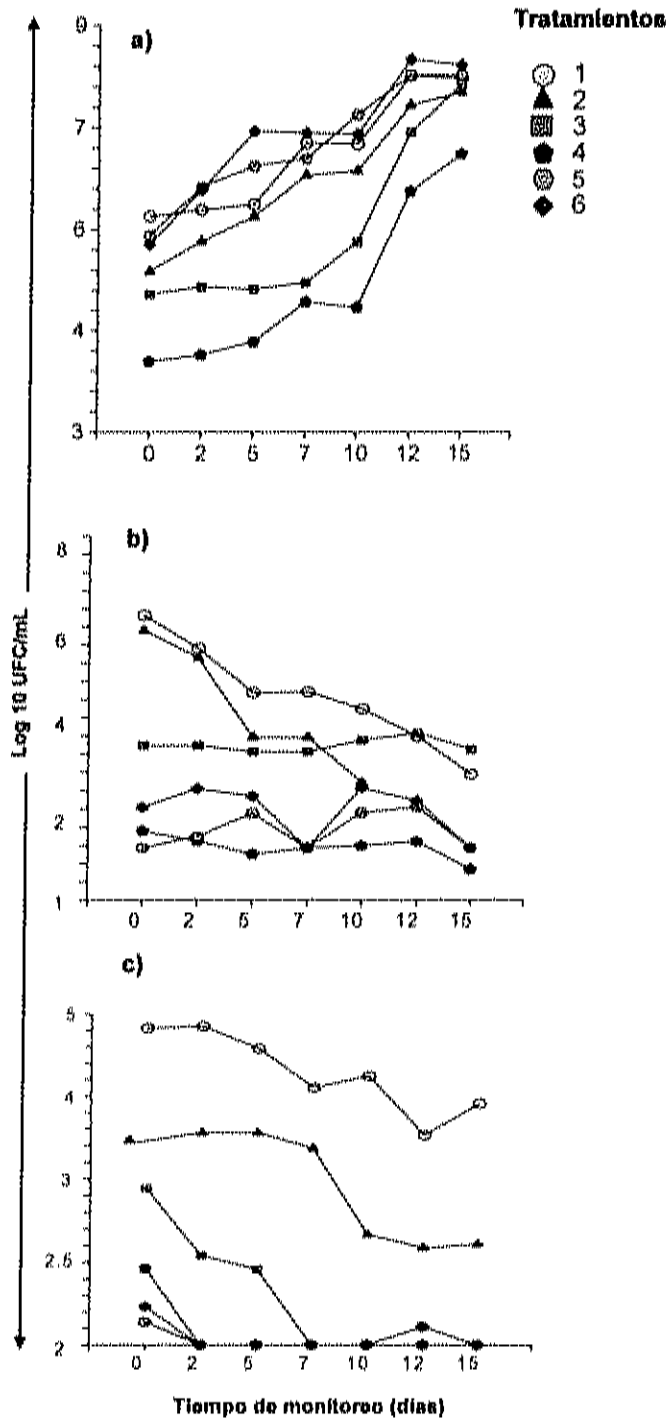


Figura 18. Desarrollo de la población microbiana de los seis tratamientos para queso Fresco analizado por 15 días: Cuenta viable total (a), coliformes totales (b) y hongos y levaduras (c).

Las cuentas microbianas (cuenta viable, coliformes totales, hongos y levaduras) más altas alcanzadas, corresponden a la de los quesos elaborados a partir de leche no tratada con el SLP en ambos casos, cruda y pasteurizada. Sin duda alguna, fueron más altos los valores en queso elaborado simplemente con leche cruda, que pasteurizada. Este comportamiento fue, debido a que la carga microbiana inicial de la leche, pudo ser incrementada durante el proceso artesanal de elaboración de los quesos (Ruegg, 2004); y al no pasteurizar la leche se fomentó un sistema ideal para el desarrollo de los microorganismos.

Por otra parte, los valores de cuenta total viable y coliformes fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) durante los períodos analizados, siendo constante la variación de la carga microbiana. Sin embargo, no ocurrió lo mismo para hongos y levaduras, donde no existió diferencia significativa ($P \geq 0.05$). Estos resultados coinciden con los reportados por Seifu *et al.* (2004b), en un estudio donde los valores de la cuenta total y coliformes totales fueron diferentes en queso Gouda almacenado por 90 días; ocurriendo lo mismo para el caso de hongos y levaduras.

Adicionalmente, el desarrollo de los microorganismos puede relacionarse con las variaciones de pH en cada tratamiento. Así, los quesos elaborados con leche cruda presentaron un pH promedio de 5.9, el cual resulta ligeramente mayor al de los quesos elaborados con leche pasteurizada, tratada con SLP y cultivo lácteo (5.2); y diferente de los quesos elaborados con leche pasteurizada (6.4). Los valores de pH más bajos, se registraron en los quesos elaborados con leche pasteurizada, tratada con SLP y cultivo lácteo, probablemente debido la actividad proteolítica y producción de acidez de las cepas (Donkor *et al.*, 2007). Además, de la actividad metabólica propia de la microflora nativa, que permite la conversión de lactosa en ácido láctico. El pH fue significativamente diferente ($P < 0.05$) por tratamiento para ambos lotes procesados.

Rendimiento

Se elaboraron dos lotes de queso Fresco, cada tipo de queso se procesó partiendo de las siguientes condiciones:

- 1:** Leche cruda no tratada con SLP (LC sin SLP).
- 2:** Leche cruda tratada con SLP (LC con SLP).
- 3:** Leche pasteurizada no tratada con SLP (LP sin SLP).
- 4:** Leche pasteurizada tratada con SLP (LP con SLP).
- 5:** Leche pasteurizada tratada con SLP + Cultivo láctico C_1 (LP con SLP + C_1).
- 6:** Leche pasteurizada tratada con SLP + Cultivo láctico C_2 (LP con SLP + C_2).

En la Figura 19 se muestran los resultados del rendimiento obtenido para cada uno de los quesos testigo y tratamientos del estudio, donde se observan que existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos 3 (LP sin SLP) y 4 (LP con SLP). El rendimiento del tratamiento 4 aumentó 11%, con respecto al del tratamiento 3. Estos resultados son diferentes de los publicados por Seifu *et al.* (2004a) quienes no encontraron diferencias significativas en composición química ni rendimiento de queso Gouda activando el SLP. Probablemente, el incremento del rendimiento se debe a la firmeza del gel, y a su capacidad para retener humedad, es decir el tratamiento de leche con SLP mejoró la capacidad del gel para incorporar humedad en su estructura. Oporta-Tapia (2007), en un estudio donde evaluó la utilización de MTgasa para incrementar el rendimiento quesero, reportó que el tratamiento de leche con MTgasa incrementó el rendimiento del queso Fresco en un 5%, por un efecto similar en el gel. Sin embargo, para el resto de los tratamientos el incremento en el rendimiento no fue significativo ($P \geq 0.05$).

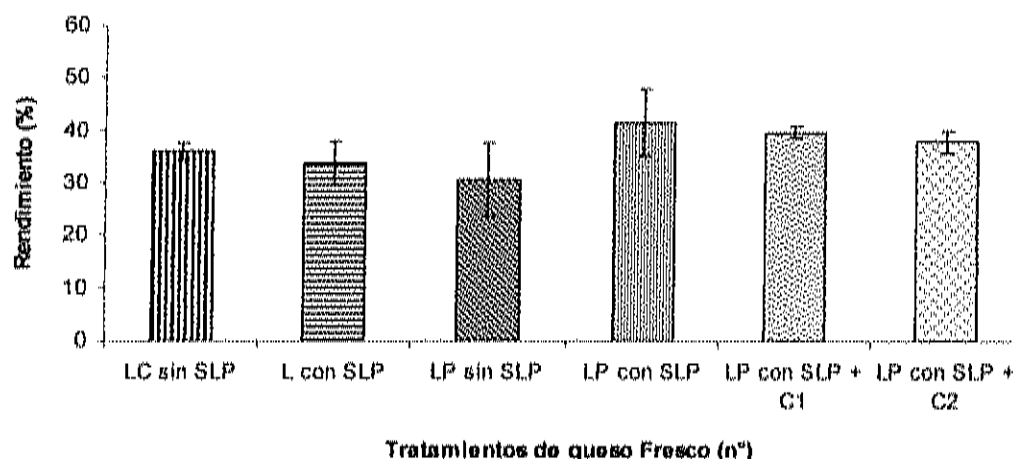


Figura 19. Rendimiento (%) de seis tratamientos para queso Fresco manufacturado bajo las mismas condiciones.

Composición Química y Parámetros Físicoquímicos

En la Tablas 8, se presentan los promedios de composición química y de parámetros físicoquímicos de los dos lotes de queso Fresco, analizado durante 15 días. Los valores de grasa y proteína obtenidos se encontraron por debajo del límite mínimo permitido por la norma NOM-121-SSA1-1994; aunque coinciden con los publicados por Torres-Llanaez *et al.* (2002). Sin embargo, los valores de humedad registrados fueron superiores al límite establecido por la norma NOM-121-SSA1-1994, lo que a su vez afecta de manera directa el valor de los sólidos totales. Por otra parte, existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos para el pH. Los valores de pH pueden ser variables debido a la producción de ácido láctico como producto final, lo cual puede estar asociado a un proceso homo o heterofermentativo de los cultivos iniciadores de *Lactococcus lactis spp. lactis* utilizados.

Tabla 8. Composición química y parámetros fisicoquímicos de queso Fresco.

Tratamientos	Humedad (%)	Sólidos Totales (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	pH
LC sin SLP	59.52 ± 1.96	40.48 ± 1.96	19.32 ± 0.17	18.43 ± 0.57	5.84 ± 0.01 ^{abc}
L con SLP	58.80 ± 2.35	41.20 ± 2.35	18.31 ± 0.15	17.58 ± 0.42	5.83 ± 0.01 ^{abc}
LP sin SLP	64.60 ± 0.50	35.40 ± 0.50	18.16 ± 0.22	15.40 ± 0.19	6.40 ± 0.01 ^a
LP con SLP	63.35 ± 1.74	36.65 ± 1.74	18.70 ± 0.17	16.79 ± 0.21	6.40 ± 0.01 ^{ac}
LP con SLP + C ₁	57.14 ± 1.11	42.86 ± 1.11	19.84 ± 0.17	17.61 ± 0.46	5.48 ± 0.01 ^{bc}
LP con SLP + C ₂	59.87 ± 1.32	40.13 ± 1.32	19.27 ± 0.23	17.56 ± 0.35	5.02 ± 0.00 ^b

^a Distintos literales dentro de una misma columna representan diferencias significativas (P < 0.05).

Efecto del SLP sobre el Crecimiento de los cultivos iniciadores de *Lactococcus lactis* spp. *lactis*

Para obtener información sobre el efecto del SLP en los cultivos iniciadores de *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, utilizados en la manufactura de los quesos; se activó el SLP en leche y se adicionaron dos cepas de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* con sus respectivos testigos (leche pasteurizada no tratada con SLP + cultivos iniciadores). Los tratamientos se incubaron por un tiempo de 8 h, monitoreándose el crecimiento de los microorganismos y la producción de ácido láctico, a intervalos de 2 h en ese mismo periodo.

En la Figura 20, se presentan los valores promedios de las cuentas del crecimiento y la producción de acidez de las cepas C₁ y C₂, objeto de estudio. El crecimiento expresado como (Log₁₀ UFC mL⁻¹) fue similar (P ≥ 0.05) en leche tratada con SLP y testigo (leche no tratada con SLP), a lo largo del periodo de incubación. Sin embargo, el mayor crecimiento de ambas se logró

a la hora 6, y a partir de ese momento se registró un descenso en el desarrollo celular de las cepas.

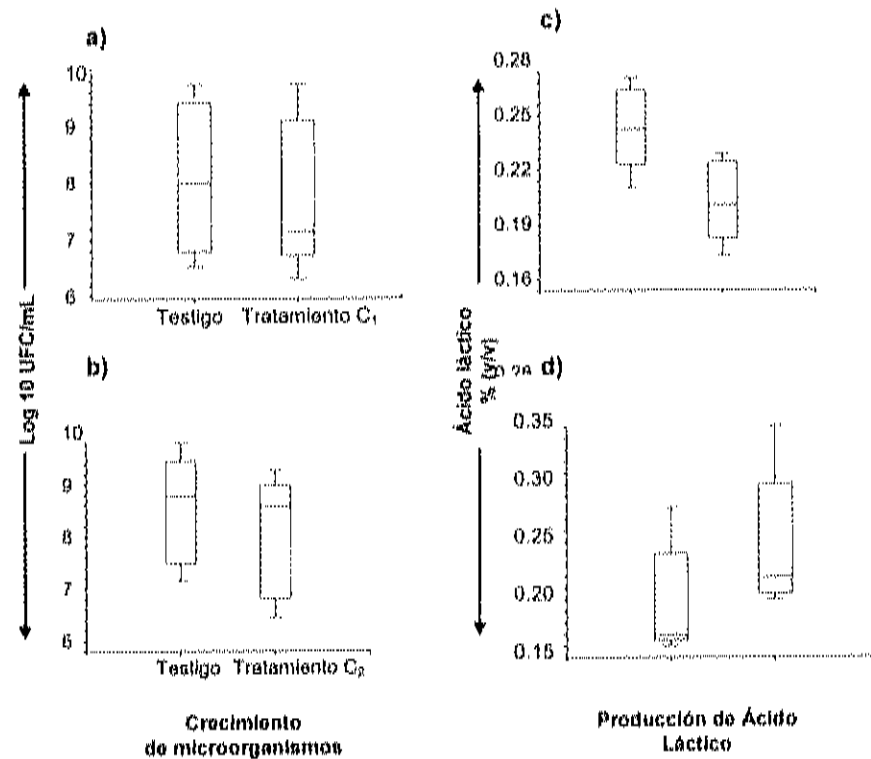


Figura 20. Valores promedio del crecimiento ($\text{Log}_{10} \text{UFC mL}^{-1}$) y producción de ácido láctico % (v/v) de las cepas C₁ y C₂, en leche tratada con SLP y leche testigo (sin tratamiento de SLP).

Seifu *et al.* (2003), en un estudio similar encontraron diferencias significativas en el crecimiento de mezclas de cultivos iniciadores, entre leche tratada y no tratada con SLP. El mismo autor reportó que dos de las mezclas de cultivos presentaron diferencias en su desarrollo entre las 6 y 8 horas del período de incubación. De acuerdo a esto, resulta que los datos de ambos estudios sean distintos, debido a las características propias de cada cultivo utilizado y que en algunos casos se utilizan cultivos que son resistentes al SLP, como LL 50C; no siendo el caso de este estudio donde la resistencia de las cepas probablemente sea distinta, y esté asociada con el nicho del cuál fueron aisladas (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008).

Por otra parte, la producción de ácido láctico de la cepa C₁ fue afectada por la activación del SLP ya que, existiendo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el testigo (leche no tratada con SLP) y la leche tratada con el mismo (Figura 21). Sin embargo, en el caso de la cepa C₂, no se detectó diferencia significativa entre testigo y tratamiento ($P \geq 0.005$); factor que también podría relacionarse con características fenotípicas y genotípicas propias de cada cepa. La producción de ácido láctico en las dos cepas estudiadas no presentó un incremento significativo hasta la hora 4 de incubación, donde los valores se incrementaron, resultados que coinciden con lo publicado por Seifu *et al.* (2003) quienes encontraron el mismo efecto.

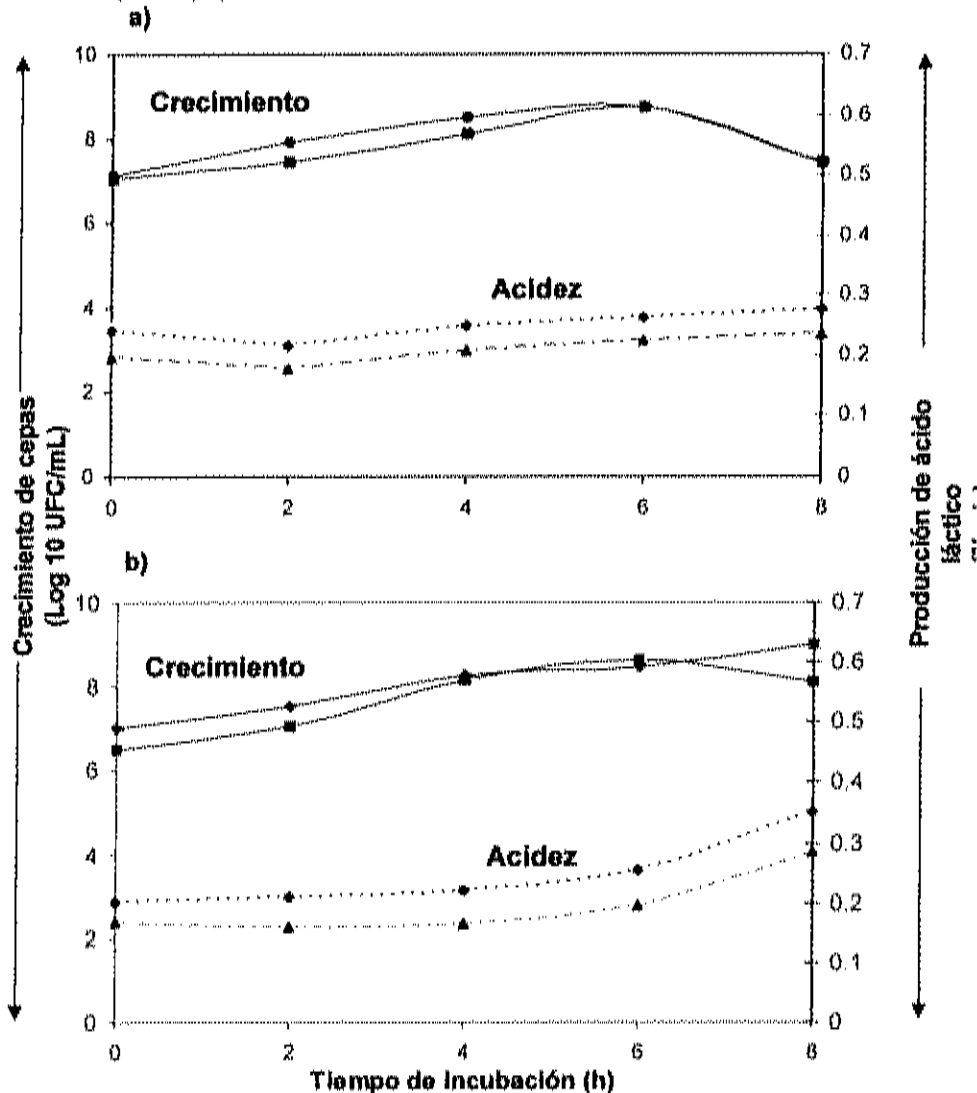


Figura 21. Crecimiento y producción de acidez de dos cultivos iniciadores de *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, en leche pasteurizada tratada con SLP y leche testigo durante 8 h de incubación a 30 °C.

Actividad Proteolítica y Mediciones de pH de cultivos iniciadores de
Lactococcus lactis spp. *lactis*

Las cepas de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* identificadas como C₁ y C₂ hacen referencia a sus nichos de aislamiento. Es decir la cepa C₁ fue aislada de betabel (origen vegetal), y la cepa C₂ fue aislada de queso Chihuahua (origen lácteo). El objetivo de este ensayo fue determinar la actividad proteolítica de ambas cepas y a su vez evaluar las variaciones en unidades de pH con respecto a la producción de ácido láctico.

Después de haber reactivado las cepas, inoculado en leche en polvo estéril reconstituida al 10% (p/v) e incubado a 30 °C, se procedió a monitorear espectrofotométricamente la absorbancia a 340 nm, de acuerdo a lo establecido por Church *et al.* (1983), determinando la actividad proteolítica, acompañada de mediciones de pH. Los tratamientos (leche estéril + cada uno de los cultivos lácticos) y el testigo (leche estéril), se evaluaron en cinco tiempos distintos (0, 6, 12, 24 y 48 h).

La actividad proteolítica fue significativamente diferente ($P < 0.05$) entre los tratamientos (leche estéril + cultivos lácticos) y el testigo (leche estéril) (Figura 22). La cepa C₁ (origen vegetal) fue menos proteolítica en todos los tiempos evaluados, en comparación con la cepa C₂ (origen lácteo) y el testigo, que presentó una actividad proteolítica nula. Los valores promedio de absorbancia a 340 nm fueron constantes en el caso del testigo y el tratamiento de leche estéril inoculada con la cepa C₁ (0.16 y 0.17), respectivamente. No ocurrió lo mismo en el tratamiento con la cepa C₂, donde se registraron fluctuaciones de 0.14 a 0.33 en los valores, siendo el promedio general para esta medición de 0.19. El valor más alto de absorbancia (0.33) se obtuvo en las 24 horas, que debido a muy baja acidez en la muestra fue necesario pasteurizarla y congelarla para análisis futuros. Donkor *et al.*, (2007) evaluó la actividad proteolítica de bacterias ácido lácticas en un estudio

similar. Estos autores encontraron diferencias significativas en los diferentes tiempos de evaluación, y cada uno de los cultivos.

Adicionalmente, en el estudio se realizó el seguimiento en la variación del pH para cada uno de los tratamientos. Al respecto, existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las unidades producidas por la cepa de origen lácteo C₂, vegetal C₁ y el testigo en los tiempos evaluados. Los cambios de pH para el caso de la cepa C₁ y el testigo (leche estéril), presentaron un comportamiento similar y permanecieron constantes desde la hora 0 hasta la 12. Posteriormente, la cepa C₁ comenzó a disminuir hasta alcanzar un pH final de 5.03 diferente del testigo, en cuyo caso fue de 6.18 unidades.

Por otra parte, el comportamiento de la cepa C₂ presentó cambios drásticos a partir de la hora 6. El pH inicial registrado al tiempo 0 fue de 6.08, finalizando en 4.13 a la hora 24. Sólo para este caso, la cepa no se evaluó en la hora posterior (48), debido a que en el tiempo de análisis previo la muestra alcanzó su máxima acidez. En general, los valores promedios de pH durante los 5 tiempos de evaluación fueron 4.19, 5.87 y 6.33 para la cepa C₁, C₂ y el testigo, respectivamente. Los valores de pH más bajos se observaron en la cepa C₂, donde los descensos de pH son marcados a partir de la hora 4; su valor máximo fue de 4.13 unidades a la hora 24. Este efecto podría ser asociado tanto a la producción de ácido láctico, como a la inherente capacidad proteolítica de las bacterias ácido lácticas (Ayad *et al.*, 1999).

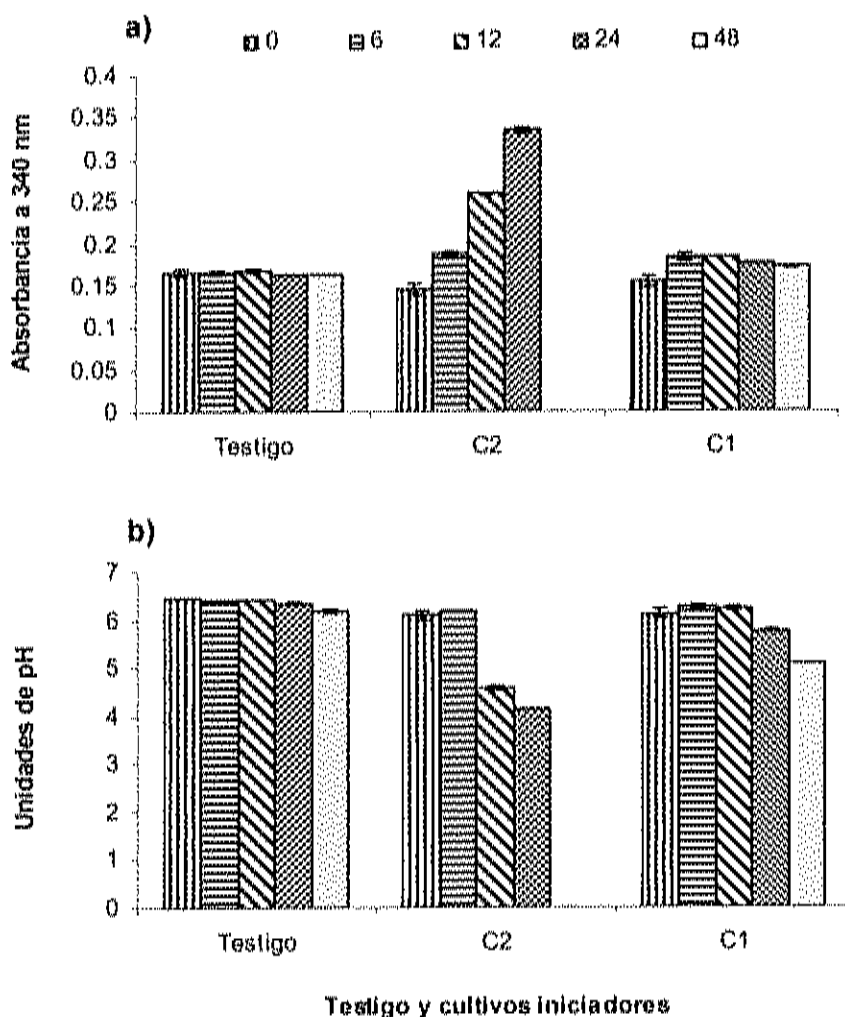


Figura 22. Actividad proteolítica (a) y pH (b) durante el desarrollo de dos cepas de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* (C₁ y C₂) inoculadas en leche estéril, en un período de incubación de 48 h a 30 °C.

Evaluación Sensorial y Vida de Anaquel de Leche y Queso Fresco

Leche

Se evaluaron dos lotes de leche pasteurizada, estableciéndose como testigo a la leche pasteurizada no tratada con SLP, mientras que el tratamiento,

como leche tratada SLP. Ambos, fueron sometidos a evaluación sensorial; la cual tuvo como objetivo determinar que el tratamiento con SLP permitía extender la vida de anaquel de la leche pasteurizada.

Los datos obtenidos en la evaluación sensorial, según la calidad de las muestras fue definido en una escala de 10 puntos; donde el extremo izquierdo de la escala fue de (0) que correspondió a mala calidad y el extremo derecho (10) a buena calidad. Se realizaron 8 sesiones para seleccionar los jueces; mediante la aplicación de 12 pruebas triangulares, fueron seleccionados los jueces que acertaron con un 85% en sus respuestas, al evaluar tres muestras dos con un atributo similar y una diferente. El panel de evaluación fue un grupo formado por 11 panelistas (7 hombres y 4 mujeres). En las sesiones sensoriales los panelistas fueron familiarizados con algunos defectos en leche como acuosidad, sabor a leche hervida, a pasto o ensilaje, oxidada y rancia. Las muestras fueron preparadas de acuerdo a Jellinek (1985).

Finalmente, los panelistas evaluaron la calidad de la leche de ambos lotes por duplicado. El fin de la vida de anaquel en ambos, el testigo y tratamiento, se determinó cuando el 50% de los panelistas más uno, evaluaron en la escala puntuaciones iguales o menores a 5. Los resultados indicaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el tiempo de duración de la leche, entre el tratamiento (leche pasteurizada tratada con SLP) y el testigo (leche pasteurizada no tratada con SLP). En este estudio el tratamiento de la leche con SLP incrementó la vida de anaquel de la leche en un 20%. Este incremento en la vida de anaquel podría ser aún mayor, si se partiera de una leche de mejor calidad microbiológica. La vida de anaquel de la leche tratada con SLP fue extendida hasta el día 18, mientras que la leche no tratada con el mismo sistema tuvo una vida de anaquel menor en tres días (Figura 23). Los panelistas reportaron la presencia de un sabor rancio en las últimas sesiones.

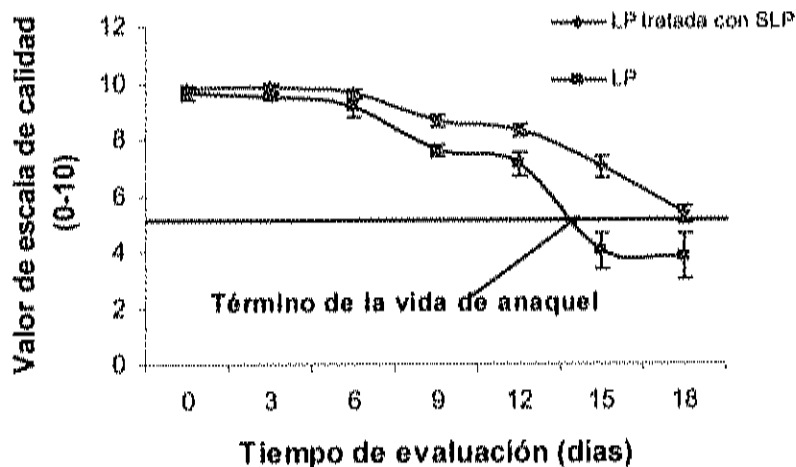


Figura 23. Vida de anaquel de leche pasteurizada tratada con SLP y leche testigo (leche pasteurizada).

Queso

Con las cepas seleccionadas, C_1 y C_2 , se elaboraron 4 bloques (\approx 1 Kg) de queso Fresco por lote. Se procesaron dos lotes de leche, lo que hizo un total de 8 bloques de queso Fresco para el estudio. Los testigos y tratamientos, cinco en total se plantearon con base en pruebas preliminares de laboratorio de la siguiente manera:

Queso 1: Elaborado a partir de leche cruda no tratada con SLP (LP testigo).

Queso 2: Elaborado a partir de leche cruda tratada con SLP (LP + SLP).

Queso 3: Elaborado a partir de leche pasteurizada tratada con SLP + C_1 (LP + SLP + C_1).

Queso 4: Elaborado a partir de leche pasteurizada tratada con SLP + C_2 (LP + SLP + C_2).

Los 8 bloques de queso Fresco se sometieron a evaluación sensorial, con el objetivo de determinar cual de las dos cepas seleccionadas e inoculadas en

leche pasteurizada tratada generaría un perfil similar a queso Fresco. Los datos obtenidos de la evaluación sensorial para los parámetros de aceptabilidad general, sabor y textura se presentan en la Tabla 10.

Los quesos elaborados con leche tratada con SLP (Queso 2) y el queso al cual se le agregó la cepa de origen vegetal C₁ (Queso 3); presentaron los mayores porcentajes de aceptabilidad por parte de los panelistas (62.25 y 59%), respectivamente. Adicionalmente, el queso elaborado con leche cruda, no tratada con SLP (Queso 1), presentó un porcentaje de aceptabilidad medio (22%). Finalmente, el queso elaborado con leche tratada con SLP y la cepa C₂ (Queso 4) presentó un grado de rechazo equivalente (25.25%). Esto puede ser debido a la intensidad de acidez en las muestras evaluadas, por efecto de la acción del sistema proteolítico propio de la cepa. Resultados similares se observaron al evaluar sabor y textura en las muestras.

Tabla 10. Grado de aceptabilidad de queso Fresco elaborado con cepas de origen vegetal y lácteo.

Tratamiento	Aceptación¹	Sabor²	Textura
Queso 1. (LP no tratada con SLP)	0.88	5.36	6.19
Queso 2. (LP tratada con SLP)	2.49	7.96	8.02
Queso 3. (LP tratada con SLP + C ₁)	2.36	7.30	7.83
Queso 4. (LP tratada con SLP + C ₂)	-1.01	0.68	0.53

¹ Escala de aceptación: 4 me gusta extremadamente, -4 me disgusta extremadamente.

² Escala de aceptación de sabor y textura: 4 Típica de queso Fresco, -4 atípica de queso Fresco.

El análisis sensorial del queso Fresco se realizó mediante pruebas de diferenciación múltiple. En total se trabajó con 8 panelistas (6 mujeres y 2 hombres), de 20 que eran al inicio de la selección y seleccionándose a partir de los mismos panelistas que participaron en el estudio de leche. En total se realizaron 13 sesiones de 90 minutos cada una, y los resultados de la evaluación sensorial se analizaron por medio de un análisis de varianza. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) por efecto de día y tratamiento, lo que indica que el almacenamiento y el crecimiento de los

cultivos generaron cambios del perfil del sabor detectado por el panel; por lo tanto las valoraciones serían diferentes. Para determinar las diferencias específicas entre cada uno de los tratamientos se utilizó una prueba de comparación múltiple de Tukey–Kramer. Los resultados obtenidos indican que existió diferencia significativa ($P < 0.05$), siendo los quesos 2 y 3 los que presentaron mejores calificaciones.

De igual forma que en leche, los panelistas evaluaron la calidad del queso Fresco de ambos lotes por duplicado. El fin de la vida de anaquel de cada uno de los quesos elaborados, se determinó cuando el 50% de los panelistas más uno, los evaluaron en la escala con puntuaciones iguales o menores a 5. Los resultados indicaron diferencias significativas ($P < 0.05$) durante el período de evaluación.

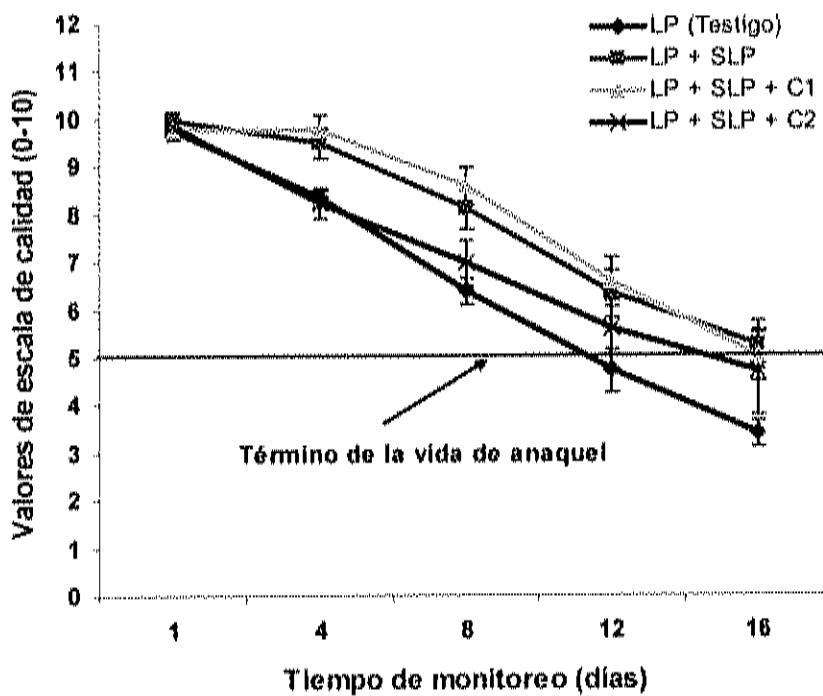
Los 4 quesos presentaron una valoración similar en la escala en el día uno, debido a mínimos cambios en los parámetros de su composición o en el desarrollo de los cultivos lácticos. Sin embargo, con el transcurso del tiempo el comportamiento de los quesos empezó a ser variable; así, a partir del día 4 al 16, los quesos procesados con leche pasteurizada tratada con SLP (queso 2) y con leche pasteurizada tratada con SLP y cultivo C_1 (queso 3), tuvieron una valoración similar en la escala, finalizando con puntuaciones de 5.22 y 5 el día 16, respectivamente (Figura 24).

Un comportamiento similar fue observado en el queso procesado con leche pasteurizada tratada con el SLP y cultivo C_2 (queso 4), para este caso la valoración final en la escala para el día 16 fue de 4.67. Finalmente, el queso elaborado con leche pasteurizada no tratada con SLP (queso 1) resultó con los puntajes más bajos en la escala, y su calificación final fue 3.38 el día 16; sin embargo, el fin de su vida de anaquel se registró el día 12, con un valor de 4.70. Los resultados obtenidos permiten inferir que existe la posibilidad de un efecto sinérgico entre la activación del SLP y la adición de un cultivo

específico, debido a que el tratamiento al cual se activó el SLP, sin adición de ningún cultivo no presentó efectos muy favorables en el queso Fresco.

La posible justificación a este argumento puede estar relacionado con la producción de bacteriocinas por parte de las bacterias ácido lácticas empleadas; lo que compatible con la activación del SLP en leche cruda podría reducir la carga microbiana inicial de la leche y mejorar la calidad de sus derivados (Rodríguez *et al.*, 1997). Por otra parte, el estudio realizado por McLay *et al.* (2001), explica que existe un efecto positivo sobre bacterias Gram-negativas, cuando se emplean tratamientos combinados entre el SLP, monolaurín y algunos lípidos. Las últimas investigaciones realizadas sobre efectos sinérgicos con el SLP, hacen referencia a la utilización de altas presiones y a la activación del SLP; principalmente destinado a combatir bacterias resistentes a ese tipo de tratamientos (García-Graells *et al.*, 2003). Sin duda alguna, este conjunto de técnicas podrían ser de particular interés para utilizarlas en la manufactura de una amplia variedad de quesos, sin limitarla a queso Fresco.

Adicionalmente, en las observaciones los panelistas identificaron diferencias en la textura y sabor de los quesos. Los quesos que presentaron un perfil muy parecido al queso Fresco, fueron los elaborados a partir de leche pasteurizada tratada con el SLP (queso 2) y con leche pasteurizada tratada con el SLP y cultivo láctico C₁ (queso 3). El queso elaborado con leche pasteurizada tratada con el SLP y cultivo C₂ (queso 4) fue de textura cremosa muy diferente a la del queso Fresco. Finalmente, el queso elaborado con leche pasteurizada tratada con SLP sin cultivo alguno (queso 1), fue el menos apreciado por los panelistas ($P < 0.05$).



Día	Queso 1	Queso 2	Queso 3	Queso 4
1	9.74 ± 0.20 ^a	9.94 ± 0.11 ^a	9.75 ± 0.20 ^a	9.85 ± 0.17 ^a
4	8.35 ± 0.31 ^b	9.49 ± 0.20 ^a	9.75 ± 0.22 ^a	8.21 ± 0.30 ^b
8	6.39 ± 0.40 ^c	8.09 ± 0.27 ^a	8.59 ± 0.23 ^b	6.97 ± 0.48 ^a
12	4.70 ± 0.50 ^c	6.32 ± 0.47 ^a	6.58 ± 0.44 ^a	5.60 ± 0.56 ^b
16	3.38 ± 0.51 ^c	5.22 ± 0.27 ^a	5.00 ± 0.53 ^a	4.67 ± 0.88 ^b

*Distintos literales entre columnas representan diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Figura 24. Vida de anaquel de queso Fresco evaluado durante 16 días.

CONCLUSIONES

- La activación del sistema lactoperoxidasa utilizando como sustratos 2% (p/v) de rhodanide de sodio y 3% (p/v) de percarbonato de sodio, mejoró sustancialmente la calidad microbiológica de la leche cruda y queso Fresco.
- El sistema lactoperoxidasa no afectó la composición química y los parámetros fisicoquímicos de la leche y queso Fresco; y el rendimiento quesero se incrementó en un 5%.
- La activación del SLP no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento del cultivo iniciador de *Lactococcus lactis* spp. *lactis*.
- La vida de anaquel de la leche pasteurizada tratada con SLP se incrementó en un 20%. La vida de anaquel de la leche tratada con SLP fue extendida hasta el día 18, mientras que la de leche no tratada con SLP fue menor en tres días.
- La vida de anaquel del queso Fresco elaborado con leche tratada con SLP se incrementó en un 45%. Los quesos mejor evaluados por los panelistas, fueron los elaborados a partir de leche pasteurizada tratada con SLP y la adición de cultivo láctico C₁, los mismos que presentaron el perfil más parecido al queso Fresco.

BIBLIOGRAFÍA

- Adolphe Y., Jacquot M., Linder M., Revol-Jenelles A. M. y Milliere J. B. (2006). Optimization of the components concentrations of the lactoperoxidase system by RSM. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 1034 -1042.
- AESA/MSA (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Ministerio de Sanidad y Consumo). (2005). Aplicación del sistema lactoperoxidasatiocianato a frutas y hortalizas que van a ser comercializadas como productos IV Gama. Comité Científico, referencia AESA-2005-012. España. 31p.
- Althaus R. L., Molina M. P., Rodríguez M. y Fernández, N. (2001). Analysis time and lactation stage influence on lactoperoxidase system components in dairy ewe milk. *Journal of Dairy Science*. 84:1829 - 1835.
- Anónimo. Ciencia y tecnología de la leche. (2007). Determinación de grasa y sólidos totales en leche y derivados. Consultado: Noviembre, 2007. Disponible: <http://members.tripod.com/ve/tecnologia/solidosygrasa.htm>
- AOAC (Official Methods of Analysis). (2000). Chapter 33. AOAC Internacional. USA. 947.05-Acidez titulable, 933.05-Grasa, 991.2-Proteína, 948.12-Humedad, 981.12-pH.
- Ávila T. S., Lázcano P. R., y Navarro H. J. (2007). Confianza en la determinación de células somáticas en leche de vaca mediante la aplicación de las pruebas para mastitis: CMT, WMT, CMCS, FOSSOMATIC y DCC. Consultado: Octubre, 2007. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BitRGClig0021.pdf>

- Ayad E., Verheul A., Catrienus de J., Wouters J. y Smit G. (1999). Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *International Dairy Journal*. 9:725-735.
- Barret N. E., Grandinson A. S., y Lewis M. J. (1999). Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *Journal of Dairy Research*. 66:73 - 80.
- Björck L., Rosen C.G., Marshall V. y Reiter B. (1975). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonads and other gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 30:199 - 204.
- Björck L. (1978). Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. *Journal of Dairy Research*. 45:109 - 118.
- Bönish M., Heidebach T y Kulosik U. (2007). Influence of transglutaminase protein cross-linking on the rennet coagulation of casein. *Food Hydrocolloids*. Article in press.
- Boor K. J., Brown D. P., Murphy S. C., Kozlowski S.M. y Bandler D. K. (1998). Microbiological and chemical quality of raw milk in New York State. *Journal of Dairy Science*. 81:1743 - 1748.
- Boots J. W. y Floris R. (2005). Lactoperoxidase: From catalytic mechanism to practical applications. *International Dairy Journal*. 16:1272 - 1276.
- Bosch E. H., van Doorne H. y de Vries S. (2000). The lactoperoxidase system: the influence of iodide and the chemical and antimicrobial stability over the period of about 18 months. *Journal of Applied Microbiology*. 89:215 - 224.

- Cals M. M., Mailliar P., Brignon P., Anglade P. y Dumas B. R. (1991). Primary structure of bovine lactoperoxidase, a fourth member of a mammalian heme peroxidase family. *Journal of Biochemistry*. 198:733-739.
- Chase L. E. (2000). Total dairy nutrition. Cornell University. Department of Animal Science, Ithaca, NY. Consultado: Noviembre, 2007. Disponible en: <http://www.ansci.cornell.edu>
- Church F., Swaisgood H., Porter D., y Catignani G. (1983). Spectrophometric assay using 0-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*. 66: 1219 – 1227.
- Clark S., Warner., H., y Luedecke, L. (1999). Acceptability of queso Fresco Chesse by traditional and no traditional consumers. *Food Science Technology*. 7: 165-170.
- de Wit J. N. y van Hooydonk, A.C.M. (1996). Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial system. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. 50:227 - 244.
- Donkor O., Henriksson A., Vasiljevic T. y Shah N. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Lait*. 86:21 – 38.
- Elliot R. M., McLay J. C., Kennedy M. J. y Simmonds R. S. (2003). Inhibition of foodborne bacteria by the lactoperoxidase system in a beef cube system. *Journal of Food Microbiology*. 91:73 - 81.
- FAO. (2000). Manual sobre el uso del sistema lactoperoxidasa en la manipulación y conservación de la leche. Dirección de producción y sanidad animal de la FAO. Roma, Italia.

- FAO. (2005). Beneficios y riesgos potenciales del sistema de la lactoperoxidasa en la conservación de la leche cruda. Informe de la reunión técnica de la FAO/OMS. Roma. Italia.
- FDA. (1995). Bacteriological Analytical Manual. 8 ed. U.S. Food and Drug Administration Association of Official Analytical Chemists.
- FDA. (2007). FDA and CDC remind consumers of the dangers of drinking raw milk. Consultado: Abril, 2007. Disponible en: <http://www.fda.gov>
- Fonteh F. A., Grandinson A. y Lewis M. J. (2002). Variations of lactoperoxidase activity and thiocyanate content in cow's and goat's milk throughout lactation. *Journal of Dairy Research*. 69:401 - 409.
- Fonteh F. A., Grandinson A., y Lewis M. J. (2005). Factors affecting lactoperoxidase activity. *Journal of Dairy Technology*. 58:233 - 236.
- Fox P. F. (1987). *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol.1. General Aspects. Elsevier Applied Science. Cork. Ireland, 400p.
- García-Graells C., van Opstal I., Vanmuysen S. C. M. y Michiels C. W. (2003). The lactoperoxidase system increase efficacy of high pressure inactivation of foodborne bacteria. *Journal of Food Microbiology*. 81:211 - 221.
- Gaya P., Medina M. y Núñez M. (1991). Effect of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:3355 - 3360.
- Gutiérrez-Méndez N., Vallejo-Cordoba B., González-Córdova A. F. y Nevárez-Moorillón G. V. (2008). Evaluation of aroma generation of

- Lactococcus lactis spp. lactis with an Electronic nose and sensory analysis. *Journal of Dairy Science*, 91:49 - 57.
- Hanssen F. (1924). The bactericidal property of milk. *Br. J. Exp. Pathol.* 5:271-280.
- Hazard S T. 1997. Variación de la composición de la leche. p. 33-44. Serie Carillanca N°62. Curso taller de la calidad de la leche e interpretación de resultados de laboratorio. Temuco, 7 de Noviembre de 1997.
- Hernández C. M. M., van Markwijk B. W. y Vreeman H. J. (1990). Isolation and properties of lactoperoxidase from bovine milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. 44:213 - 231.
- Hirano R., Hirano M., Oooka M., Dosako S., Nakajima I. y Igoshi K. (1998). Lactoperoxidase effects on rheological properties of yogurt. *Journal of Food Science*. 63:35 - 38.
- Hoeksema I., y Papadopoulos, G. (2006). Antibiotics in milk. Thesis project. Wageningen University and Research Center. Netherlands. Wageningen. 21p.
- Jellinek, G. (1985). Sensory evaluation of food: theory and practice. Ellis Horwood Ltd., Chichester. England. 135p.
- Johnson M. E. y Lucey J. A. (2006). Major technological advances and trends in cheese. *Journal of Dairy Science*. 89:1174 - 1178.
- Kelly, A. L. y Fox, P. F. (2006). Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements. *International Dairy Journal*, 16:707 - 715.

- Khalid S. y Masud T. (2004). Effect of activated lactoperoxidase system on the quality characteristics of yoghurt. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 3:777 - 783.
- Kussendrager K. D. y van Hooijdonk, A. C. M. (2000). Lactoperoxidase: physicochemical properties, occurrence, mechanism of action application. *British Journal of Nutrition*. 84:19 - 20.
- Kyozaire J. K. (2003). Master Degree Thesis. Microbiological quality of goat milk obtained under different production systems. Pretoria University. Pretoria. South Africa.
- Leroy F. y De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Food Science and Technology*. 15: 67 - 78.
- Lucey J. A., Johnson M. E. y Horne D. S. (2003). Invited Review. Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*. 86:2725 - 2743.
- López, M. (2004). Tesis de Maestría. Mejoramiento de la vida de anaquel en queso tradicional ranchero y queso de pasta ahilada "Oaxaca". Universidad Iberoamericana. México. D. F. 108p.
- McLay J. C., Kennedy M. J., O'Rourke A. L., Elliot R. M. y Simmonds R. S. (2002). Inhibition of bacterial foodborne pathogens by the lactoperoxidase system in combination with monolaurin. *Journal of Food Microbiology*. 73:1 - 9.
- Matak K. E., Summer S. S., Duncan S. E., Hovingh E., Worobo R. W., Hackney C. R. y Pierson M. D. (2007). Effects of ultraviolet irradiation

- on chemical and sensory properties of goat milk. *Journal of Dairy Science*. 90:3178 - 3186.
- Marks N. E., Grandinson A. S. y Lewis M. J. (2001). Challenge testing of the lactoperoxidase system in pasteurized milk. *Journal of Applied Microbiology*. 91:735 - 741.
- Martínez B. I., y Ramírez G. R. E. (2006). Sistema de pago de leche según su calidad. *Ganadería Intensiva: Carne y leche*. Editorial Agro Sínteis. Ciudad de México. México.
- Meilgaard, M., Civile, G., y Carr, T. (1999). Attribute difference test: How does attribute by differ between samples: VI. Multisample difference test: rating approach-evaluation by analysis of variance. In. *Sensory Evaluation Techniques*. 3rd. Edition. CRC Press LLC, New York.
- Morales P., Fernández-García E. y Núñez M. (2003). Caseinolysis in cheese by Enterobacteriaceae strains of dairy origin. *Applied Microbiology*. 37:410 - 414.
- Murphy S. (2007). Understanding raw milk bacteria counts. *Northeast Dairy Business*. PRO-DAIRY. April. 2007.
- Ojeda M. (2005). El análisis sensorial de los quesos. Consultado: Noviembre, 2007. Disponible en: <http://www.gobiernodecanarias.org>
- Oporta-Tapia, C. (2006). Tesis de maestría. Establecimiento de un proceso para la obtención de queso Fresco a partir de leche pasteurizada tratada con la enzima transglutaminasa y un cultivo láctico específico. CIAD, A. C. Hermosillo, Sonora, México.

- Osorio L. (2005). *Industria lechera mundial. Curso teórico – práctico de tecnología y procesamiento de lácteos*. Zamorano, Honduras.
- Özer B., Grandinson A., Robinson R. y Atamer M. (2003). Effects of lactoperoxidase and hydrogen peroxide on rheological properties of yoghurt. *Journal of Dairy Research*. 70:227 - 232.
- Peláez C. y Requena T. (2005). Exploiting the potencial of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*. 15:831 - 844.
- Pérez G., Cardell E. y Zárate V. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *Journal of Food Science and Technology*. 38:537 - 546.
- Ponce J., Capdevilla H., Alfonso M., López R., y Toboada A. (2008). Conservación de la leche en Cuba mediante la activación del sistema lactoperoxidasa. Consultado: Junio 2008, Disponible en:
<http://www.fao.org/DOCREP/U8750T/U8750T0G.HTM>
- Ratner A. J. y Prince A. (1999). Perspective Lactoperoxidase New Recognition of an "Old" Enzyme in Airway Defenses. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20:642 - 644.
- Reiter B. y Hárnuv G. (1984). Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications. *Journal of Food Protection*. 47:724 - 732.
- Rodríguez E., Tomillo J., Núñez, M. y Medina M. (1997). Combined effect of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and lactoperoxidase system activation on *Listeria monocytogenes* in refrigerated raw milk. *Journal of Applied Microbiology*. 83:389 - 395.

- Ronbinson R. K. (1993). Modern Dairy Technology (Vol 2). 2nd Ed. Blackie Academic and Professional. Cambridge. England, Great Britain. 516p.
- Robinson R. K. y Wilbey R. A. (1998). Cheesmaking practice. 3rd Ed. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland. 449p.
- Ross R. P., Stanton C., Hill C., Fitzgerald G. F. and Coffey A. (2000). Novel cultures for cheese improvement. Food Science and Technology. 11:96 - 104.
- Ruegg P. (2002). Hacia la calidad de la leche. Reporte informativo de la Universidad de Wisconsin, Mádison.
- Santillán V. (2006). Símbolos de textura y apariencia. Hidrocoloides. Énfasis. Editorial FLC. 3:56 – 57.
- Sarkar S. (2006). Shelf life extension of cultured milk products. Nutrition and Food Science. 36:24 – 31.
- SAGARPA (Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera). (2005). Boletín de Leche. Industria de leche y derivados. México. p20.
- Secretaría de Salud. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-120-SSA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: Frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.
- Secretaría de Salud. (2003). Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003. Leche, fórmula láctea y productos lácteos combinados. Denominación, especificaciones bioquímicas, información comercial y métodos de pruebas.

- Secretaría de Salud. (2006). Norma Oficial Mexicana NMX-F-720-COFOCALEC-2006. Sistema producto-leche. Especificaciones para el transporte de leche cruda, así como para el enfriamiento y almacenamiento de la misma en centros de acopio.
- Seifu E., Buys E. M y Donkin E. F. (2003). Effect of the lactoperoxidase system on the activity of mesophilic cheese starter cultures in goat milk. *International Dairy Journal*. 13:953-959.
- Seifu E., Donkin E. F. y Buys E. M. (2004a). Application of the lactoperoxidase system to improve the quality of goat milk cheese. *Journal of Animal Science*. 34:184 - 187.
- Seifu E., Buys E. M. y Donkin E. F. (2004b). Quality aspects of gouda cheese made from goat milk preserved by the lactoperoxidase system. *International Dairy Journal*. 14:581 - 589.
- Seifu E., Buys E. M. y Donkin E. F. (2005). Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potencial applications: a review. *Food Science and Technology*. 16:137 - 138.
- Torres-Llanaez M. J. 2002. Tesis de Maestría. Diseño de un cultivo láctico para la biogeneración del sabor del queso fresco regional. CIAD, A.C. Hermosillo. Sonora. México.
- Torres-Llanaez, M. J., Vallejo-Cordoba, B., Díaz-Cinco, M. E., Mazorra-Manzano, A. F., y González-Córdova, A.F. (2006). Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresh cheese. *Food Control*. 17:683 - 689.
- Vallejo-Cordoba, B.; Shuryo, N. (1994). Keeping-Quality Assessment of Pasteurized Milk by Multivariate Analysis of Dynamic Headspace Gas

Chromatographic Data. 1. Shelf-Life Prediction by Principal Components Regression. *Journal of Agricultural, Food and Chemistry* 42, 989-993.

Vargas, T. 2006. Calidad de la leche: versión de la industria láctea. Fundación INLACA. Boletín informativo.

Villegas de Gante. (2004). Tecnología quesera. Editorial Trillas. Ciudad de México. México. 398p.

Walstra P., Geurts T. J., Normen A., Jellema A. y van Boeckel M. A. (1999). Dairy technology. Principles of milk properties and processes. 1st Ed. Dekker. New Cork. USA. 663p.

Zapico P. (1993). Tesis de Doctorado. El sistema lactoperoxidasa en leche de cabra, aplicación a la mejora de su calidad microbiológica. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España. 174p.

Zeng, S., Chen, S., Bah, B., y Tesfai, K. 2007. Effect of extended storage on microbiological quality, somatic cell count, and composition of raw goat milk on a farm. *Journal of Food Protection*. 5:1281-1285.