



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“SOBREVIVENCIA DE DOS BACTERIAS PROBIÓTICAS
Lactobacillus acidophilus Y *Bifidobacterium lactis* EN DOS
QUESOS FRESCOS DESLACTOSADOS: OAXACA Y
PANELA”**

TESIS COLECTIVA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTAN

INDIRA GUADALUPE RODRÍGUEZ CERVANTES

EVELIN SALDAÑA VALERIO

DIRIGIDA POR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2009.

FACULTAD DE
QUÍMICA



BIBLOTECA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

SOBREVIVENCIA DE DOS BACTERIAS PROBIÓTICAS

Lactobacillus acidophilus Y *Bifidobacterium lactis* EN DOS QUESOS

FRESCOS DESLACTOSADOS: OAXACA Y PANELA”

TESIS COLECTIVA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTAN

**INDIRA GUADALUPE RODRÍGUEZ CERVANTES
EVELIN SALDAÑA VALERIO**

DIRIGIDA POR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SINODALES

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ
DIRECTOR

Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ
SINODAL

Q. EN A. RAFAEL PÉREZ MUÑOZ
SINODAL

M. EN C. JAIME VALENCIA MARTÍN DEL CAMPO
SINODAL

Agradecimientos

A mis padres, por su cariño, comprensión y por enseñarme que la fuerza, perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.

Papá por todos los buenos consejos, por tu apoyo incondicional, por ser mi guía y por estar siempre a mi lado. Mamá por creer en mí, por tus sabias palabras en el momento oportuno, por ser mi ejemplo y por todo el amor que siempre me has dado.

Los quiero mucho, gracias por mantenerse allí pacientes a lo largo de toda mi carrera.....nuestra carrera!!!

A mis hermanos, Elvira por el apoyo, las palabras de aliento y la comprensión que siempre me has brindado. Alejandro por los consejos, por las risas y mostrarme que siempre hay opciones frente a las dificultades que se nos presentan. Arturo por tener siempre una sonrisa, disposición para escucharme y un consejo que darme.

Gracias hermanos porque a través de sus consejos logré forjar un camino, guiarme y alentarme ante los obstáculos que se me presentaron, los quiero mucho.

A mis amigas, Nave, Viole, Mir, Shivis y Flor por su apoyo, por compartir conmigo tristezas, alegrías, éxitos, fracasos y por creer en mí. En mi vida son personas muy importantes de las cuales aprendo día con día, agradezco el haberlas conocido, gracias por su amistad incondicional.

A Indira por permitirme realizar este proyecto contigo, nadie más que las dos sabemos lo que fueron estos meses de trabajo. Nos vamos con las manos llenas de aprendizajes académicos y personales, gracias por tu amistad.

Ángel gracias por creer en mí, por tu apoyo, tu cariño y por los gratos momentos que compartimos, pero sobre todo gracias por la lección de vida que me diste, siempre serás un bonito recuerdo..... Tqm

A mis amigos que siempre están dispuestos a escucharme, apoyarme y hacer cualquier momento divertido con sus sonrisas, gracias a Susana, Lolis, Liliana, Sergio, Beto, Fer, y a todos los Chilitos.

Al Dr. Regalado y la Dra. Blanca les agradezco su calidez, paciencia, disposición y apoyo, fueron personas claves para poder cumplir esta meta.

A mis sinodales el Ing. Jaime Valencia y Lic. Rafael Pérez así como a la Dra. Silvia Amaya, gracias por el tiempo y la dedicación que nos brindaron para poder sacar adelante este proyecto.

A todos mis maestros y amigos que me han compartido sus experiencias y forman parte de mi crecimiento personal y profesional..... De corazón gracias!!!

Evelyn

Agradecimientos

A lo mejor de mi vida, mi familia. A mi mamá por su cariño, apoyo e interés durante mi formación en cada aspecto de mi vida. A mi papá, por sus consejos basados en la experiencia de una vida llena de éxitos.

A mis hermanos, Ciltalli, por enseñarme la manera divertida de alcanzar las metas, a Javier, por demostrarme que siempre puede haber otra forma de conseguir la realización personal además del camino impuesto por otros, a mi hermanita Jimena, por alegrarme cada día con esa sonrisa picara y encantadora.

A mis tías y primas, por todos sus comentarios, los ratos de alegría y la experiencia compartida.

A mis amigas Mir, Violeta, Naye, Chivis por compartir su tiempo sus conocimientos y por todos los momentos de diversión que pasamos juntas. Especialmente a Evelyn por ser mi compañera durante el desarrollo de esta investigación, por todos los ratos de trabajo extenuante, baile y charlas sin fin.

A todos los amigos que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y escucharme. Gracias por todos los momentos de risas interminables, por su afecto y sobre todo por su apoyo constante e incondicional a Pedro, Fer, Felipe, Victor, y Zoé.

A todos los maestros que me acompañaron durante mi formación profesional, especialmente al Dr. Carlos Regalado y a la Dra. Blanca García.

Al maestro Rafael Pérez por guiarnos en el camino de nuestra formación como Químicos en Alimentos e igualmente al Ing. Jaime Valencia por invitarnos a participar en su proyecto de desarrollo de un nuevo producto con mucho futuro.

MIRA

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Alimentos funcionales	3
II.2. Bacterias ácido lácticas (BAL)	4
II.3 Lactobacilli	5
II.4 Bifidobacterias	6
II.5 Colonización del tracto gastrointestinal por BAL	8
II.6 Estudios sobre la administración de BAL y la salud	8
II.6.1 Efecto de los probióticos en el sistema inmune	9
II.6.2 Supresión de la aparición de tumores	10
II.6.3 Reducción de síntomas gastrointestinales en individuos intolerantes a la lactosa	12
II.6.4 Efecto de los probióticos sobre el colesterol	12
II.6.5 Efecto antialérgico de leches fermentadas con bacterias lácticas	13
II.6.6 Prevención y tratamiento de diarrea	14
II.7 Alimentos probióticos	14
II.8 Legislación sobre probióticos	15
II.9 Queso como fuente de probióticos	18
II.10 Intolerancia a la lactosa	21
II.11. Quesos	22
II.11.1 Composición de la leche	23
II.11.2 Etapas de elaboración de queso	29

II.11.2.1 Recepción de la leche	30
II.11.2.2 Pasteurización de la leche	31
II.11.2.3 Coagulación de la leche	31
II.11.2.4 Corte de la cuajada	34
II.11.2.5 Agitación de los granos de la cuajada	34
II.11.2.6 Desuerado de la cuajada	34
II.11.2.7 Moldeado de los quesos	35
II.11.2.8 Prensado de los quesos	35
II.11.2.9 Salado de los quesos	36
II.12 Producción y consumo de queso Panela y Oaxaca en México	37
II.13 Análisis Sensorial	39
II.13.1 Los sentidos y las propiedades sensoriales	39
III. HIPÓTESIS	42
IV. OBJETIVO	43
IV.1 General	43
IV.2 Específicos	43
V. METODOLOGÍA	44
V.1 Materiales	44
V.1.1 Cepas	44
V.1.2 Enzimas	44
V.1.3 Soluciones y medios de cultivo	44
V.1.3.1 Diluyente de peptona al 0.1%	44
V.1.3.2 Solución de ampicilina trihidratada	45
V.1.3.3 Solución de rosa de bengala	45
V.1.3.4 Solución de ácido tartárico	45
V.1.3.5 Solución de piramicina o natamicina	45
V.1.3.6 Solución de L- cisteína- HCl	45
V.1.3.7 Solución de Cloruro de Litio	45
V.1.3.8 Solución de hidróxido de sodio al 50%	46

V.1.3.9	Ácido bórico al 1% con indicadores	46
V.1.3.10	Ácido clorhídrico 0.1 N	46
V.1.3.11	Medio para <i>Lactobacillus acidophilus</i>	46
V.1.3.12	Medio para Bifidobacteria	46
V.1.3.13	Medio agar papa dextrosa	47
V.1.3.14	Caldo Lauril Triptosa	47
V.1.3.15	Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante	47
V.1.3.16	Solución cristal violeta	48
V.1.3.17	Solución de yodo	48
V.1.3.18	Solución de safranina	48
V.1.3.19	Solución alcohol - acetona	48
V.2	Métodos	48
V.2.1	Producción de Queso	48
V.2.1.1	Elaboración de queso Panela	48
V.2.1.2	Elaboración de queso Oaxaca	49
V.2.2.	Análisis fisicoquímicos	51
V.2.2.1	Determinación de humedad	51
V.2.2.2	Determinación de actividad de agua	53
V.2.2.3	Medición de pH	53
V.2.3	Análisis proximales	53
V.2.3.1	Determinación de grasa	53
V.2.3.2	Determinación de proteína	54
V.2.3.3	Cuantificación de azúcares	55
V.2.4	Recuento de microorganismos	55
V.2.4.1	Recuento de hongos y levaduras	56
V.2.4.2	Determinación de coliformes fecales	56
V.2.4.3	Recuento de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	57
V.2.4.4	Recuento de <i>Bifidobacterium lactis</i>	57
V.2.5	Identificación de cepas probióticas	57
V.2.5.1	Fermentación de azúcares	57

V.2.5.2 Tinción Gram	59
V.2.6. Análisis sensorial	60
V.2.7. Diagramas de análisis experimental	61
VI. RESULTADOS	63
VI.1 Elaboración de queso Panela y Oaxaca	63
VI.2 Análisis fisicoquímicos	69
VI.3 Análisis proximal	71
VI.4 Recuento de microorganismos	72
VI.4.1 Análisis microbiológicos de grupos indicadores: Panela y Oaxaca	72
VI.4.2 Análisis microbiológicos de cepas probióticas en queso Panela	73
VI.4.3 Análisis microbiológicos de cepas probióticas en queso Oaxaca	75
VI.5 Identificación de cepas probióticas	77
VI.6 Análisis sensorial	81
VI.6.1 Análisis sensorial del queso Panela	82
VI.6.2 Análisis sensorial del queso Oaxaca	83
VII. DISCUSIÓN	88
VII.1 Elaboración de queso Panela y Oaxaca	88
VII.2 Análisis fisicoquímicos	89
VII.3 Análisis proximal	90
VII.4 Recuento de microorganismos	92
VII.4.1 Análisis microbiológicos de grupos indicadores: Panela y Oaxaca	92
VII.4.2 Análisis microbiológicos de cepas probióticas en queso Panela	93
VII.4.3 Análisis microbiológicos de cepas probióticas en queso Oaxaca	94
VII.5 Identificación de cepas probióticas	95

VII.6 Análisis sensorial	96
VII.6.1 Análisis sensorial queso Panela	96
VII.6.2 Análisis sensorial queso Oaxaca	97
VIII. CONCLUSIONES	99
IX. BIBLIOGRAFÍA	101
X. ANEXOS	112

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Actividades de probióticos o productos que contengan probióticos, que pueden tener un efecto en la disminución de riesgo de cáncer	11
2	Lista parcial de cepas probióticas caracterizadas, reportadas por el fabricante (adaptado de Yeung y col., 1999)	16
3	Bacterias probióticas con denominación FOSHU y productos que incluyen estas bacterias (Adaptado de Sanders y Huis in't Veld, 1999)	17
4	Diferentes variedades de quesos adicionados de probióticos reportados (adaptado de Escobar, 2008)	20
5	Composición en peso de leche de algunos mamíferos (Fox y col., 2000)	24
6	Contenido de vitaminas y minerales en leche cruda de vaca (Adaptado de Santos, 1996). Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas con las que debe	29
7	contar la leche empleada para la elaboración de quesos (Navarrete, 1990).	30
8	Porcentaje de rendimiento y costo de queso Oaxaca y Panela	69
9	Propiedades fisicoquímicas de queso Panela a lo largo del almacenamiento a 4° C al vacío por 30 d.	70
10	Propiedades fisicoquímicas de queso Oaxaca a lo largo del almacenamiento a 4° C al vacío por 30 d.	71
11	Composición de leche con la cual fue elaborado el queso Panela y Oaxaca respectivamente, así como la composición final de ambos quesos.	71
12	Medición de azúcares totales a los quesos Panela y Oaxaca	72
13	Evaluación de UFC/g de hongos, levaduras y coliformes	74

fecales en queso Oaxaca y Panela como estándar de calidad sanitaria

- | | | |
|----|---|----|
| 14 | Carbohidratos fermentados por cepas de <i>L. acidophilus</i> (Buchanan y Gibbons, 1974, Sneath y col., 1986). | 79 |
| 15 | Carbohidratos fermentados por cepas de <i>B. lactis</i> (Buchanan y Gibbons, 1974, Sneath y col., 1986). | 80 |
| 16 | Calificación otorgada por el panel evaluador al queso Panela a los 0 d. | 83 |
| 17 | Calificación otorgada por el panel evaluador al queso Oaxaca a los 0 y 15 d. | 85 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Síntesis de lactosa en la glándula mamaria (Fox y col., 2000)	25
2	Modelos de núcleo y corteza de la micela de caseína. A) Noble y Waugh, 1995. B) modelo de Payens 1996.	28
3	Producción de Queso Panela y Oaxaca en los últimos diez años en México (SAGARPA 2008)	38
4	Diagrama de flujo de la elaboración de queso Panela deslactosado añadido con probióticos	50
5	Diagrama de flujo de la elaboración del queso Oaxaca deslactosado añadido con probióticos	52
6	Diagrama de flujo de pruebas bioquímicas api 50 CH (Bio Merieux)	58
7	Elaboración de frotis microbiano	59
8	Diagrama de flujo que describe la tinción Gram	60
9	Elaboración y análisis de queso Panela	61
10	Elaboración y análisis de queso Oaxaca	62
11	Diagrama de la elaboración de queso Panela deslactosado añadido con cepas probióticas	63
12	Diagrama de la elaboración de queso Oaxaca deslactosado añadido con cepas probióticas	66
13	Evolución de la población de bacterias probióticas <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i> , en queso Panela durante treinta días de almacenamiento a 4 °C, empacados al vacío	74
14	Fotografías del análisis microbiológicos <i>L. acidophilus</i> y <i>B. lactis</i> respectivamente, tomadas a distintos tiempos durante los 30 d de almacén de queso Panela	75
15	Evolución de la población de bacterias probióticas <i>L.</i>	76

acidophilus y *B. lactis*, en queso Oaxaca durante treinta días de anaquel a 4 °C, empacados al vacío.

- | | | |
|----|---|----|
| 16 | Fotografías del análisis microbiológicos <i>L. acidophilus</i> y <i>B. lactis</i> respectivamente, tomadas a distintos tiempos durante los 30 d de almacén de queso Oaxaca | 77 |
| 17 | Fotografías tomadas a las 0 y 48 h de las pruebas api 50 CH realizada a <i>L. acidophilus</i> y <i>B. lactis</i> | 81 |
| 18 | Fotografías de tinción Gram realizada a ambas bacterias probióticas | 82 |
| 19 | Calificaciones asignadas por los consumidores a las características evaluadas en el análisis sensorial al queso Panela deslactosado con bacterias probióticas <i>L. acidophilus</i> y <i>B. lactis</i> . | 84 |
| 20 | Calificaciones asignadas por los consumidores a las características evaluadas en el análisis sensorial realizado al queso Oaxaca deslactosado con bacterias probióticas <i>L. acidophilus</i> y <i>B. lactis</i> a los 0 d | 85 |
| 21 | Calificaciones asignadas por los consumidores a las características evaluadas en el análisis sensorial realizado al queso Oaxaca deslactosado con bacterias probióticas <i>L. acidophilus</i> y <i>B. lactis</i> a los 15 d | 86 |

RESUMEN

El queso es un alimento consumido por personas de todos los niveles socioeconómicos en México, siendo los tipos Panela y Oaxaca los de mayor popularidad. El objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad de cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en quesos deslactosados tipo Panela y Oaxaca empacados al vacío, durante un periodo de almacenamiento de 30 días a 4°C. Se realizó un recuento en placa para ambas bacterias probióticas, así como de hongos, levaduras y organismos coliformes fecales. Adicionalmente, se realizaron análisis de proteína, materia grasa y de azúcares totales, así como análisis fisicoquímicos de pH, actividad de agua y humedad. Se llevó a cabo un análisis sensorial de ambos quesos para conocer la aceptación del producto por el consumidor. Esto permitió determinar si este producto puede brindarse a la población como un alimento funcional además de ser sensorialmente aceptable. Las cepas probióticas adicionadas a ambos quesos deslactosados lograron sobrevivir 30 d a 4 °C; en queso Panela, donde la cuenta para *L. acidophilus* fue de 1.04×10^8 UFC/g, y para *B. lactis* 2.8×10^8 UFC/g. En queso Oaxaca la cuenta final para *L. acidophilus* fue 2.2×10^8 UFC/g y para *B. lactis* de 3×10^8 UFC/g por lo que pueden ser considerados como un alimento funcional. El análisis sensorial indicó que la adición de bacterias probióticas al queso Oaxaca y Panela no afecta el sabor, aroma y consistencia de los quesos, lo que resultó en una buena aceptación por los consumidores. Ambos quesos muestran un gran futuro en la industria alimentaria ya que representan un factor clave en la elección del consumidor, al conferir beneficios a la salud.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha impulsado una nueva alternativa de alimentos en el mercado nacional e internacional, los llamados funcionales que pueden contener organismos probióticos. Los probióticos son definidos como microorganismos vivos utilizados como ingredientes en los alimentos, que tienen un efecto benéfico en la salud de los humanos. El concepto de ingerir microorganismos vivos con el propósito de mejorar la salud intestinal y el bienestar general se remonta al principio del siglo XX, surgiendo de la hipótesis propuesta por Metchnikoff; quien sugirió que la vida sana y larga de los campesinos búlgaros era el resultado del consumo de leche fermentada. Los productos lácteos proveen a las bacterias probióticas un ambiente adecuado que promueve su viabilidad y desarrollo.

Aunque numerosos géneros de bacterias (y levaduras) son actualmente comercializadas como probióticos a nivel mundial, los dos más comúnmente utilizados son los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los beneficios que se les asocian a las bacterias probióticas son muy diversos, desde prevención de diarrea a reducción del colesterol.

Se ha sugerido que los quesos son un medio más adecuado para contener probióticos que los productos lácteos fermentados, ya que presentan un pH y contenido de grasa mayor; además, la matriz sólida del queso puede proteger de manera más eficiente que un medio fluido debido a la menor cantidad de oxígeno y menor exposición del microorganismo a ambientes adversos; todo esto durante el almacenamiento del alimento y su tránsito a través del cuerpo humano. Además de la protección que confieren las propiedades del queso antes mencionadas a los microorganismos probióticos, el queso es de amplio consumo a nivel nacional, sobre todo el queso fresco.

Si bien los productos lácteos, como el queso, son un buen vehículo para hacer llegar a la población las bacterias probióticas, existe una parte de esta que no

puede tener acceso a sus beneficios, como es el caso de los individuos intolerantes a la lactosa, por lo que en este trabajo se propone el estudio de quesos deslactosados que contengan bacterias probióticas, con el fin de que toda la población tenga acceso a los beneficios de los alimentos funcionales, una vez determinadas dichas propiedades.

II. ANTECEDENTES

II.1 Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales según Mollet y Rowland (2002), se definen como "alimentos susceptibles de producir un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, de mejorar el estado de salud y de bienestar y/o de reducir el riesgo de una enfermedad". Estos productos alimenticios además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo.

Los productos lácteos son reconocidos como alimentos ideales para la liberación de microorganismos probióticos al intestino humano. Estos proveen un ambiente adecuado que promueve la viabilidad y el crecimiento de bacterias probióticas (Taranto y Médici, 2005).

Lilly y Stillwell (1965), introdujeron el término "probióticos" para factores promotores del crecimiento producidos por microorganismos. La palabra probióticos es derivado del griego *pro*, para, y *biosis*, vida, por lo que significa "para la vida". Parker (1974) usó el término "sustancias y organismos" para indicar que proveen efectos benéficos en animales, influenciando su microflora intestinal. Posteriormente, Fuller en 1989 definió "probióticos" como un suplemento alimenticio con microorganismos vivos que afecta de manera benéfica al huésped mejorando el balance microbiano intestinal. Según la FAO (2006), los probióticos se definen como: "microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas".

El concepto de alimentos funcionales tiene su origen en una mayor comprensión de las bases moleculares de la relación existente entre alimentación y salud, y la posibilidad de contar con reguladores biológicos, donde las bacterias ácido lácticas

juegan un papel protagónico, dando como resultado una disminución en el riesgo de contraer enfermedades (Taranto y Médici, 2005).

II.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL son bacterias Gram-positivas, no esporuladas, catalasa negativas, fermentadoras de carbohidratos, con producción de ácido láctico, tolerantes a los ácidos (capaces de desarrollar a pH relativamente bajo), y anaerobias facultativas o microaerófilas (Axxelson, 1998). Todas estas cualidades con excepción de la Gram positividad, puede mostrar algunas excepciones dependiendo de la cepa y de su adaptación a diferentes condiciones ambientales, lo cual permite su utilización con variedad de propósitos.

Existen 12 géneros de BAL, que incluyen *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (Jay, 2000).

De acuerdo a diversas características bioquímicas pudiéndose distinguir dos grupos: homofermentativas, que convierten la glucosa en ácido láctico únicamente, y las heterofermentativas, que transforman la glucosa en ácidos láctico, fórmico, acético y succínico, etanol, y CO₂ (Sharpe y col., 1996). La generación de ácido láctico resulta en general incompatible con la actividad, y en ocasiones la sobrevivencia, de microorganismos patógenos. Los mecanismos de la inhibición microbiana por las BAL no se limitan a este factor; existen otros metabolitos producidos en menor proporción como diacetilo, ácido piroglutámico, reuterina, peptidoglucano hidrolasas y peróxido de hidrógeno el cual tiene un elevado efecto bactericida debido a su fuerte poder oxidante (Axxelson, 1998). Algunas BAL producen también un grupo de compuestos peptídicos conocido como bacteriocinas que funcionan como antibióticos naturales, inhibiendo a los microorganismos no deseados, tal como algunos deterioradores y patógenos de alimentos (Davidson y Hoover, 1993).

Las BAL consideradas como probióticas más comúnmente estudiadas incluyen a los géneros de *Lactobacilli* y *Bifidobacterium* (McFarland y col., 1994).

II.3 *Lactobacilli*

Se han reportado efectos benéficos de *Lactobacillus* en el tracto gastrointestinal: producción de algunos de los metabolitos ya mencionados, incluyendo los ácidos orgánicos; mantenimiento de un bajo potencial de óxido-reducción; antagonismo contra bacterias indeseables a través de la competencia de nutrientes, y su capacidad para degradar nitrosaminas, sustancias de reconocido efecto cancerígeno (Sandine, 1979). También se ha reportado que este género de microorganismos probióticos puede asimilar la molécula de colesterol, lo que reduce los niveles de colesterol sérico (Gilliland y Nelson, 1985).

Se ha confirmado que los alimentos fermentados que contienen BAL se conservan de una manera adecuada por el efecto que las BAL imparten al convertir los azúcares en ácidos orgánicos. La reducción del pH y la remoción de gran cantidad de carbohidratos por la fermentación, son las primeras acciones de preservación que estas bacterias proveen a los alimentos fermentados. La fermentación tiene como propósito introducir cambios muy específicos en aroma y textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad e incluso el aspecto de los alimentos (Fernández, 1981).

La temperatura óptima de crecimiento para *Lactobacillus acidophilus* es entre 35 y 38 °C, puede crecer a 48 °C y se puede inhibir su crecimiento a temperaturas inferiores a 22 °C. El pH de crecimiento inicial se encuentra entre 5 y 7, sin embargo el óptimo se sitúa entre 5.5 y 6.

Las colonias son usualmente ásperas, débilmente fermentadoras de glucógeno, y algunas cepas fermentan melibiosa, rafinosa, o ambas. Son homofermentativas y generalmente no hay más de 10% de otros productos como resultado de la

fermentación de otros carbohidratos. Su poder de acidificación de la leche es variable, en el rango de 0.3-1.9% de ácido láctico. Originalmente aisladas de heces de infantes, también fue aislada de la boca y vagina de humanos jóvenes y adultas, del tracto intestinal de gallinas y pavos, y de la boca y tracto intestinal de ratas y hamsters (Buchanan y Gibbson, 1974).

II.4 Bifidobacterias

Las bifidobacterias son la microflora predominante en el intestino de lactantes y constituyen una especie importante de la microflora humana del colon durante todo el ciclo de vida, y se asocian a un estado saludable en humanos. Éstas representan alrededor del 95% en el intestino de lactantes y constituyen hasta 25% de la población total, en un colon adulto. En general son bacilos Gram-positivos, no forman esporas y no presentan movilidad. Son clasificadas como anaerobias estrictas, que frecuentemente tienen necesidades nutricionales especiales y crecen lentamente en la leche.

Muy pocas cepas se han adaptado lo suficientemente bien a la leche y pueden crecer en números suficientes como para sobrevivir durante la vida de anaquel de las leches fermentadas (Diplock y col., 1999). Juegan un papel importante en el mantenimiento de la salud del colon a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta (acético y láctico), en la actividad inmunológica, producción de enzimas digestivas y vitaminas del grupo B.

Varios factores influyen en la sobrevivencia y colonización de estas bacterias, incluyendo la resistencia a bajos pH, ácido de la bilis y enzimas digestivas. Se ha demostrado que las bifidobacterias sobreviven al paso del intestino grueso y alrededor del 29.7% de las células ingeridas pueden alcanzar el colon (Wang y Conway, 1999). Las bifidobacterias proveen resistencia a enteropatógenos, así como reducción del colesterol en suero, activación del sistema inmune, y actividad anticancerígena (Rasic y Kurmann, 1983).

El pH de crecimiento inicial óptimo se sitúa entre 6.5 y 7 pero es inhibido a pH menores de 5 o mayores de 8. La temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las especies de bifidobacterias de origen humano se sitúa entre 36 y 38°C, mientras que aquellas aisladas de especies animales tienen crecimiento óptimo a temperaturas ligeramente más altas (alrededor de 41 – 43 °C). No hay crecimiento debajo de 20°C y las bifidobacterias no presentan termorresistencia a temperaturas mayores a 46°C (Boylston y col., 2004).

Las colonias de *B. animalis* en placa incubadas anaeróbicamente son usualmente circulares, convexas, con una suave mucosidad en la superficie. Requiere nitrógeno orgánico, CO₂ y la presencia de carbohidratos fermentables para su crecimiento, originalmente este microorganismo fue aislado de las heces de lactantes (Buchanan y Gibbons, 1974).

La mencionada cepa se ha utilizado por varias compañías, y como técnica de mercadotecnia han renombrado la subespecie con diferentes nombres. Danone ha creado un estatus en el mercado con la cepa DN 173 010, la cual es conocida en el mercado como *Bifidus digestivum* (UK), *Bifidus regularis* (EUA y México), *Bifidobacterium Lactis* o B.L. regularis (Canadá), Dan Regularis (Brasil) y Bifidus Actiregularis (Argentina, Austria, Bulgaria, Chile, Alemania, Italia, Rusia y España). Científicamente, la cepa es identificada como *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* DN-173 010.

La compañía Christian Hansen tiene una cepa similar a la anterior, *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis*, cepa BB-12. Se comercializa indistintamente como *Bifidobacterium animalis* o como *Bifidobacterium lactis* (Masco, 2004). La Compañía sacco srl (Italia), distribuye una cepa similar a ésta, la cual se le denominará en lo sucesivo B. *lactis*.

II.5 Colonización del tracto gastrointestinal por BAL

El estudio de la implantación intestinal de las BAL ha sido difícil, especialmente de las cepas de *Lactobacillus*, debido a que la morfología de estos organismos es virtualmente idéntica a los lactobacilos de la microflora normal del intestino. La presencia de las cepas administradas puede ser solo identificada por el incremento en el recuento fecal de estos microorganismos (Goldin y col.1992).

En un estudio reportado por Paul y Hoskins (1972), se utilizó una preparación en polvo de *L. acidophilus*, observándose que solo la mitad de los voluntarios tuvieron una cuenta fecal moderadamente elevada de lactobacilos durante la fase de administración y estos niveles disminuyeron rápidamente.

Lidbeck y col. (1987) estudiaron el efecto de una leche fermentada comercial que contenía *L. acidophilus* NDCO 1748 administrando 500 mL (10^8 - 4×10^9 UFC) del producto diariamente a los voluntarios. Las cuentas de lactobacilos se incrementaron significativamente, lo cual fue observado en el cuarto día después de la administración, y las cuentas se mantuvieron altas hasta nueve días después de que se detuvo la administración del producto. Se observó que la administración de 500 mL de la leche fermentada puede también incrementar los niveles de los lactobacilos endógenos al proveer sustrato para su desarrollo.

II.6 Estudios sobre la administración de BAL y la salud

Las bacterias probióticas pueden paliar los efectos de algunas enfermedades a través de numerosos mecanismos propuestos. Algunos estudios controlados con placebo llevados a cabo con un número significativo de seres humanos han dado suficientes resultados positivos para justificar una investigación más a fondo de la hipótesis de probióticos. El alivio de síntomas de intolerancia a la lactosa y tratamientos anti-diarreicos son los efectos mejor fundamentados. Los efectos contra el cáncer y el sistema inmune son alentadores, pero deben ser estudiados

más ampliamente en el ser humano (Aso y Alazan, 1992; McFarland y col., 1994; Saavedra y col., 1994). Una breve evaluación de los efectos de probióticos utilizando varios criterios de valoración con énfasis en los resultados de estudios en humanos, cuando es posible, se indica a continuación.

II.6.1 Efecto de los probióticos en el sistema inmune

El tracto gastrointestinal forma parte del sistema digestivo, siendo importante en el individuo como defensa contra microorganismos patógenos y como supresor de la actividad de antígenos de los alimentos, incluyendo agentes cancerígenos. La microflora intestinal tiene una gran influencia en el estado inmunológico del individuo. Los microorganismos de la microflora, o sus antígenos pueden penetrar la barrera epitelial del intestino, lo cual estimula las células inmuno-competentes (Havenaar y Huis in't Veld, 1999). Berg (1983), introdujo el término "translocación" para el paso de bacterias viables del tracto gastrointestinal a los ganglios linfáticos mesentéricos y posiblemente otros órganos. Este es un mecanismo por el cual los patógenos potenciales pueden causar enfermedad asociada al microorganismo patógeno que haya sido capaz de introducirse en el tracto gastrointestinal. La flora normal del intestino como *Lactobacillus* puede translocar y sobrevivir por varios días en el bazo u otros sitios y estimular la actividad fagocítica (Ma y col., 1990). Se ha demostrado que la translocación de patógenos puede ser alterada con agentes que modulen las funciones inmunes como la fagocitosis, proponiéndose que los probióticos pueden actuar de esta manera.

El mecanismo de los probióticos en la respuesta inmune es el siguiente: las BAL o los productos fermentados inducen cambios en la microflora intestinal, lo que produce exitosamente cambios en la respuesta inmune. Esto sugiere que los probióticos no solo poseen potencial para afectar el balance de la microflora intestinal sino también pueden influir indirectamente en la ocurrencia de enfermedades en los tejidos alejados del canal intestinal (Havenaar y Huis in't Veld, 1999).

II.6.2 Supresión de la aparición de tumores

Algunos estudios han demostrado que varios compuestos podrían incrementar o disminuir la incidencia de cáncer, como en el Cuadro 1 se observa existe gran evidencia de que las bacterias probióticas pueden ser un constituyente de la dieta que reduzca el riesgo de cáncer. Un estudio demostró que la preparación en polvo de *L. casei* (10^{10} UFC tres veces al día por un año) produjo un decremento significativo (47.5%) de la mutagenicidad fecal (Aso y Alazan., 1992).

Algunas cepas de bifidobacterias han estado asociadas con actividades anticarcinogénicas, antimutagénicas y antitumorales. El mecanismo sugerido para esta afirmación es convincente, pero no existe una evidencia real directa en humanos que soporte esta propuesta. Sin embargo, algunos estudios en animales apoyan el papel de bifidobacterias y algunos lactobacilos en la supresión de tumorigénesis. En un estudio de ratas alimentadas con *B. longum* se redujo la carcinogénesis de un mutágeno alimentario, 2-amino3metilimidazol [4,5-f] quinolina (Reddy y Riverson, 1993). En otro estudio, una cepa de *B. longum* fue encontrado como supresor de azometano inductor de cáncer de colon en ratas (Singh y col., 1993). Ciertas cepas de lactobacilos han mostrado también suprimir significativamente tumores intestinales causados por mutágenos químicos en ratas (Marteau y Rambaud, 1993).

Las actividades anticarcinogénicas, antitumorales y antimutagénicas de estas bacterias probióticas pueden ocurrir mediante modificaciones de algunos mutágenos *in vitro*, reducción de la generación de enzimas fecales *in vivo*, y supresión de lesiones pre-cancerosas o formación de tumores (O'Sullivan, 2001). Los resultados observados sugieren que las bacterias probióticas son capaces de contrarrestar los efectos mutagénicos y genotóxicos en el colon y en otros órganos. Otros estudios sugieren que las bacterias probióticas o sus bioproductos tienen influencia en la cinética de crecimiento de las células epiteliales en el colon, disminuyendo la proliferación de células cancerígenas (Sanders, 1999).

Cuadro 1. Actividades de probióticos o productos que contengan probióticos, que pueden tener un efecto en la disminución de riesgo de cáncer.

Actividad suprimida	Referencia
Crecimiento de células y diferenciación de cultivo de tejidos de células	Bariacult y col., 1995
Fosas crípticas aberrantes en tejidos del colon de animales	Rowland y col., 1998; Rao y col., 1999
Tumores en ratones (Colon, hígado, mamaria)	Adachi, 1992; Reddy y Rivenson, 1993; Goldin y col., 1993
Reparación superficial de cáncer de vejiga en humanos	McConnell y Tannock, 1993; Ling y col., 1994
Actividades enzimáticas (nitroso reductasa, β -glucuronidasa, azoreductasa, 7- α -dehidroxilasa, hidrolasa de ácido glicólico) involucradas en la conversión de procarcinógenos a agentes carcinógenos en las heces de animales de laboratorio y de humanos; no todos los parámetros influenciaron de manera positiva en todos los estudios.	Renner y Munzner, 1991
Actividad mutagénica	Renner y Munzner, 1991
Genotoxicidad	Venturi y col., 1997

Es necesario un estudio más exhaustivo para comprender estos efectos en humanos y elucidar los papeles que juegan cepas específicas de bacterias probióticas, así como los productos metabólicos y enzimáticos (O'Sullivan, 2001).

II.6.3 Reducción de síntomas gastrointestinales en individuos intolerantes a la lactosa.

La intolerancia a la lactosa es causada por la deficiencia de la enzima β -galactosidasa (lactasa) en las microvellosidades intestinales, resultando en la inhabilidad para digerir el disacárido lactosa. Esta deficiencia se puede adquirir como resultado de radioterapia, o puede resultar después de una infección intestinal como el rotavirus, que está asociada con la destrucción de las células de las microvellosidades intestinales productoras de lactasa. La prevalencia congénita de intolerancia a la lactosa depende del origen étnico, del 70 a 90% de la población de Japón, China, África, Australia y América Latina y es menos común en países del norte de Europa y América.

Savaiano y col. (1984), reportaron que el yogurt conteniendo células viables es más efectivo que el pasteurizado, para mejorar la digestión de la lactosa en individuos intolerantes a ésta, debido a que la pasteurización reduce las cuentas bacterianas, además de disminuir los niveles de lactasa bacteriana.

Dichos autores sugieren que la diferencia radica en que los microorganismos presentes en el yogurt viable producen y liberan lactasa, contribuyendo a mejorar la absorción de lactosa. No obstante, debe notarse que los niveles de lactosa son reducidos por la fermentación de la leche. Se ha reportado que 240 mL de leche entera puede tener de 9 a 12 g de lactosa, mientras que 240 mL de leche fermentada la cantidad de lactosa es de 11g (Scrimshaw y Murray, 1988).

II.6.4 Efecto de los probióticos sobre el colesterol

El alto nivel de colesterol sérico es considerado un factor de alto riesgo para enfermedades del corazón. Los productos fermentados pueden disminuir la concentración de colesterol en el suero, reduciendo la absorción intestinal del colesterol proveniente de la dieta (Havenaar y Huis in't Veld, 1999).

Gilliand y Nelson (1985), realizaron un estudio con cerdos alimentados con una dieta rica en colesterol, para inducir el aumento de los niveles séricos del mismo. Cuando los cerdos se alimentaron simultáneamente con una cepa específica de *L. acidophilus*, el aumento del colesterol fue inhibido. Estudios *in vitro* mostraron que estas cepas asimilan ciertas cantidades de colesterol del medio de cultivo, por lo que los autores sugieren que los organismos se unen al colesterol en el lumen intestinal, reduciendo su absorción hacia el sistema circulatorio.

II.6.5 Efecto antialérgico de leches fermentadas con bacterias lácticas

Los métodos modernos de higiene y sanitización han disminuido el contacto de los niños con ciertos microorganismos (Kim y col., 2006). Niños que contraen alguna alergia durante los primeros 2 años de vida han mostrado una microflora intestinal menor incluyendo bacterias lácticas comparada a la de infantes sanos (Bjorksten y col., 2001).

La microflora intestinal es un constituyente importante de la mucosa intestinal, que funciona como barrera contra alérgenos de fuentes alimenticias (von de Weid y col., 2002). El consumo a largo plazo de yogurt y otros alimentos que contengan BAL puede aliviar algunos síntomas de las alergias, rinitis atópica, alergias nasales en adultos y disminuir los niveles de Inmunoglobulina E (IgE) en suero (Halpern y col., 1991; Trapp y col., 1993; ven de Water y col., 1999). La hipótesis más ampliamente aceptada es que las BAL presentes en los alimentos, son capaces de promover una desviación de los fenotipos alérgicos por la vía de inmunomodulación 12. De acuerdo al estudio de Fang y col. (2000) el efecto inmunomodulatorio de los probióticos depende de la cepa y las características del huésped. Se ha reportado que la leche fermentada con bacterias probióticas como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Bifidobacterium longum*, tiene efectos antialérgicos *in vivo*, disminuyendo los niveles de IgE en el suero (Peng y col., 2007).

II.6.6 Prevención y tratamiento de diarrea

Es ampliamente aceptado que la microflora normal del intestino tiene un papel protector contra patógenos entéricos. Tissier en 1906 reportó por primera vez que la ingestión de bifidobacterias vivas puede ser utilizada como remedio contra la diarrea en niños. Además, el empleo de bacterias probióticas para usos profilácticos y clínicos contra infecciones gastrointestinales es un concepto válido. Las bifidobacterias han sido utilizadas exitosamente como tratamiento de desórdenes intestinales y como prevención para la diarrea rotaviral en niños.

Algunos estudios también apoyan el uso de cepas de *Lactobacillus* especialmente *L. rhamnosus* GG, para la prevención de diarrea en niños (Saavedra y col., 1994; Guandalini y col., 2000) Malestares gastrointestinales asociados a antibióticos son un problema bien reconocido; Black y col. (1991), observaron que la administración de *B. longum* en mezcla con *L. acidophilus*, disminuyó la incidencia de diarrea asociada con la ampicilina y el tiempo requerido para la recolonización. Además Colombel y col. (1987), han observado un rápido alivio en los efectos adversos, particularmente diarrea, del tratamiento con eritromicina al administrar yogurt conteniendo *B. longum* y *L. rhamnosus* GG.

II.7 Alimentos probióticos

Los productos lácteos fermentados han sido utilizados como medio para reintroducir una población viable de microorganismos probióticos en el tracto gastrointestinal de niños y adultos (Hoover, 1993). Estos productos son más digestibles para individuos intolerantes a la lactosa, porque disminuyen la concentración de ésta en el alimento, además de que puede haber trazas de la β -galactosidasa derivada del metabolismo microbiano (Savaiano y col., 1987). Diversos estudios han demostrado la contribución de *Lactobacilli* y *Bifidobacterium* en el mejoramiento de la intolerancia a la lactosa (Jiang y col., 1996). Algunas de

las cepas probióticas han sido identificadas, estudiadas, y comercializadas, como se muestra en el Cuadro 2.

Para ejercer una influencia positiva, los productos lácteos fermentados deben cumplir con ciertas características: el microorganismo utilizado debe ser un género de la flora normal del intestino que pueda sobrevivir el paso a través del tracto digestivo superior, debe ser metabólicamente activo para producir efectos benéficos y debe permanecer viable desde el transporte del producto hasta el consumo del mismo (Hyung, 1988).

Los productos fermentados deben contener $\geq 10^6$ UFC/mL de los agentes probióticos, para ser efectivo y debe ser consumido regularmente (Kumn, 1988), o bien, se debe consumir ≥ 100 g/día de producto con 10^5 a 10^6 UFC/mL (Guyton, 1990). Los productos lácteos más populares para liberar una población viable de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, son leche fluida, leche con cultivos, mantequilla con cultivos y preparaciones en polvo (Hoover, 1993; Ishibashi y Shimamam, 1993). Se ha observado una ventaja en la relación simbiótica o sinérgica entre *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en el desarrollo de nuevos productos (Driessen y Boer, 1989; Hyung, 1988).

II.8 Legislación sobre probióticos

En Japón existe una regulación legal para alimentos funcionales desde 1991; y fue la primera nación en aceptar formalmente el concepto de alimento funcional. El Ministerio de Salud y Bienestar utilizó un etiquetado para "alimentos de uso específico para la salud" los denominados FOSHU (Foods for Specified Health Use, por sus siglas en Inglés)

Un producto FOSHU que ha sido aprobado por el Ministerio de Salud y Bienestar, ha demostrado ser efectivo en el mantenimiento y la mejora de la salud.

Cuadro 2. Lista parcial de cepas probióticas caracterizadas, reportadas por el fabricante (adaptado de Yeung y col., 1999)

Cepa	Compañía
<i>L. acidophilus</i> NCFM®	Rhodia (Madison, Wis.)
<i>L. acidophilus</i> DDS-1	Nebraska Cultures (Lincoln, NE, EUA)
<i>L. acidophilus</i> SBT-2062	Chr. Hansen, Inc. (Milwaukee, WI, EUA)
<i>L. acidophilus</i> LA-1	Yakult (Tokio, Japón)
<i>L. casei</i> Shirota, <i>Lactobacillus acidophilus</i> SBT-2062 and <i>Bifidobacterium longum</i> SBT-2928	Snow Brand Milk Products (Tokio, Japón)
<i>L. casei</i> Immunitas	Danone (París, Francia)
<i>L. casei</i>	Chr. Hansen (Milwaukee, WI, EUA)
<i>L. fermentum</i> RC-14	Urex Biotech (Londres, Ontario, Canada)
<i>L. johnsonii</i> LA1	Néstle (Lausana, Suiza)
<i>L. rhamnosus</i> 271	Probi AB (Lund, Suecia)
<i>B. lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen, Inc. (Milwaukee, Wis.)
<i>B. longum</i> BB536	Morinaga Milk Industry Co., (Tokio, Japón)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Productos lácteos Valio (Finlandia)
<i>Lactobacillus reuteri</i> SD2112	BioGaia, Raleigh (Carolina del Norte, EUA)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	<i>Probi</i> , (Lund, Suecia)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 271	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 y <i>Lactobacillus fermentum</i> RC-14	<i>Urex Biotech</i> (Londres, Ontario, Canada)
<i>Lactobacillus paracasei</i> DN014 001	<i>Danone</i> (Le Plessis Robinson, Francia)
<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Biocodex</i> (Seattle, WA, USA)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038	<i>Meiji Milk Products</i> (Tokio, Japón)
<i>Streptococcus thermophilus</i> 1131	
<i>B. breve</i> cepa Yakult	Yakult (Tokio, Japón)
<i>L. casei</i> Shirota	

En el Cuadro 3 se muestra una tabla con cepas probióticas denominadas como FOSHU y los productos que las incluyen.

Cuadro 3. Bacterias probióticas con denominación FOSHU y productos que incluyen estas bacterias (Adaptado de Sanders y Huis in't Veld, 1999)

Cepa probiotica con denominación FOSHU	Producto que incluye la cepa	Compañía
<i>L. rhamnosus</i> GG	ONAKA-HE-GG (Yogurt para beber)	Takanashi milk products
<i>B. longum</i> BB536	Bifidus yogurt natural	Morinaga milk industries
<i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	Yogurt Bulgaria Meji LB81 Meiji Bulgaria nomu 17yogurt LB81 natural	Meiji milk product
<i>L. acidophilus</i> SBT-2062	Yukijirushi Nachure	Snowbrand milk products
<i>B. longum</i> SBT-2928	(yogurt)	
<i>L. casei</i> Shirota	Leche fermentada 3 variantess Joie (leche fermentada), 8 sabores	Yakult Honsha
<i>B. breve</i> strain Yakult	Mil Mil Mil Mil E	Yakult Honsha
<i>B. animalis</i> subs. <i>Animalis</i> DN 173010	Activia	Danone

En Estados Unidos de América, solo existe mención de *L. acidophilus* como bacteria probiótica, la que es clasificada como GRAS, pero solo para uso como un

ingrediente opcional en el cultivo de leches, crema agria, queso cottage y como cultivo iniciador o adjunto en yogurt.

En Europa no existe una legislación específica acerca de alimentos con beneficio a la salud, el foco de atención es sobre seguridad y alimentos genuinos, que se apeguen a lo mostrado en la etiqueta. No existe una categoría para alimentos funcionales o alimentos en la frontera entre medicina y alimento; no se permite declarar "reducción de enfermedades" en los productos alimenticios (Sanders y Huis in't Veld, 1999).

II.9 Queso como fuente de probióticos

En años recientes, se ha sugerido que los quesos son un medio más adecuado para contener probióticos que los productos lácteos fermentados. Al presentar un pH y un contenido de grasa mayor, además la matriz sólida del queso pueden proteger a los probióticos de manera más eficiente que un medio fluido (productos fermentados), durante el almacenamiento del alimento y su tránsito a través del cuerpo humano (Stanton y col., 1998).

El efecto que ejercen los factores antes mencionados sobre los microorganismos es menos agresivo en el queso. El pH del mismo es mayor (4.8 - 5.6), que el que presentan las leches fermentadas o el yogurt (3.7 - 4.3), creando un ambiente más favorable para la sobrevivencia de probióticos a lo largo del tránsito gastrointestinal.

Asimismo, el queso tiene una mayor capacidad amortiguadora que el yogurt, ya que la adición de 5 g de queso en 10 mL de jugo gástrico incrementó el pH de 2 a 4.74, mientras que 5 mL de yogurt incrementaron el pH a solo 3.65 (Gardiner y col., 1999a).

Por otro lado, la matriz del queso es más compacta lo que hace que exista una mayor exclusión de oxígeno, generando una atmósfera anaerobia, lo que beneficia

la sobrevivencia de bifidobacterias y otros microorganismos anaerobios, debido a su recubrimiento por la grasa láctea; esto favorecerá la mayor resistencia y sobrevivencia de los microorganismos, durante el almacenamiento y tránsito intestinal. (Stanton y col., 1998; Vinderola y col., 2002). Un prerrequisito del queso adicionado de probióticos es la sobrevivencia de los cultivos durante la maduración o almacenamiento, factor que debe tenerse en cuenta al seleccionar las cepas probióticas que serán adicionadas al queso (Tamime y col., 2005).

Se han reportado algunos estudios utilizando bacterias probióticas como cultivos adjuntos en la producción de quesos. En el Cuadro 4 se presentan diferentes tipos de quesos usados como vehículos de probióticos.

Dinakar y Mistry (1994) utilizaron por primera vez al queso Cheddar, como vehículo para la incorporación de bifidobacterias. La viabilidad se mantuvo hasta un máximo de 24 semanas en aproximadamente 2×10^7 log UFC/g sin efectos adversos sobre el sabor del queso, textura y apariencia. Sin embargo, cuando *Bifidobacterium* fue usada en combinación con *L. acidophilus* como cultivo iniciador en queso Gouda, éste presentó un efecto negativo sobre el sabor del queso, después de nueve semanas de maduración, posiblemente debido a la producción de ácido acético por la bifidobacteria (Gomes y col., 1998).

Así mismo, otros estudios han demostrado el efecto protector del queso Cheddar comparado con el yogurt como alimento vehículo para proporcionar probióticos viables, tales como lactobacilos (Stanton y col., 1998) y enterococos (Gardiner y col., 1999b) al tracto gastrointestinal.

Blanchette y col. (1996) probaron en queso cottage a *B. infantis* la cual llegó a niveles de aproximadamente 10^7 UFC/g después de un día de almacenamiento aunque después de 15 días mantenido a 4°C se observó una pérdida de 3 log en la viabilidad.

Cuadro 4. Diferentes variedades de quesos adicionados de probióticos reportados
(adaptado de Escobar, 2008)

Variedad del queso	Cepa probiótica
Amarillo Búlgaro	<i>L. Paracasei</i> M3
Canestrato Pugilese	<i>B. bifidum</i> Bb02 <i>B. longnum</i> Bb46
Cheddar	<i>B. bifidum</i> ATCC 156696 <i>B. infantis</i> ATCC 27920G <i>B. lactis</i> Bb-12 <i>L. Paracasei</i> NFBC 338 <i>L. helveticus</i> I <i>E. faecium</i> PR88 <i>L. acidophilus</i> 4962 <i>L. casei</i> 279 <i>B. longum</i> 1941 <i>L. acidophilus</i> LAFTIL 10 <i>L. paracasei</i> LAFTIL26 <i>B. lactis</i> LAFTIB94
Cottage	<i>B. infantis</i> ATCC 27920G <i>L. rhamnosus</i> GG
Queso suave y fresco	<i>B. bifidum</i> B3 y B4 <i>L. acidophilus</i> A1 y A2 <i>L. plantarum</i> <i>L. Paracasei</i>
Gouda	<i>B. bifidum</i> (Bo) <i>L. acidophilus</i> Ki
Ras	<i>B. lactis</i> Bd-12 <i>L. acidophilus</i> La-5
Tallaga	<i>B. lactis</i> Bb-12 <i>L. acidophilus</i> La-5

Vinderola y col. (2000), reportaron en queso fresco que nueve diferentes combinaciones de *B. bifidum*, *L. acidophilus* y *L. casei* mostraron un decremento de un log en la viabilidad después de 60 días dentro de una solución de HCl, pH 2-3.

II.10 Intolerancia a la lactosa

La lactosa aunque es consumida como disacárido, no es utilizada por el cuerpo si no hasta que es hidrolizada por la acción de la enzima lactasa (β -D-galactosidasa) desdoblándose en glucosa y galactosa. Solo estos monosacáridos son utilizados como fuente de energía por el organismo.

La lactasa está presente en el tracto digestivo de muchos animales mamíferos, incluyendo los humanos, y normalmente presente en el intestino. Se ha reportado que no se encuentra en el tracto digestivo ni en las glándulas mamarias de las vacas y cabras.

La actividad de la lactasa es muy grande al nacer, pero después del destete se pierde cerca del 90%. Solo en la población donde son forzados a beber leche por largos periodos, la actividad de la enzima en el organismo, seguirá presente. En la etapa adulta, la disminución de la actividad enzimática, será evidente, particularmente después de los 40-50 años de edad.

Existe relación entre la falta de lactasa en el intestino delgado y la dificultad de algunas personas para digerir la leche. Esta dificultad puede diferir de la intolerancia, la cual puede surgir de reacciones alérgicas. La dificultad para absorber la lactosa, puede atribuirse a la lactosa no digerida que alcanza el colon. Aquí las bacterias forman ácido láctico que causa flatulencias, calambres o diarrea. Para promover el uso de productos lácteos por individuos intolerantes a la lactosa se ha hecho un esfuerzo por desarrollar productos bajos en lactosa. La tendencia en el mercado lácteo es a presentar productos de las mismas cualidades, sin modificar su composición pero con un bajo contenido de lactosa. Dichos productos

son conocidos comúnmente como “deslactosados”, “hidrolizados” ó de fácil digestión. Un ejemplo es la “leche deslactosada”, en tres diferentes modalidades: entera, descremada, semidescremada. La leche baja en grasa (1%) tiene un contenido de lactosa de 12 a 13%, mientras que la leche baja en grasa que ha sido hidrolizada tiene un porcentaje de lactosa de 3% (Scrimshaw y Murray, 1988).

Las preparaciones comerciales de lactasa se obtienen a partir de *Kluyveromyces lactis*, con la cual la leche no se ve afectada en sabor, acidez, o color, y se aumenta su dulzor. En la actualidad no sólo se limitan a leche fluida, sino que se busca ampliar el uso de la enzima lactasa a otros productos, como es el caso del yogurt y el queso. Estos alimentos podrán ser consumidos sin problema alguno por personas intolerantes a la lactosa (Lampert, 1975).

II.11 Quesos

La Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 define a los quesos como “un producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales”.

De acuerdo con la mencionada norma, los quesos pueden clasificarse en:

Madurados: quesos de pasta dura, semidura o blandos que sometidos a un proceso de maduración mediante la adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto de que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración.

Procesados: se caracterizan por ser elaborados con mezclas de quesos, fusión y emulsión con sales fundentes, aditivos para alimentos permitidos e ingredientes opcionales, sometidos a proceso térmico de 70 °C durante 30 segundos o someterse a cualquier otra combinación equivalente o mayor de tiempo y temperatura, lo que le permite prolongar su vida de anaquel.

Frescos: Se caracterizan por ser de alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, por lo que requieren condiciones de refrigeración.

Los quesos frescos, a su vez, pueden dividirse de acuerdo a Santos (1996), en:

- Quesos frescos de leche entera, descremada y semidescremada de vaca o de cabra, los más importantes son: Panela, Ranchero, Frescal y Sierra.
- Quesos frescos de leche entera y descremada de vaca o cabra y suero de leche, aquí encontramos el Ricotta, Blanco Latinoamericano e Impastata.
- Quesos frescos acidificados de leche entera de crema de vaca o cabra, entre los que se encuentran: Cottage, Neufchatel, queso crema y doble crema.
- Queso fresco de pasta cocida hilada, de leche entera o semidescremada de vaca o cabra, se distinguen los tipos: Mozzarella, Oaxaca, Asadero y Morral.

II.11.1 Composición de la leche

La Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003 define a la leche como:

El producto obtenido de la secreción de las glándulas mamarias de las vacas, sin calostro el cual debe ser sometido a tratamientos u otros procesos que garanticen

la inocuidad del producto; además de someterse a otras operaciones tales como clarificación, homogenización, estandarización u otras, siempre y cuando no contaminen al producto y cumpla con las especificaciones de su denominación.

La leche tiene la función de aportar los requerimientos nutricionales que un recién nacido necesite, por lo que provee de energía (principalmente de la grasa y azúcares), aminoácidos (de las proteínas) así como vitaminas y minerales. La composición de la leche cambia según del tipo de mamífero del cual provenga, el Cuadro 5 muestra los porcentajes (p/p) de la composición de leche de distintas mamíferos (Fox y col., 2000).

Cuadro 5. Composición en peso de leche de algunos mamíferos (Fox y col., 2000).

	Sólidos totales (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Lactosa (%)	Cenizas (%)
Humanos	12.2	3.8	1.0	7.0	0.2
Vaca	12.7	3.7	3.4	4.8	0.7
Cabra	12.3	4.5	2.9	4.1	0.8
Ovejas	19.3	7.4	4.5	4.8	1.0
Cerdo	18.8	6.8	4.8	5.5	-
Caballo	11.2	1.9	2.5	6.2	0.5
Burro	11.7	1.4	2.0	7.4	0.5
Renos	33.1	16.9	11.5	2.8	-
Conejo	32.8	18.3	11.9	2.1	1.8
Bisonte	14.6	3.5	4.5	5.1	0.8
Elefante	31.9	11.6	4.9	4.7	0.7
Oso polar	47.6	33.1	10.9	0.3	1.4
Foca	67.7	53.1	11.2	0.7	-

Carbohidratos. Se encuentran en la fase acuosa de la leche, unidos a las proteínas principalmente, entre ellos están la lactosa, polisacáridos, glucosaminas, etc.

La lactosa es un disacárido de galactosa y glucosa, es el componente más abundante, simple y constante en la leche, es poco soluble en agua, cristaliza muy rápido y tiene un débil sabor dulce, al hidrolizarla se aumenta su solubilidad, su poder edulcorante y el rendimiento quesero éste último debido a que la acidificación es más rápida, ya que los microorganismos metabolizan más fácilmente a los monosacáridos (galactosa y glucosa) que a los disacáridos (lactosa).

Su síntesis se lleva a cabo en la glándula mamaria a partir de glucosa sanguínea en donde una molécula de glucosa se convierte en UDP-galactosa mediante el uso de cuatro enzimas, el mecanismo se observa en la Figura 1. La UDP-galactosa se une a otra molécula de glucosa la reacción es catalizada por la enzima lactosa sintetasa, que esta compuesta de galactosil-transferasa y α -lactoalbumina, dando como producto la lactosa (Santos, 1996; Fox y col., 2000).

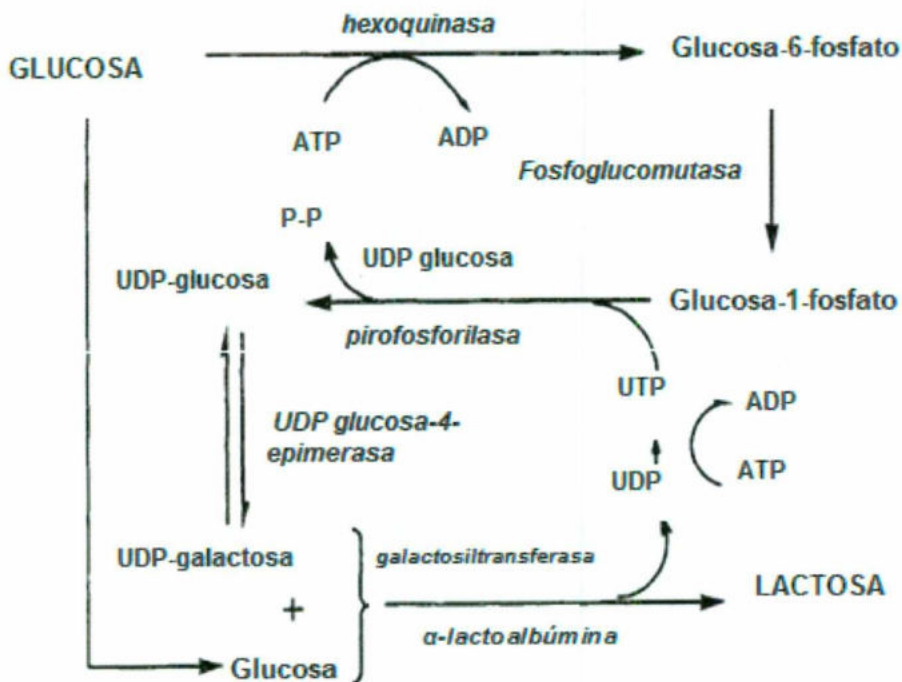


Figura 1. Síntesis de lactosa en la glándula mamaria (Fox y col., 2000)

La molécula de lactosa es el factor limitante en el volumen de producción de leche, ya que a mayor cantidad de lactosa mayor volumen de leche y viceversa. Es muy susceptible a la acción microbiana transformándose en ácido láctico y otros ácidos orgánicos; la concentración de lactosa en leche de vaca varía de 4.8 a 5 %.

Es estable al calor, mientras no se excedan los 100 °C ya que por encima de esta temperatura se favorecen las reacciones de Maillard. La lactosa constituye la parte esencial del extracto seco del suero lácteo (obtenidos como subproducto en la fabricación de queso), es por esto que lo encontramos siempre en la fase acuosa.

Lípidos. De la materia grasa de la leche los triglicéridos constituyen el 98% del total, los fosfolípidos entre el 0.5 y 1%, y las sustancias insaponificables, constituyen alrededor del 1%. Los lípidos se encuentran dispersos en la leche en forma de glóbulos, y debido a que son inestables, su extracción es fácil, son sintetizados en la glándula mamaria, a partir de ácidos grasos que se encuentran en la sangre. Este es el componente más variable en la leche, siendo durante mucho tiempo quien ha determinado su valor. En el Cuadro 5 es posible observar los porcentajes de grasa en leches de distintos mamíferos. El aire, las enzimas, particularmente la lipasa y los microorganismos, hidrolizan la grasa de la leche liberando ácidos grasos del complejo triglicérido (Warner, 1989; Santos, 1996; Alais, 1998).

Sustancias nitrogenadas. Constituyen la parte más compleja de la leche, las proteínas comprenden el 95% (p/v) del total de las sustancias nitrogenadas.

El contenido de proteína muestra grandes diferencias entre las distintas especies en el Cuadro 5 es posible apreciarlo.

La proteína en leche de vaca varía entre 3.32% y 3.92% (p/v), según el tipo de raza. Las sustancias proteicas de la leche pueden clasificarse en: caseínas y proteínas del suero lácteo.

- Caseína: se considera específica de la leche, es un complejo de proteínas fosforadas que flocculan en la leche a un pH 4.6 o cuando se encuentran bajo la

acción de enzimas específicas. Aproximadamente el 80 % de nitrógeno total de la leche de bovino, ovino, caprino y búfalo es caseína, pero la caseína constituye solo alrededor del 40 % de la proteína de leche humana.

Existen distintos tipos de caseínas:

La α_{s1} -caseína: no tiene cisteína y es muy sensible al calcio.

La α_{s2} -caseína es más hidrofílica, contiene cisteína y es fuertemente sensible al calcio.

La β -caseína es soluble en medios polares y no polares, tiene extremos hidrofóbicos.

La κ -caseína es una molécula en donde una parte está enriquecida en aminoácidos de cadena larga, mientras que otra es muy rica en carbohidratos unidos a la cadena hidrocarbonada, lo que hace que la primera parte sea hidrófoba y la segunda hidrófila.

Las micelas son agregados coloidales de caseínas individuales debido a diferentes distribuciones de cargas de su molécula y a su hidrofobicidad. Su tamaño varía entre 0.02 y 0.4 μm de diámetro, contienen entre 20 y 300 000 moléculas de caseína, se encuentran altamente hidratadas, el 93 % de su composición son proteínas α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína, contienen fosfato calcio coloidal, citrato sodio, magnesio y potasio.

La mayoría de los modelos estructurales indican que la κ -caseína se halla localizada mayoritariamente en la superficie de la micela, jugando un papel esencial en la regulación del tamaño micelar y en el mantenimiento de la suspensión de las caseínas en la leche. El primer modelo aceptado fue el de Noble y Waugh a mediados de 1960, la Figura 2 A muestra su estructura, los elementos esenciales de este modelo son una asociación hidrofóbica de caseínas α_s y β , estos agregados son cubiertos por una monocapa de κ -caseína. En 1966 surge el modelo de Payens (Figura 2 B) él propone que el núcleo de caseínas está constituido por moléculas densamente plegadas de α_s -caseínas y la superficie de la micela está cubierta de κ -caseínas y el fosfato de

calcio se encuentra tanto en la superficie como en el interior de la micela (Riel, 1991).

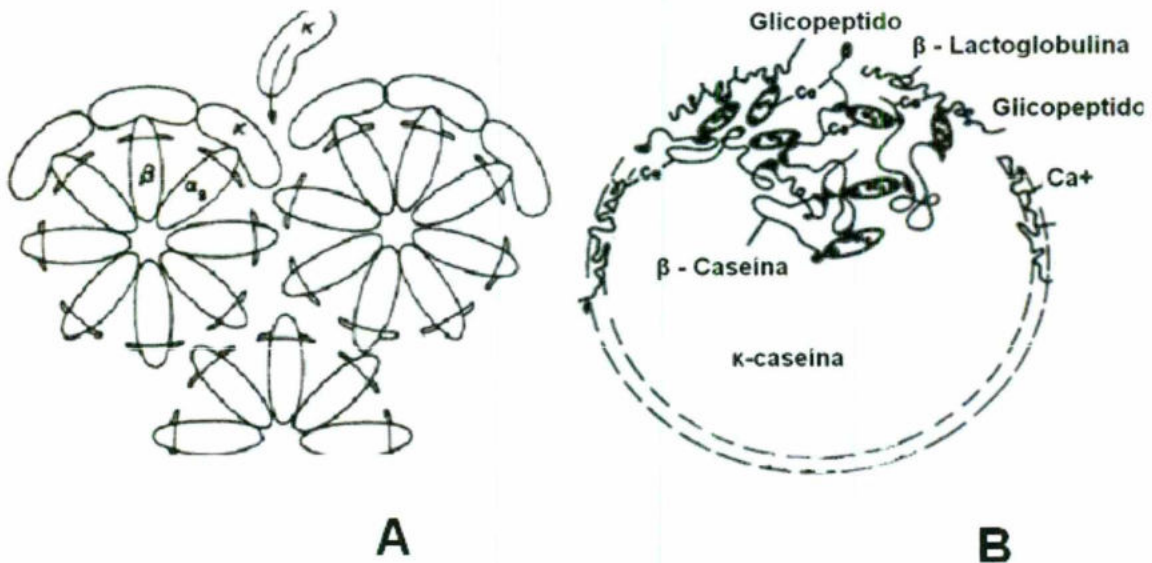


Figura 2. Modelos de núcleo y corteza de la micela de caseína. A) Noble y Waugh, 1965. B) modelo de Payens 1996.

- Proteínas del lactosuero: llamadas proteínas solubles de la leche, están constituidas por α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina de la sangre, inmunoglobulinas, estas no flocculan cuando el pH de la leche se lleva a 4.6, constituyen el 17% del total de las proteínas de la leche de vaca.

La ausencia de fósforo, el bajo contenido de prolina y la presencia de cisteína, cistina y metionina, hace que sean estables frente a la temperatura (Warner, 1989; Santos, 1996; Alais, 1998; Fox y col., 2000).

Minerales. Su concentración en leche de mamíferos varía de 3 a 10 g/L, siendo el fósforo y magnesio los más importantes.

Vitaminas. Su concentración en leche es muy pequeña, pero completa en cuanto a variedad. Siendo una buena fuente de vitamina A, B₁ y B₂, contiene también pequeñas porciones de ácido sórbico, vitamina C y niacina. También se

encuentran, aunque en menor concentración, las vitaminas liposolubles A, D, E y K, por lo que las encontramos en aquellos productos lácteos ricos en grasa (Warner, 1989). Las concentraciones de vitaminas y minerales se exponen en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Contenido de vitaminas y minerales en leche cruda de vaca (Adaptado de Santos, 1996)

Minerales	Concentración (g/L)	Vitaminas	Concentración por 100 g de leche
Potasio	1.6	A	150 U.I.
Sodio	0.5	D	2 U.I.
Calcio	1.3	E	80 µg
Magnesio	0.14	B ₁	45 µg
Fosforo	1	B ₂	150 µg
Cloro	1.1	Ácido pantoténico	350 µg
Azufre	0.3	Ácido nicotínico	100 µg
		Biotina	1.5 µg
		B ₆	35 µg
		B ₁₂	0.3 µg
		C	2000 µg

II.11.2 Etapas de elaboración del queso

Existe una gran diversidad de quesos, debido a que presentan distintas características en sabor, textura y apariencia, ello se debe a los diferentes factores que intervienen en su proceso de elaboración ya que algunos son muy específicos y determinantes, pese a ello existen pasos que de manera general se siguen para su elaboración, con ciertas variantes dependiendo el tipo de queso que se desee producir, dichos pasos son: recepción, pasteurización y coagulación de la leche,

corte y desuerado de la cuajada, agitación de los granos, moldeado, prensado y salado de la pasta (Santos, 1996; Alais, 1998).

II.11.2.1 Recepción de la leche

La leche empleada para la elaboración de quesos debe contar con ciertas características fisicoquímicas y microbiológicas, que nos permiten conocer su calidad y por lo tanto si ésta es apta para la elaboración de quesos, dichas características se enlistan en el Cuadro 7. La leche debe además estar libre de adulterantes como cloro, formol, agua oxigenada y antibióticos, ya que éstos son utilizados comúnmente como conservadores (Navarrete, 1990).

Cuadro 7. Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas con las que debe contar la leche empleada para la elaboración de quesos (Navarrete, 1990).

Propiedades	Lectura
Densidad a 15 °C	1.03 -1.034 g/mL
Calor específico	0.93
Punto de congelación	- 0.55 °C
pH	6.5 – 6.6
Acidez	14 a 16 °D
Índice de refracción	1.35
Coliformes	máximo 5×10^4 UFC/ml
Cuenta bacteriana total	máximo 5×10^5 UFC/ml
Células somáticas	menor a 2.5×10^5 UFC/ml
Resazurina	negativa
Reductasa	negativa

II.11.2.2 Pasteurización de la leche

Tiene como propósito eliminar mediante un tratamiento térmico la flora patógena alterando lo menos posible el olor, sabor y estructura física de la leche así como su equilibrio químico y las sustancias con actividad biológica como las enzimas y vitaminas. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-184-SSA1-2002 las condiciones de pasteurización son lenta: 63 °C por 30 min, o rápida: 72 °C por 15 s u otra relación de tiempo y temperatura equivalente; con ello se asegura la destrucción de microorganismos patógenos como *Salmonella spp*, *Brucella spp*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burnettii*.

II.11.2.3 Coagulación de la leche

Coagulación ácida o por acidificación. Esta se realiza al agregar ácido cítrico, láctico o acético hasta que coagulen las caseínas o al cultivar microorganismos que produzcan ácido láctico a partir de lactosa. La coagulación tiene lugar debido a que a partir del complejo de fosfato de calcio de la proteína de leche se obtiene caseína ácida y se libera el calcio iónico provocando una modificación electrostática sobre la micela neutralizando sus cargas hasta alcanzar el punto isoeléctrico a un pH de 4.6 a 4.9 en el cual la proteína coagula (Spreer, 1998).

Coagulación enzimática. Las enzimas más utilizadas son la quimosina, la enzima aislada del hongo *Mucor miehei*, la pepsina y la bromelina. La quimosina, cuajo o renina es la más utilizada, ésta es segregada por el cuarto estomago de los rumiantes, es una haloproteína que tiene un pH óptimo de actividad entre 3.8 y 4.0. La quimosina es muy sensible a variaciones de pH inactivándose irreversiblemente a pH superiores a 8.0, la temperatura también afecta su poder coagulante, siendo su límite máximo 40 °C y mínimo de 20 °C.

La quimosina hidroliza a la κ -caseína y de ésta solamente afecta el enlace peptídico entre la fenilalanina y la metionina, que se ubican en la posición 105 -106

de la cadena polipeptídica, dando como resultado dos cadenas, la primera de 64 aminoácidos que corresponde a la parte carbonilo terminal de la κ -caseína, esta fracción es llamada glicomacropéptido éste permanece soluble en el lactosuero, la segunda fracción de la hidrólisis contiene 105 aminoácidos y se llama para- κ -caseína (insoluble a un pH de 4.6), cuando se encuentra aislada y en ausencia de calcio, forma un gel fibroso (Warner, 1989).

Existen factores que intervienen en la coagulación de la caseína como son:

- Dosis de quimosina. La velocidad de coagulación es proporcional a la concentración de cuajo. La actividad del cuajo se mide según su fuerza, esta se define como la cantidad de leche en gramos o mililitros a 35 °C que un gramo o mililitro de cuajo coagula en 40 min.
- Temperatura. La velocidad de coagulación es mayor de 40 a 42 °C, por debajo de 10 °C el gel no se forma, entre 10 y 20 °C la gelatinización es muy lenta y disminuye a partir de 50 °C y a más de 65 °C no hay coagulación. La temperatura de coagulación se elige según el contenido de grasa, así por cada 10% de incremento en grasa se aumenta la temperatura en 1 a 1.5 °C, dicha temperatura debe ser menor a la óptima del cuajo para no afectar el desarrollo de BAL y evitar una cuajada flocculenta y no compacta.
- pH de la leche. La leche coagula en 200 s a un pH de 6.7, en 50 s a un pH de 6.1 y en 30 s a un pH de 5.7. Si la coagulación se da a un pH cercano a la neutralidad, la micela forma una red tridimensional fuerte que no está desmineralizada, la cuajada que se obtiene será flexible, elástica, compacta, impermeable, contráctil y con bajo contenido de agua. La coagulación no se lleva a cabo a un pH superior a 7.5 ya que la enzima se inactiva. A pH ácido se acorta la duración de la coagulación, obteniéndose una red tridimensional muy débil que es menos flexible, contráctil y más permeable.

- Contenido de calcio iónico. Su presencia en la leche permite la formación de la red tridimensional de las caseínas, después de la acción del cuajo, mejorando el proceso de desuerado y la retención de grasa. Su disminución retarda o evita la coagulación de la caseína, éste inconveniente se resuelve agregando cloruro de calcio.
- Contenido de fosfato de calcio coloidal. El tiempo de coagulación disminuye y la firmeza del gel aumenta a medida que la concentración de fosfato de calcio coloidal incrementa.
- Disminución de las micelas de caseína. Cuando más pequeño es el diámetro micelar más tarda la coagulación, ya que las micelas más grandes son más ricas en fosfato de calcio coloidal.
- Calentamiento previo de la leche. La leche que ha sido calentada (superando la temperatura y tiempo de pasteurización lenta de 63 °C por 30 min, o rápida: 72 °C por 15) coagula más lentamente que la leche cruda y su coagulo será débil. Esto debido a que la concentración de calcio iónico y las formas solubles de fosfatos y citratos disminuye, el diámetro de las micelas se reduce y se ven modificadas las proteínas solubles, ya que la κ -caseína forma un complejo de β -lactoglobulina durante el calentamiento provocando que la κ -caseína sea menos sensible a la acción de la quimosina. Los efectos de calentamiento no son acentuados, mientras no se supere la temperatura de pasteurización.
- Contenido de proteínas del lactosuero. Estas son insensibles a la acción de la quimosina, al encontrarse en concentraciones elevadas disminuye la cantidad de caseína, provocando dificultades en la coagulación.
- El tiempo de coagulación oscila entre 20 y 60 min, si se prolonga el tiempo aumenta el riesgo de perder grasa en el suero (Santos, 1996; Spreer, 1998).

II.11.2.4 Corte de la cuajada

Al finalizar la coagulación el gel debe mostrar una estructura firme y elástica, estas características determinan el momento de corte de la cuajada, sin embargo no puede determinarse de manera objetiva, por lo que se requiere emplear métodos empíricos como la observación y la experiencia.

El corte de la cuajada tiene como propósito tener una mayor superficie de exudación favoreciendo la sinéresis y por lo tanto la eliminación del suero, se realiza utilizando liras, cuchillas o espadas. El tamaño de grano que se obtiene de la cuajada afecta la cantidad de grasa que se retiene, así cuando el grano es grande en el suero queda de 0.14 a 0.24% (p/v) de grasa, en cortes más finos la cantidad de grasa es el 1% (p/v) en el suero, este problema puede resolverse al homogenizar la leche antes de su procesamiento (Spreer, 1998)

II.11.2.5 Agitación de los granos de la cuajada

Inmediatamente después del troceado de la cuajada se efectúa la agitación de los granos para acelerar y completar el desuerado, al renovar constantemente la superficie de exudación e impedir la adherencia de los granos, se evita la formación de un aglomerado que retiene líquido. La agitación dura entre 20 y 60 min (Santos, 1996).

II.11.2.6 Desuerado de la cuajada

El desuerado tiene la finalidad de crear las condiciones y el sustrato necesario para el desarrollo de los microorganismos y para la actividad enzimática durante el proceso de maduración y afinado.

El desuerado de una cuajada láctica es difícil, debido a la dispersión de las caseínas y a la poca o nula contractibilidad. La cuajada que se obtiene es húmeda y poco desuerada. En este tipo de cuajadas el troceado y la agitación son difíciles y

deben realizarse con cuidado para evitar pérdidas. La velocidad del desuerado dependerá de la temperatura; a temperaturas menores de 10 °C no se verifica el desuerado y a 30 °C el desuerado es muy rápido.

El desuerado de una cuajada tipo enzimático no es sencillo, no basta con simple reposo, por lo cual se emplean métodos mecánicos como el troceado y agitación (Alais, 1998).

II.11.2.7 Moldeado de los quesos

La cuajada se introduce en moldes con el objetivo lograr que los granos de cuajada se adhieran, dando forma a las piezas de queso, pueden utilizarse moldes de diversas formas como cilindros perforados se sugiere que sean de acero inoxidable o plástico.

II.11.2.8 Prensado de los quesos

Tiene por objeto compactar la masa de cuajada y eliminar el suero remanente, puede realizarse por la presión que ejerce su propia masa (autoprensado) o al aplicar una fuerza externa.

Autoprensado. Se emplea para quesos blandos que tienen un alto contenido de agua, consiste en voltear los quesos a intervalos de 15 a 30 min al inicio y después cada 60 ó 90 min; este procedimiento tarda de 3 a 24 h según el tipo de queso.

Aplicación de fuerza externa. Se realiza comúnmente en prensas horizontales neumáticas o verticales de palanca. La presión que se utilice dependerá del tipo de queso, de esta manera se puede utilizar una presión de 4 a 40 veces el peso del queso.

II.11.2.9 Salado de los quesos

El salado puede proteger contra la invasión microbiana superficial de los quesos. Algunos microorganismos son susceptibles a concentraciones bajas de sal como el hongo *Oidium lactis* es el responsable de formar la llamada "piel gruesa" sobre los quesos mal desuerados o poco salados. La sal frena también el desarrollo de bacterias de la putrefacción y productoras de gas. Por el contrario, tiene muy poco efecto sobre el desarrollo de *Penicillium*. Favorece el desuerado a causa de su acción higroscópica, tiene un efecto potenciador de sabor. Es importante controlar la concentración de sal ya que un exceso de ésta influye en la acción enzimática y retrasa su maduración. La concentración media de sal va del 1 al 2%. En algunos quesos como el azul o el de cabra puede alcanzar el 3 ó 4% (Alais, 1991).

Existen distintos tipos de salado:

- Salado en el suero. Consiste en aplicar de un 5 a 8 % (con respecto a la cantidad de leche procesada) de cloruro de sodio durante el agitado de los granos. O bien remover de un 30 a 50% de suero y agregar de 3.5 a 6% (con respecto a la cantidad de leche procesada) de cloruro de sodio.
- Salado en la masa del queso. Se efectúa después del desuerado de los granos. Este método favorece el desuerado y regula la humedad durante la maduración.
- Salado con sal seca sobre la superficie del queso. Consiste en salar con sal cristalina, al frotarla uniformemente sobre la superficie, se aplica en fases sucesivas durante varios días, al aplicarse este método la sal penetra poco a poco mientras se expulsa el suero regulando el crecimiento microbiano.
- Salado por salmuera. Los quesos se sumergen en un recipiente que contiene una solución salina. Para los quesos duros la salmuera contiene de 22 a 24%

(p/v) de sal (NaCl), mientras que para los blandos de 16 a 18% (p/v) (Santos, 1996; Alais, 1998, Spreer 1998).

II.11.3 Producción y consumo de queso Panela y Oaxaca en México

México es un país productor de queso, en los últimos cuatro años ha aumentado su producción en un 16%, así en el 2004 se reportaron 134,000 toneladas, para el 2008 la cifra aumento a 150,000 toneladas de las cuales el 11.36% y 16.92% se refieren a la producción anual de queso Panela y Oaxaca respectivamente

En la Figura 3 se muestra el comportamiento de la producción de queso Panela y Oaxaca en los últimos diez años, en donde es posible ver que para ambos quesos la producción ha incrementado, siendo el queso Panela el que ha tenido un notable aumento en los últimos tres años, mientras que el Oaxaca si bien ha aumentado su producción, esta no ha sido tan radical como lo muestra el queso Panela. Para el 2009 se espera una producción anual de queso de 152,000 toneladas según lo reportado por la SAGARPA en diciembre del 2008.

México es también un país consumidor de queso, en el 2004 el consumo reportado fue de 214,000 ton, aumentado en un 11.2% para el 2008 alcanzando 238,000 ton consumidas.

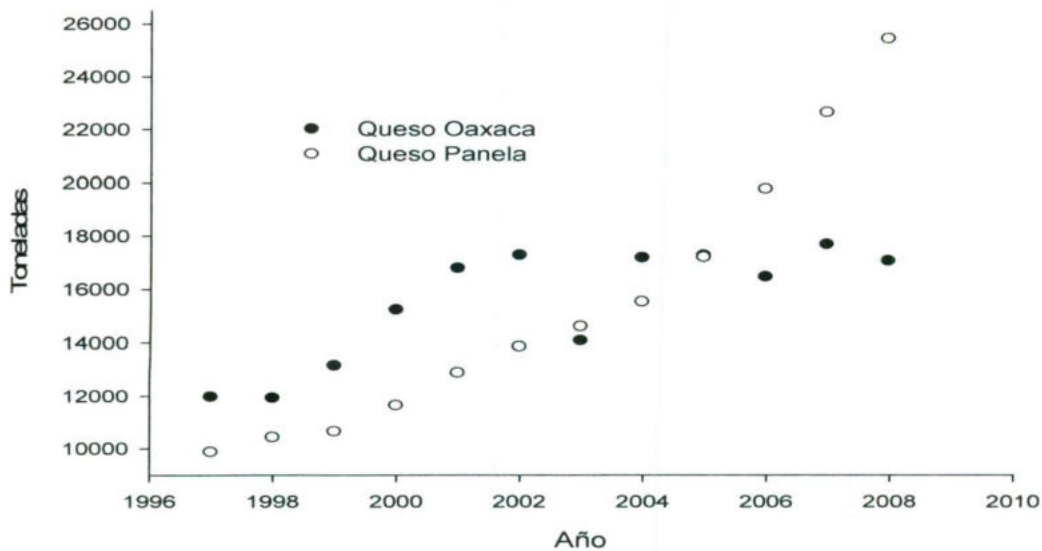


Figura 3. Producción de Queso Panela y Oaxaca en los últimos diez años en México (SAGARPA, 2008).

Los datos reportados por el servicio de SAGARPA (2008) sobre la producción de queso contemplan los establecimientos que sumados aportan como mínimo el 80% del valor bruto de la producción con cobertura nacional, por lo tanto el 20% restante (37,500 toneladas) puede ser elaborado con leche sin pasteurizar.

El consumo de quesos y derivados lácteos elaborados a partir de leche sin pasteurizar (bronca o cruda) está asociado con enfermedades como brucelosis, salmonelosis, tuberculosis y listeriosis. Los datos resultantes de muestreos realizados en estos productos en diferentes lugares de nuestro país, corroboran que con frecuencia están contaminados con microorganismos que causan enfermedades al humano, así como abortos, debido al manejo sanitario inadecuado de la leche y elaboración de quesos, cremas y otros productos lácteos. Por lo cual la Secretaría de Salud recomienda evitar el consumo de quesos y otros derivados lácteos, si no se tiene la certeza de que fueron elaborados con leche pasteurizada, lo que debe estar indicado en la etiqueta Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS, 2005).

II.11.4 Análisis sensorial

El queso es uno de los alimentos que está más difundido en las tradiciones gastronómicas mundiales y como tal ha sido objeto de numerosos estudios tanto técnicos como hedónicos y nutricionales.

La evaluación sensorial es el análisis de alimentos y otros materiales por medio de los sentidos. La evaluación sensorial es una técnica de medición y análisis tan importante como los métodos químicos, físicos, microbiológicos, etc. Este tipo de análisis tiene la ventaja de que la persona que efectúa las mediciones lleva consigo sus propios instrumentos de análisis, o sea, sus cinco sentidos.

La selección de alimentos por parte de los consumidores está determinada por los sentidos de la vista, olfato, tacto y el gusto. La información sobre los gustos preferencias y requisitos de aceptabilidad de un producto alimenticio se obtiene empleando métodos de análisis adaptados a las necesidades de el consumidor y evaluaciones sensoriales con panelistas no entrenados. Esta prueba de análisis es determinante en el desarrollo de nuevos productos alimenticios, reformulación de productos ya existentes, identificación de cambios causados por los métodos de procesamiento, almacenamiento y uso de nuevos ingredientes así como, para el mantenimiento de las normas de control de calidad (Sancho y col., 2002)

II.11.4.1 Los sentidos y las propiedades sensoriales

El sistema sensitivo del ser humano es una gran herramienta para el control de calidad de los productos de diversas industrias. En la industria alimentaria la vista, el olfato, el gusto y el oído son elementos idóneos para determinar el color, olor, aroma, gusto, sabor y la textura responsables del buen aspecto y calidad del alimento.

Olor. Es la percepción por medio de la nariz de compuestos volátiles liberados de los alimentos. En la evaluación de olor es muy importante que no haya contaminación de un olor con otro, por tanto los alimentos que van a ser evaluados deberán mantenerse en recipientes herméticamente cerrados.

Aroma. Consiste en la percepción de las sustancias olorosas y aromáticas de un alimento después de haberse puesto en la boca. Dichas sustancias se disuelven en la mucosa del paladar y la faringe, llegando a través del eustaquio a los centros sensores del olfato. El aroma es el principal componente del sabor de los alimentos, es por eso que cuando tenemos gripe o resfriado el aroma no es detectado y algunos alimentos sabrán a lo mismo. El uso y abuso del tabaco o alimentos picantes y muy condimentados, insensibilizan la boca y por ende la detección de aromas y sabores.

Gusto. Puede ser ácido, dulce, salado, amargo, o bien puede haber una combinación de dos o más de estos. Esta propiedad es detectada por la lengua. Hay personas que pueden percibir con mucha agudeza un determinado gusto, pero para otros su percepción es pobre o nula; por lo cual es necesario determinar que sabores básicos puede detectar cada juez para poder participar en la prueba.

Sabor. Esta propiedad de los alimentos es muy compleja, ya que combina tres propiedades: olor, aroma, y gusto; por lo tanto su medición y apreciación son más complejas que las de cada propiedad por separado. El sabor es lo que diferencia un alimento de otro, ya que si se prueba un alimento con los ojos cerrados y la nariz tapada, solamente se podrá juzgar si es dulce, salado, amargo o ácido. En cambio, en cuanto se perciba el olor, se podrá decir de qué alimento se trata. El sabor es una propiedad química, ya que involucra la detección de estímulos disueltos en agua aceite o saliva por las papilas gustativas, localizadas en la superficie de la lengua, así como en la mucosa del paladar y el área de la garganta.

Estas papilas se dividen en cuatro grupos, cada uno sensible a los cuatro sabores o gustos:

- Papilasiformes: Localizadas en la punta de la lengua sensible al sabor dulce.
- Fungiformes: Localizada en los laterales inferiores de la lengua, detectan el sabor salado.
- Coraliformes: Localizadas en los laterales posteriores de la lengua, sensible al sabor ácido.
- Caliciformes: Localizadas en la parte posterior de la cavidad bucal detectan sabor amargo.

Por ello es importante en la evaluación de sabor la lengua de el juez esté en buenas condiciones, además que no tenga problemas con su nariz y garganta. Los jueces no deben ponerse perfume antes de participar en las degustaciones, ya que el olor del perfume puede inferir con el sabor de las muestras.

Textura. Es la propiedad de los alimentos apreciada por los sentidos del tacto, la vista y el oído; se manifiesta cuando el alimento sufre una deformación. La textura no puede ser percibida si el alimento no ha sido deformado; es decir, por medio del tacto podemos decir, por ejemplo si el alimento está duro o blando al hacer presión sobre él. Al morderse una fruta, más atributos de textura empezarán a manifestarse como el crujido, detectado por el oído y al masticarse, el contacto de la parte interna con las mejillas, así como con la lengua, las encías y el paladar nos permitirán decir de la fruta si presenta fibrosidad, granulosidad, etc. (Azaldúa, 1994).

III. HIPÓTESIS

Las cepas probióticas, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* adicionadas a quesos Panela y Oaxaca, elaborados a partir de leche deslactosada, mantienen su viabilidad a lo largo de treinta días de almacenamiento, sin modificar las características sensoriales de estos dos tipos de queso.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Evaluar la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en quesos frescos deslactosados tipo Panela y Oaxaca empacados al vacío durante un periodo de almacenamiento de 30 días a 4 °C; así como determinar la aceptación del producto por el consumidor.

IV.2 Específicos

1. Cuantificar la población de las cepas probióticas viables en ambos quesos frescos empacados al vacío, durante un periodo de almacenamiento de 30 días, a 4 °C.
2. Evaluar sensorialmente ambos quesos deslactosados adicionados de bacterias probióticas, para conocer la aceptación del consumidor durante su vida de anaquel.
3. Identificar las cepas probióticas de *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus*.
4. Realizar análisis proximales y fisicoquímicos de los quesos en estudio.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

V.1.1 Cepas

Las cepas que se utilizaron son un cultivo lácteo liofilizado AB1 de la marca sacco srl (Italia) que contiene 10 U (1 U equivale a 10^{11} UFC) de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* 1:1.

V.1.2 Enzimas

La enzima que se empleo para hidrolizar a la lactosa es β -galactosidasa obtenida de la fermentación controlada de la levadura *Kluyveromyces lactis*, la casa productora es Global Food Division de Alltech México, cuya concentración es 50,000 ONPGU/g.

La quimosina fue la enzima utilizada para lograr hidrolizar la caseína de la leche, de la marca Qualact de fuerza 1:10000, (1 L de cuajo coagula 10 000 L de leche).

V.1.3 Soluciones y medios de cultivo

V.1.3.1 Diluyente de peptona al 0.1% (p/v)

Pesar 0.1 g de peptona de caseína (Bioxon) por cada 100 mL, distribuir en tubos de ensaye y esterilizar en autoclave.

V.1.3.2 Solución de ampicilina trihidratada (20 g/L)

Pesar 0.1 g de ampicilina (Sigma) y diluir en 5 mL de agua destilada, esterilizar la solución por filtración en membrana de 0.45 μm de tamaño de poro (Durapore, Millipore, Irlanda).

V.1.3.3 Solución de rosa de bengala (50 mg/L)

Pesar 50 mg de rosa de bengala (Merck) para 1 L de medio agar papa dextrosa (Bioxon), disolver en la mínima cantidad de agua (1 mL) destilada y esterilizada, esterilizar por filtración.

V.1.3.4 Solución de ácido tartárico (10% p/v)

Pesar 10 g de ácido tartárico (Sigma), agregar 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración.

V.1.3.5 Solución de pimaricina o natamicina (20 g/L)

Pesar 0.10 g de pimaricina (Sigma) diluir en 5 mL de agua destilada y esterilizar por filtración.

V.1.3.6 Solución de L- cisteína- HCl (20 g/L, 25 mL)

Pesar 0.50 g de L-Cisteína (Sigma), agregar 25 mL de agua destilada y esterilizar por filtración.

V.1.3.7 Solución de Cloruro de Litio (3 g/mL, 2mL)

Pesar 6 g de cloruro de litio (Sigma), disolver con la mínima cantidad de agua destilada (2 mL). La solución se esterilizada por filtración.

V.1.3.8 Solución de hidróxido de sodio al 50% (p/v)

Pesar 50 g de hidróxido de sodio (Baker), diluir en 100 mL de agua destilada.

V.1.3.9 Ácido bórico al 1% (p/v) con indicadores

Disolver 10 g de ácido bórico (Baker) en 800 mL de agua destilada, en un matraz volumétrico de 1000 mL. Por separado disolver 20 mg de rojo de metilo (Reasol) en 60 mL de alcohol etílico (Baker) y 100 mg de verde de bromocresol (Merck) en 60 mL de alcohol etílico. Adicionar los indicadores al matraz de 1000 mL, completar el volumen aforando con agua destilada. Ajustar el pH de la solución a 4.5 - 4.7.

V.1.3.10 Ácido clorhídrico 0.1 N

Diluir 8.5 mL de ácido clorhídrico (Baker) concentrado con agua destilada en un matraz volumétrico de 1000 mL, aforar y estandarizar.

V.1.3.11 Medio para *Lactobacillus acidophilus*

Pesar 20 g de glucosa (Sigma), 15 g de agar bacteriológico (Bioxon), 5 g de peptona de caseína (Bioxon), 1 g de extracto de levadura (Bioxon), 0.5 g de fosfato ácido de potásico K_2HPO_4 (Sigma), 0.5 g sulfato de magnesio heptahidratado $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma), 1 g de carbonato de calcio $CaCO_3$ (Merck) y 50 mg de sulfato ferroso heptahidratado $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma). Disolver en 1000 mL de agua destilada, llevar a un pH de 6.8 ± 2 y hervir por un minuto. Esterilizar en autoclave a $121^\circ C$ por 15 min. Colocar 15 mL de medio a cada caja petri estéril (Atlas, 1997).

V.1.3.12 Medio para Bifidobacteria

Pesar 10 g de digerido triptico de caseína (Bioxon), 10 g de glucosa, 5 g de extracto de carne (Bioxon), 5 g de extracto de levadura, 3.9 g de fosfato ácido de

potasio trihidratado $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (Sigma), 1 g de Tween 80 (Sigma), y agar bacteriológico al 1.5% (p/v). Disolver en 1000 mL de agua destilada, llevar a un pH de 6.8 ± 2 y hervir por un min. Esterilizar en autoclave a $121^\circ C$ por 15 min. Se agrega la solución de L-cisteina-HCl y de cloruro de litio, se agita para homogenizar. Se colocan 15 mL de medio a cada caja petri estéril (Atlas, 1997).

V.1.3.13 Medio agar papa dextrosa

Pesar 39 g de agar papa dextrosa (Bioxon) disolverlo en 1000 mL de agua destilada, llevar a un pH de 5.6 ± 0.2 , hervir por un minuto. Se esteriliza en autoclave a $121^\circ C$ por 15 min. Se agrega a temperatura ambiente 2 mL de solución de ampicilina, 0.052 mL/L de rosa de bengala esterilizada en frío y se lleva a un pH de 3.5 ± 0.2 agregándole 14 mL de ácido tartárico (10% p/v) esterilizado en frío.

V.1.3.14 Caldo lauril triptosa

Pesar 35.6 g de caldo lauril triptosa (Difco) y disolver en 1000 mL de agua destilada, llevar a un pH de 6.8 ± 0.2 , colocar 10 mL en un tubo de ensaye que contenga una campana de fermentación. Esterilizar en autoclave a $121^\circ C$ por 15 min.

V.1.3.15 Caldo lactosa bilis verde brillante

Pesar 40 g de caldo lactosa bilis verde brillante (Merck) y disolver en 1000 mL de agua destilada, llevar a un pH de 7.2 ± 0.2 , colocar 5 mL en un tubo de ensaye que contenga una campana de fermentación. Esterilizar en autoclave a $121^\circ C$ por 15 min.

V.1.3.16 Solución cristal violeta

Pesar 0.30 g de cristal violeta (Merck), se disuelve en 20 mL de alcohol etílico (Baker), aforar con agua destilada hasta un volumen de 100 mL.

V.1.3.17 Solución de yodo

Pesar 0.33 g de yodo (Baker) y 0.66 g de yoduro de potasio (Baker), agregar 100 mL agua destilada y agitar hasta total disolución.

V.1.3.18 Solución de safranina

Pesar 0.25 g de safranina (Hycel) disolver en 10 mL de alcohol etílico, una vez disuelto adicionar 90 mL de agua destilada, homogenizar.

V.1.3.19 solución alcohol - acetona

Medir 100 mL de acetona (Baker) y 100 mL de alcohol etílico, homogenizar.

V.2 Métodos

V.2.1 Producción de queso

V.2.1.1 Elaboración de queso Panela

Se realizó la recepción de la leche, la cual se mantuvo a 4 °C hasta antes de su procesamiento. Se sometió a pasteurización lenta (63 °C por 30 min) terminado el proceso de pasteurización se bajó la temperatura a 38 °C en este momento y aún en el tanque de pasteurización se agregó la cantidad apropiada de los probióticos liofilizados (1 U/100 L de leche), y la enzima β -galactosidasa (0.45 mL/L leche), la leche inoculada con los probióticos y la enzima se filtro recibiendo en tinas en

donde se reposó por 40 min para asegurar que la enzima actuara sobre la lactosa, transcurrido este tiempo se agregó el cloruro de calcio (0.4 mL/L, Qualact) al 50% (p/v).

Posteriormente, se adicionó el cuajo microbiano (Qualact), 10 mL por cada 100 L de leche, agitando constantemente para lograr su completa incorporación. Se dejó reposar por 30 min favoreciendo la formación de la cuajada, para luego proceder al cortado de manera horizontal y vertical, se dejó reposar 10 min más para lograr un lento desuerado del grano, manteniendo una temperatura de 32 °C.

En seguida se agitó lentamente para favorecer el desuerado, aumentando poco a poco la velocidad de agitación, con el fin de obtener un grano firme. Se procedió a la eliminación parcial del suero, salado (1%, empleando NaCl) y en seguida desuerado total. La pasta obtenida se colocó en moldes DE 500 y 1000 g. Se continuó desuerando por autoprensado durante 24 h a 4 °C, se desmoldó y se empacó al vacío. La Figura 4 presenta de forma gráfica su diagrama de realización.

V.2.1.2 Elaboración de queso Oaxaca

Se realizó la recepción de la leche, la cual se mantuvo a 4 °C hasta antes de su pasteurización. Se sometió a pasteurización lenta (63 °C, 30 min), recibéndose en tinas a 38 °C, temperatura a la cual se agregó la β -galactosidasa (0.45 mL/L leche) dejando reposar por 40 min, al transcurrir este tiempo se adicionaron 40 mL de CaCl_2 al 50% (p/v) por cada 100 L de leche y ácido cítrico disuelto en agua hasta que la leche alcanzó un pH de 5.6, esto se consiguió con aproximadamente 120 g de ácido cítrico por cada 100 L de leche.

En seguida se agregó el cuajo microbiano (Qualact; 10mL por cada 100 L), agitando constantemente para lograr su completa incorporación, observándose de forma inmediata la formación de la cuajada. Se continuó agitando hasta obtener una pasta consistente y en seguida se procedió al desuerado.

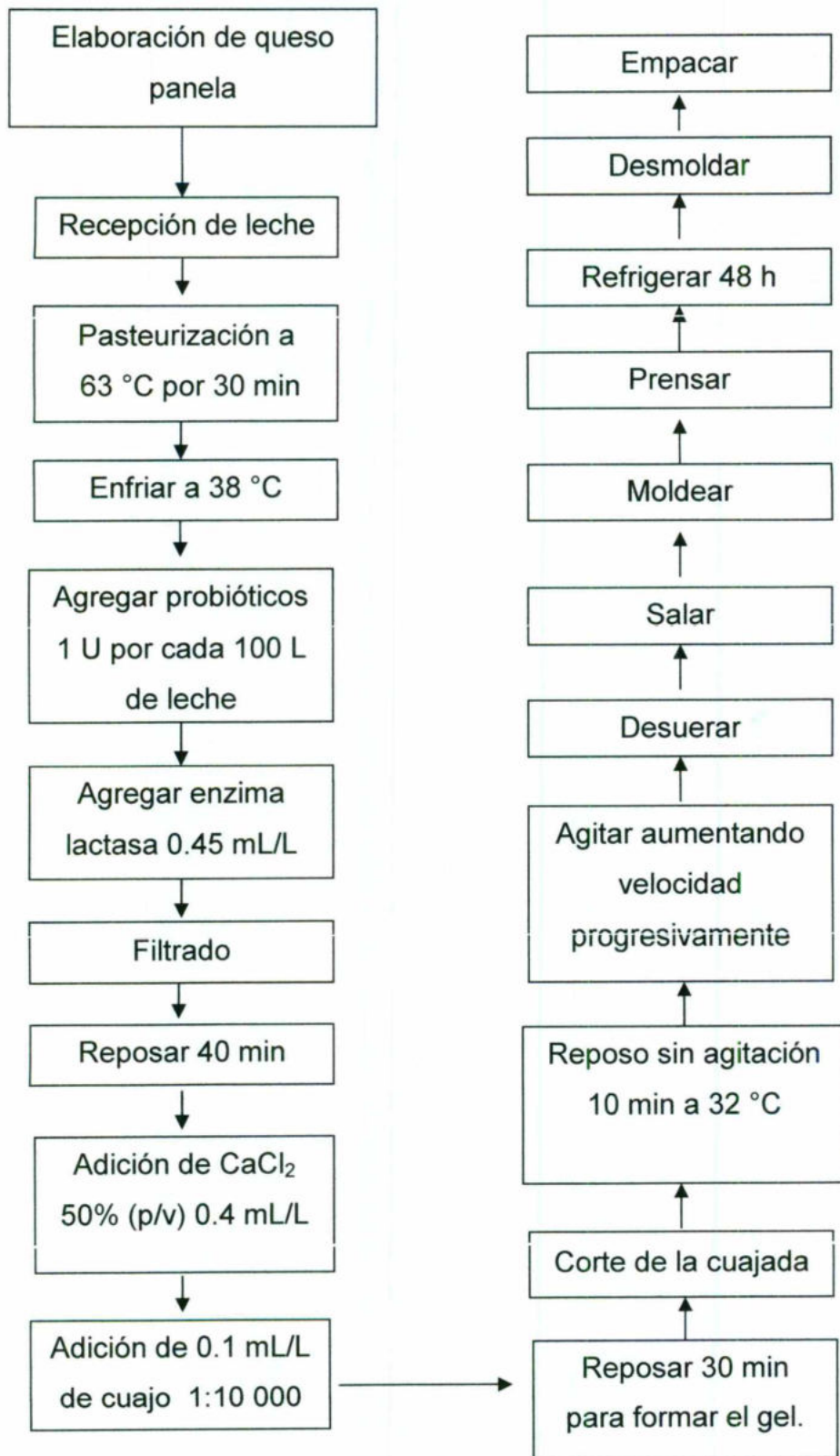


Figura 4. Diagrama de flujo de la elaboración de queso Panela deslactosado añadido con probióticos.

La pasta obtenida se colocó en la malaxadora y se le agregó agua caliente a 85 °C dejándola reposar por 10 min. Se comenzó el malaxado llevando la pasta a una temperatura de 50 °C, esto se logró regulando la temperatura de la chaqueta de vapor de la malaxadora, teniendo los 50 °C se agregaron los probióticos (1.3 U/100 L de leche) disueltos en 1 L de leche pasteurizada, se continuó mezclando hasta lograr su total incorporación. Posteriormente, se retiró la pasta de la malaxadora formando hebras las cuales se pasaron por agua caliente a 45 °C y de inmediato a agua fría a 10 °C por 3 min para lograr en ellas una apariencia característica del queso Oaxaca. Las hebras fueron saladas agregando directamente sobre ellas sal molida. Se formaron las piezas de queso, entretejiendo las hebras, se empacaron y almacenaron. En la Figura 5 se muestra el diagrama de elaboración de queso Oaxaca.

V.2.2 Análisis fisicoquímicos

Se efectuaron análisis por triplicado y se obtuvo el promedio con los intervalos de confianza ($\alpha=0.05$), para cada determinación.

V.2.2.1 Determinación de humedad

La determinación de humedad se realizó de acuerdo a lo norma NOM-116-SSA 1-1994. Se tomaron tres muestras de cada queso de 2 g cada una en un crisol a peso constante, se calentaron en un horno (Binder) a 100 °C por 3 h. Transcurrido éste tiempo se colocaron en un desecador hasta enfriarse a temperatura ambiente, se pesaron, y se colocaron nuevamente en el horno por 30 min, para luego enfriar y pesar. Esto se realizó hasta obtener un peso constante. Mediante diferencia de pesadas se obtuvo el porcentaje de humedad, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \left(\frac{G_0 - G_1}{G_0} \right) \times 100$$

Donde: G_0 = peso de muestra húmeda

G_1 = peso de muestra seca

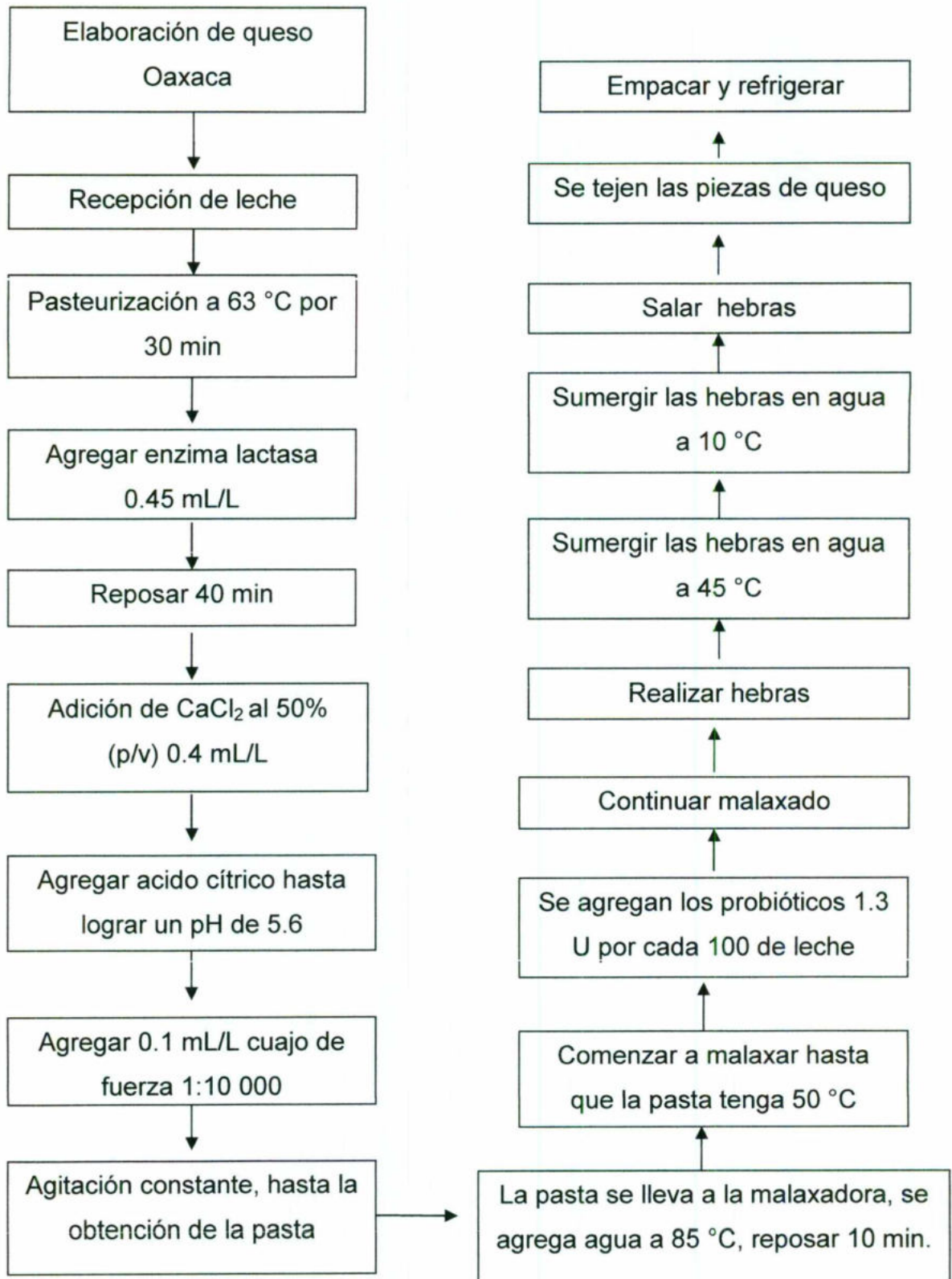


Figura 5. Diagrama de flujo de la elaboración del queso Oaxaca deslactosado añadido con probióticos,

V.2.2.2 Determinación de actividad de agua

Se realizó utilizando el equipo Aqua Lab CX-2, el cual se calibró con una solución saturada de KCl ($A_w = 0.843$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$). Una vez calibrado se colocó una capa delgada de muestra de aproximadamente 1 g en la celda. Se realizaron lecturas por triplicado.

V.2.2.3 Medición de pH

Se determinó empleando un potenciómetro (Corning), 1 g de muestra triturada se homogenizó con 10 mL de agua destilada recientemente hervida y a temperatura ambiente, se procede a tomar la lectura (NMX-F-099-1970).

V.2.3 Análisis proximales

V.2.3.1 Determinación de grasa

Se empleó el método Gerber para la determinación de grasa butírica. Se cortó uniforme y finamente la muestra de queso, se pesaron exactamente 3.0 g de muestra y se colocaron en el porta-muestra del butirómetro, una vez colocado el porta-muestra se adicionó lentamente por la pared 10 mL de ácido sulfúrico para leche con una densidad de 1.52 g/mL, agua caliente a $35 - 40\text{ }^\circ\text{C}$ (el volumen del agua dependió del butirómetro) y 1 mL de alcohol isoamílico; se tapó el butirómetro y se agitó hasta disolver del coágulo invirtiéndolo varias veces con el fin de evitar la proyección del tapón. Fue conveniente envolver el butirómetro en un paño húmedo, ya que la reacción que se desarrolla es exotérmica alcanzando temperaturas de hasta $85\text{ }^\circ\text{C}$. Se centrifugó a 1,200 rpm durante 5 min, se realizó la lectura de la columna transparente de grasa separada, de la parte inferior de ella a la parte inferior del menisco superior. Para hacer la lectura lo más correcta posible se aumentó o disminuyó la presión del tapón por medio del ajustador hasta que la parte inferior de la grasa se encontrará paralela a una de las divisiones mayores de

la escala. Para ello se debió mantener el butirómetro en posición vertical (NMX-F-100-1984).

V.2.3.2 Determinación de proteína

Se empleo el método Kjeldahl. Se pesó un gramo de muestra molida y homogenizada, se colocó dentro del tubo de digestión, se adicionaron 10 g de sulfato de potasio (Baker), 60 mg de sulfato de cobre (Baker) y 15 mL de ácido sulfúrico (Baker) concentrado, este último resbalando por las paredes del matraz.

Se colocó el tubo de digestión dentro del digestor, el cual se precalentó a 100 °C, se incrementó la temperatura paulatinamente hasta 400 °C. El tiempo de digestión varía dependiendo del sistema de remoción de vapores, de 45 min a 2 h, la temperatura no debe exceder los 410 °C.

Los matraces se dejaron enfriar a una temperatura de aproximadamente 40 °C, se agregaron 100 mL de agua destilada, resbalándola por las paredes del matraz, se mezcló con precaución debido a que es una reacción altamente exotérmica. Se colocó el matraz en el destilador de proteínas y en un vaso de precipitado con 50 mL de ácido bórico con indicador se introdujo la alargadera o punta de salida del refrigerante. Se procedió a encender el destilador y adicionar lentamente 50 mL de hidróxido de sodio diluido con agua destilada 1:1 (v/v). Se destiló la muestra hasta obtener aproximadamente 200 mL de destilado.

Se efectuó la titulación del amoniaco con ácido clorhídrico 0.1 N, hasta vire del indicador de verde-azul a ligeramente rojizo. Se obtuvo el número de mL gastados de HCl. (NMX-F-608-NOMEX-2002).

Cálculos:

$$\% \text{ de Nitrogeno} = \frac{(Va - Vb) * 0.014 * 100}{P}$$

V_a = volumen de ácido clorhídrico gastado en la titulación, en mL.

V_b = Volumen de ácido clorhídrico gastado en la titulación del blanco

P = masa o peso de la muestra, en gramos.

0.014 = miliequivalente del nitrógeno.

$$\% \text{ de proteína} = (\% \text{ de } N) (\text{factor})$$

Factor = 6.38, para productos lácteos

V.2.3.3 Cuantificación de azúcares

Se utilizó el método fenol-sulfúrico, para azúcares reductores. Se colocó en un tubo de ensaye 1 mL de muestra (1 g/9 mL de agua), en una campana de extracción (Formalab) se adicionaron 62.5 μ L de fenol (Merk) al 80% (p/v) y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (Baker), este último evitando que toque las paredes del tubo, los cuales deben manejarse con cuidado ya que es una reacción exotérmica, una vez fríos y homogéneos, se procedió a la lectura de la absorbancia a 490 nm, en un espectrofotómetro (PerkinElmer) y mediante una curva de calibración se obtuvo la concentración de azúcares.

La curva de calibración se realizó con concentraciones conocidas de lactosa, a las cuales se les aplicó el mismo tratamiento que a las muestras.

V.2.4 Recuento de microorganismos

Se colocó 10 g de muestra en una bolsa estéril, agregar 90 mL de peptona de caseína al 0.1% (p/v). Las muestras se homogenizaron en una mezcladora (Laboratory Blender Stomacher 400) por 1 min a velocidad media.

Se realizaron las diluciones subsecuentes en peptona de caseína, tomando 1 mL de la primera dilución la cual se colocó en un tubo con 9 mL de diluyente de

peptona estéril y se homogenizó, este procedimiento se realizó tantas veces como fue necesario, hasta obtener las diluciones requeridas. Se cultivaron las diluciones apropiadas.

V.2.4.1 Recuento de hongos y levaduras

La cuenta de hongos y levaduras se realizó en agar papa dextrosa. Se colocó 1 mL de la dilución deseada en una caja petri estéril, en seguida se agregaron 20 mL de medio, se homogenizó dando pequeños giros a la derecha, a la izquierda, arriba y abajo, se dejó solidificar para posteriormente incubar a 22 °C durante 5 días (NOM-111-SSA1-1994).

V.2.4.2 Determinación de coliformes fecales

Prueba presuntiva. Se inoculó con 1 mL de la primera dilución en tres tubos que contienen 10 mL de caldo lauril triptosa, se realizó lo mismo con la segunda y tercera dilución, para al final tener nueve tubos de caldo lauril triptosa inoculados, tres para cada dilución, se incubaron durante 48 ± 2 h a 35 ± 2 °C. Se examinaron los tubos a las 24 ± 2 h y se observaron si había formación de gas en la campaña de fermentación y se volvió a incubar por 24 h. La presencia de gas en cualquier cantidad, dentro de 48 h da positiva la prueba.

Prueba confirmatoria. Se agitaron suavemente los tubos de caldo lauril sulfato triptosa que resultaron positivos. Posteriormente se transfirió de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo de la prueba presuntiva, a tubos con caldo lactosa bilis verde brillante y agua peptonada. Se incubaron los tubos a 44.5 ± 0.2 °C en baño de agua y se observó si se produjo gas a las 24 y 48 h.

Se realizó la prueba de indol, adicionando a un tubo de agua peptonada de 2 a 3 gotas de reactivo de Kovac (Merck). Se determinó el número de organismos de acuerdo con la tabla correspondiente (Anexo I), tomando como base el número de

tubos en que se observó producción de gas. Se reportó el número más probable (NMP) de coliformes fecales por g o mL de muestra (NMX-F-308-1992).

V.2.4.3 Recuento de *Lactobacillus acidophilus*

La cuenta de *L. acidophilus* se efectuó en cajas petri con agar de *Lactobacillus acidophilus*. Se colocaron 100 µL de la dilución deseada en una caja petri con el medio solidificado, con ayuda de una varilla de vidrio en forma de "L" se extendió el líquido, hasta que éste se absorbió. Se incubaron a 30 °C por 48 h.

V.2.4.4 Recuento de *Bifidobacterium lactis*

La cuenta de *B. lactis* se efectuó en medio selectivo para *Bifidobacterium*. Se colocan 100 µL de la dilución deseada en una caja petri con el medio *Bifidobacterium* solidificado, con ayuda de una varilla de vidrio en forma de "L" se extiende el líquido, hasta que éste es absorbido. Las cajas se incubaron a 30 °C durante 48 h usando un sistema anaeróbico BD GasPak EZ (Becton, Dickinson and Co).

V.2.5 Identificación de cepas probióticas

V.2.5.1 Fermentación de azúcares

El kit de identificación de bacterias lácticas api 50 CH (Bio Merieux) es un sistema estandarizado compuesto de 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio de los hidratos de carbono en los microorganismos. Durante el periodo de incubación, la fermentación se traduce en un cambio de color en el tubo, debido a una producción de ácido en anaerobiosis revelada por el indicador de pH del medio.

Preparación de galerías. Cada galería está constituida de 5 filas conteniendo cada una 10 tubos numerados. Se repartieron 10 mL de agua destilada en el fondo de los alvéolos de la cámara de incubación para crear una atmósfera húmeda, se

colocaron sobre los alvéolos las filas de 0 - 19 y 20 - 39, se completaron la galería con la fila 40 - 49.

Suspensión bacteriana. Se cultivó e incubó el microorganismo en un medio y condiciones adecuadas. Se tomaron las colonias del cultivo y se realizó una suspensión densa (S). En un tubo con 5 mL de agua destilada y estéril se agregó cierto número de gotas de la suspensión (S) hasta obtener una turbidez igual al patrón 2 McFarland (McF), se tomó nota del número de gotas (n). Observar el diagrama de flujo de la Figura 6. Se abrió la ampolla de api 50 CHL Medium y se agregó dos veces el número de gotas citadas (2n), se homogenizó y se utilizó de inmediato.

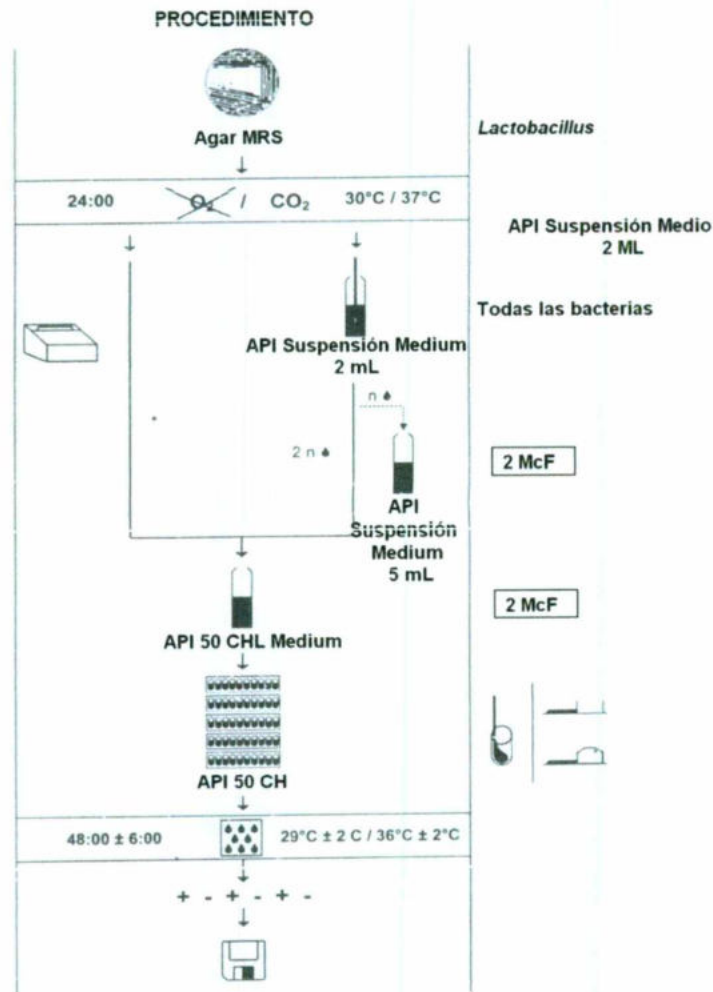


Figura 6. Diagrama de flujo de pruebas bioquímicas api 50 CH (Bio Merieux)

Incubación de las galerías. Se repartió la suspensión bacteriana en los 50 tubos de la galería evitando la formación de burbujas, se colocó en la parte superior aceite mineral estéril (Merck) para crear un ambiente anaerobio, se incubaron las galerías a 30 °C. El cambio de coloración de púrpura a amarillo hace positiva la prueba. Los resultados se analizaron de a cuerdo a la base de datos del api.

V.2.5.2 Tinción Gram

Esta técnica se fundamenta en la retención física del complejo cristal violeta - I₂, formado por la combinación del colorante primario y el yodo, componente del lugol. La retención del colorante dependerá de la composición de la pared celular microbiana.

En la Figura 7 se muestra la preparación de un frotis, para ello en un portaobjetos limpio se colocó el cultivo con una gota de agua estéril, esta mezcla se extendió con ayuda de una asa estéril, se secó con aire y se fijó con calor.

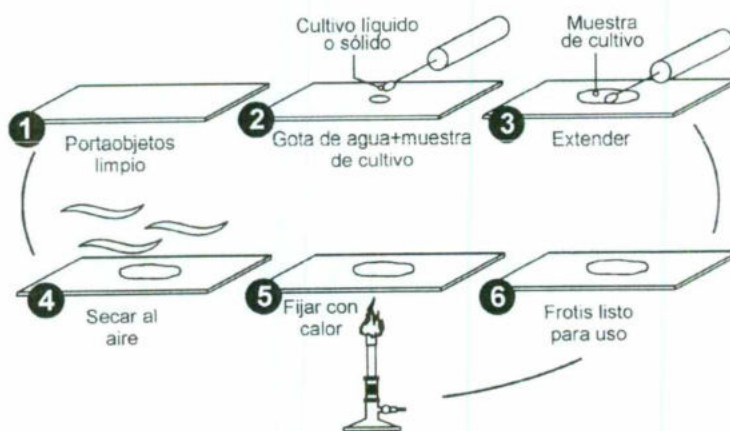


Figura 7. Elaboración de frotis microbiano

Tinción Gram. Al frotis microbiano se agregó cristal violeta de manera que se cubriera toda la preparación, se dejó actuar por 1 min transcurrido este tiempo el frotis se lavó con agua destilada, enseguida se agregó lugol y se mantuvo por 1 min

llegado este tiempo se eliminó el exceso con alcohol - acetona (1:1), posteriormente se agregó safranina acuosa y la cual se mantuvo por 30 s se lavó con agua destilada y se observó al microscopio (Axioskop 40- Zeiss) con ayuda de aceite de inmersión (Merck). En la Figura 8 puede observarse de manera gráfica como se realizó la tinción Gram.

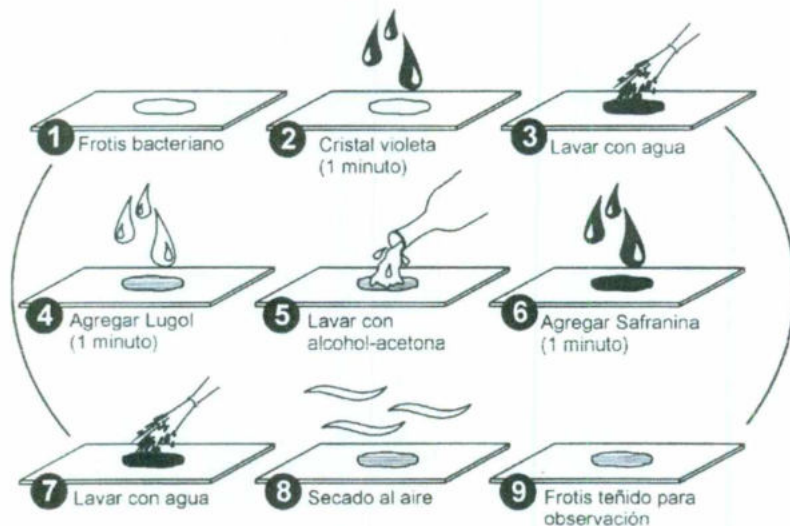


Figura 8. Diagrama de flujo que describe la tinción Gram.

V.2.6. Análisis sensorial

Ambos quesos fueron analizados por un panel no entrenado de 100 personas. Se evaluó el aroma, sabor, consistencia y agrado de la muestra, esto mediante el uso de una encuesta (ver anexo II).

V.2.7 Diagramas de análisis experimental

La Figura 9 representa el trabajo que llevó a cabo la tesista Indira Guadalupe Rodríguez Cervantes.

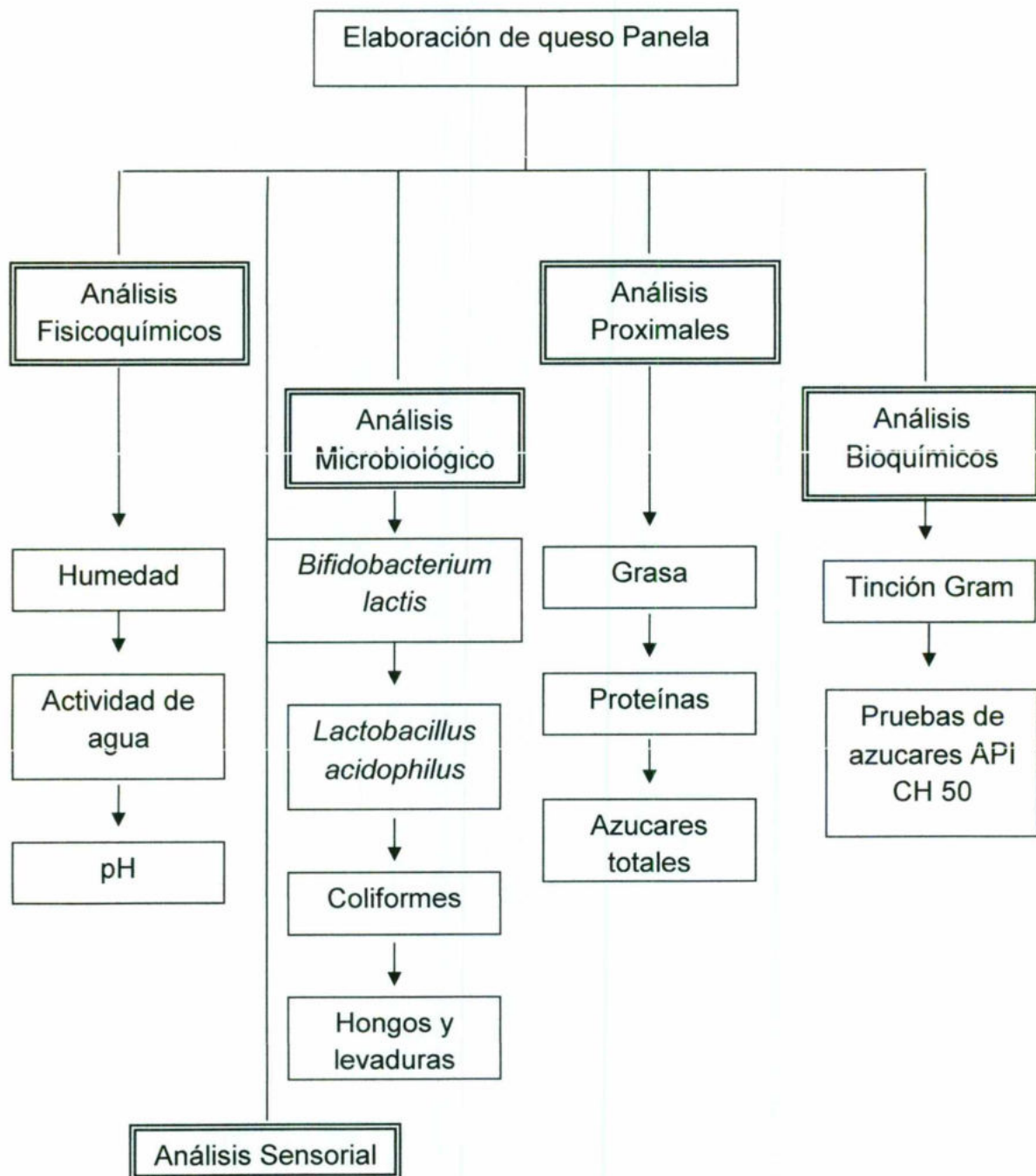


Figura 9. Elaboración y análisis de queso Panela.

La Figura 10 representa el trabajo que llevó a cabo la tesista Evelin Saldaña Valerio llevará acabo.

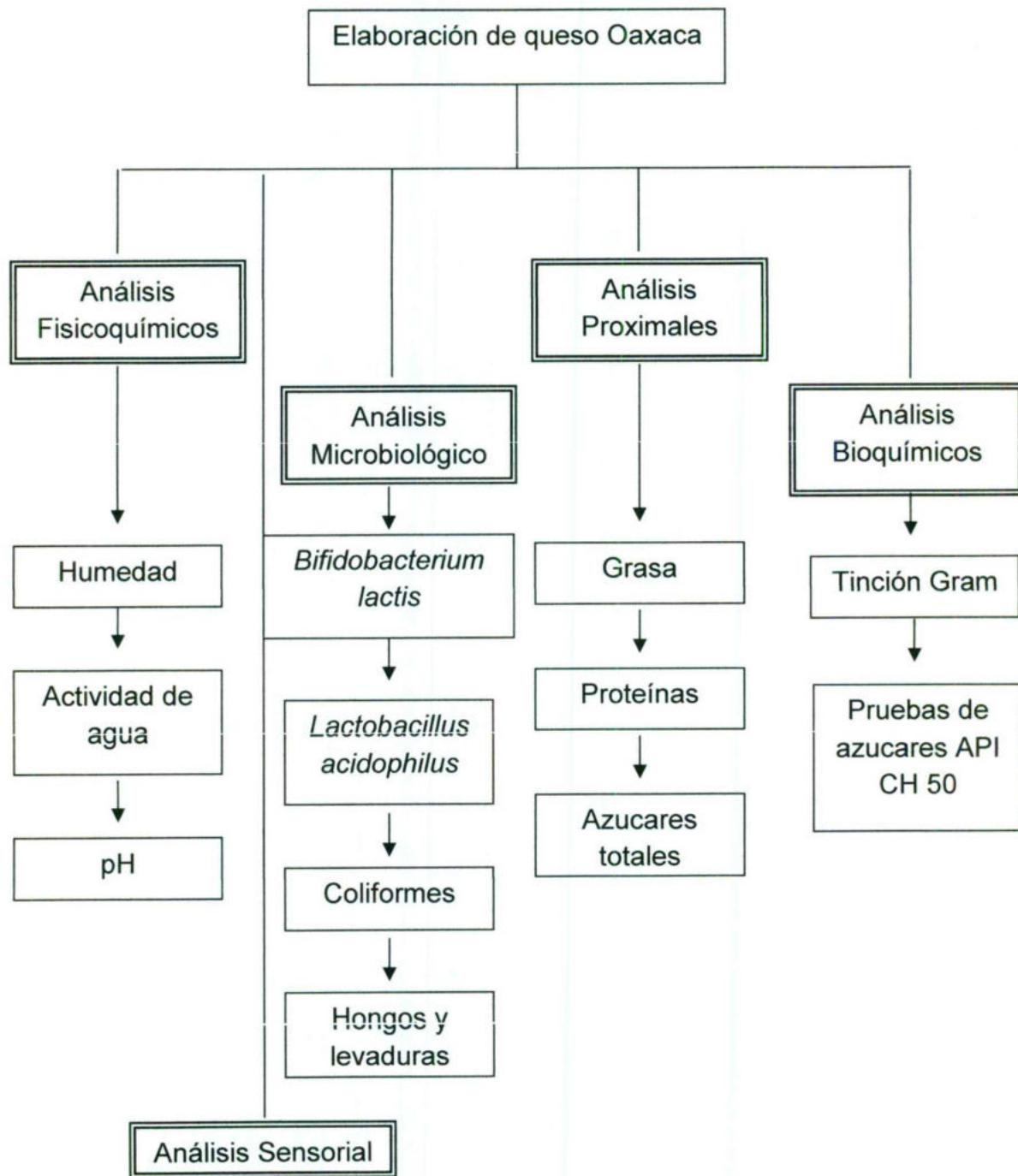


Figura 10. Elaboración y análisis de queso Oaxaca.

VI. RESULTADOS

VI.1 Elaboración de queso Panela y Oaxaca

La elaboración del queso Panela y Oaxaca se llevó a cabo en El Marqués, Qro. e Irapuato, Gto. respectivamente; con la ayuda de equipo especializado y personal capacitado, en la Figura 11 y 12 se muestra el proceso de producción que se llevó a cabo para cada queso.

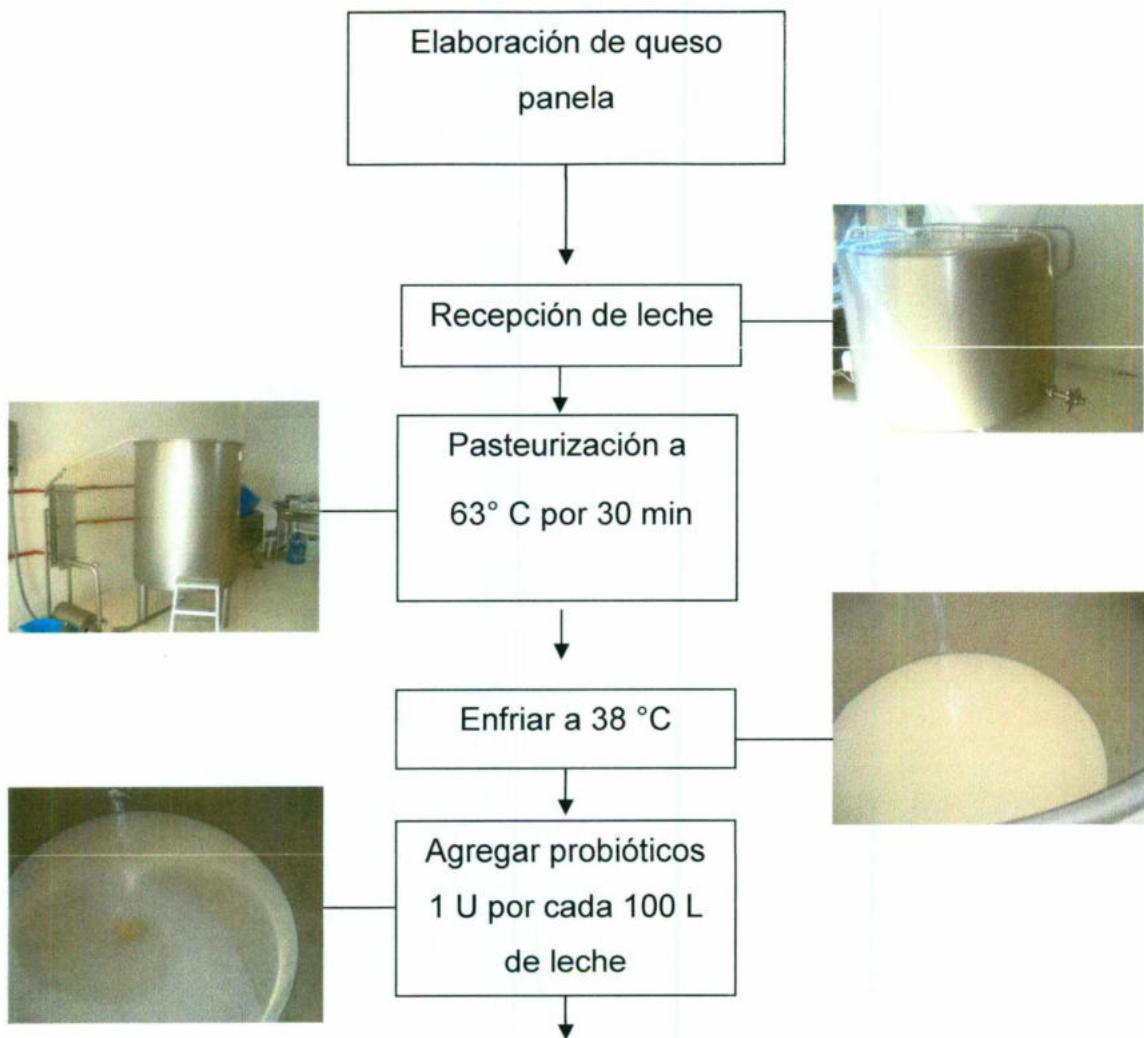


Figura 11. Diagrama de la elaboración de queso Panela deslactosado añadido con cepas probióticas.

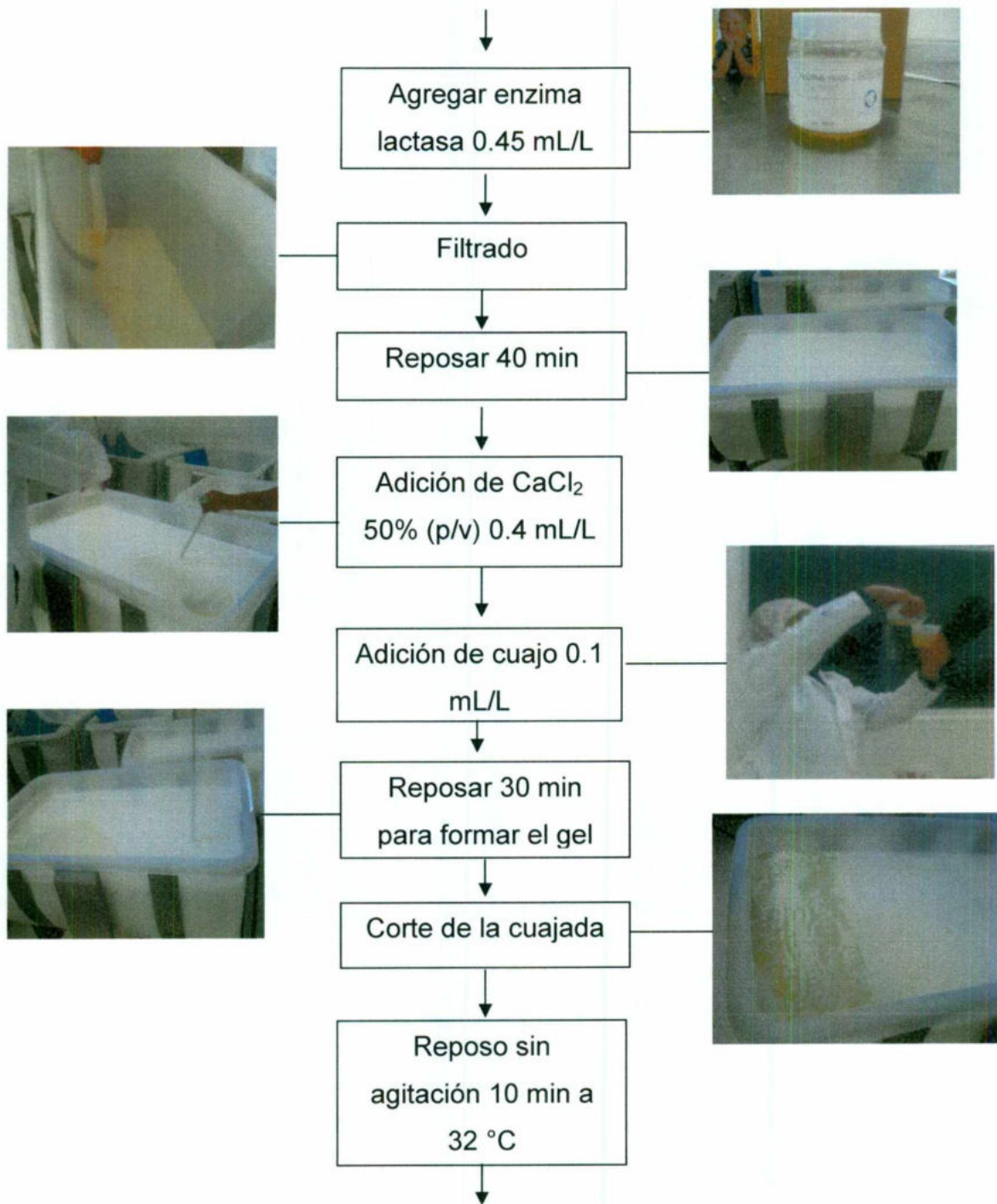


Figura 11. Diagrama de la elaboración de queso Panela deslactosado añadido con cepas probióticas (continúa).

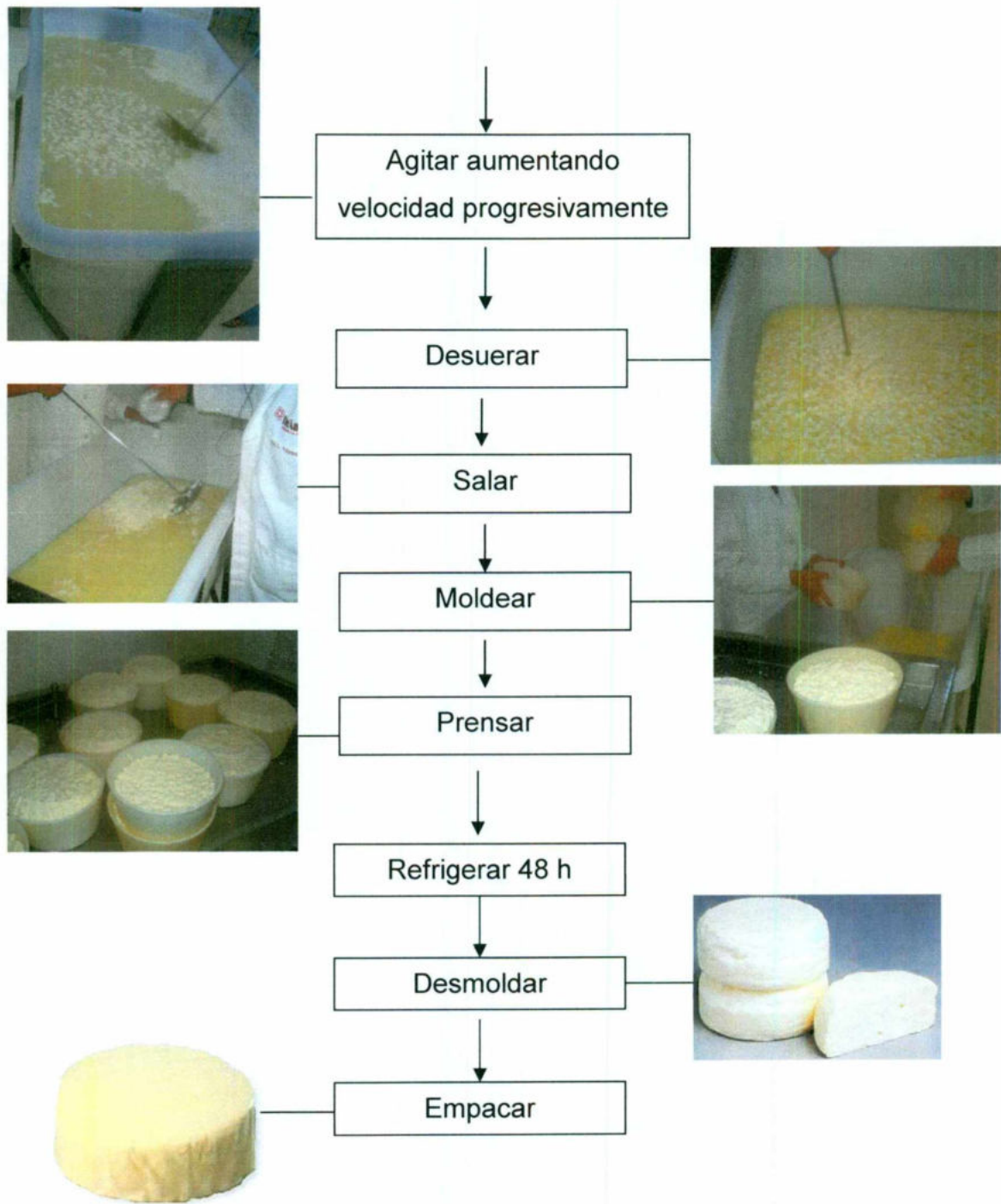


Figura 11. Diagrama de la elaboración de queso Panela deslactosado añadido con cepas probióticas (continúa).

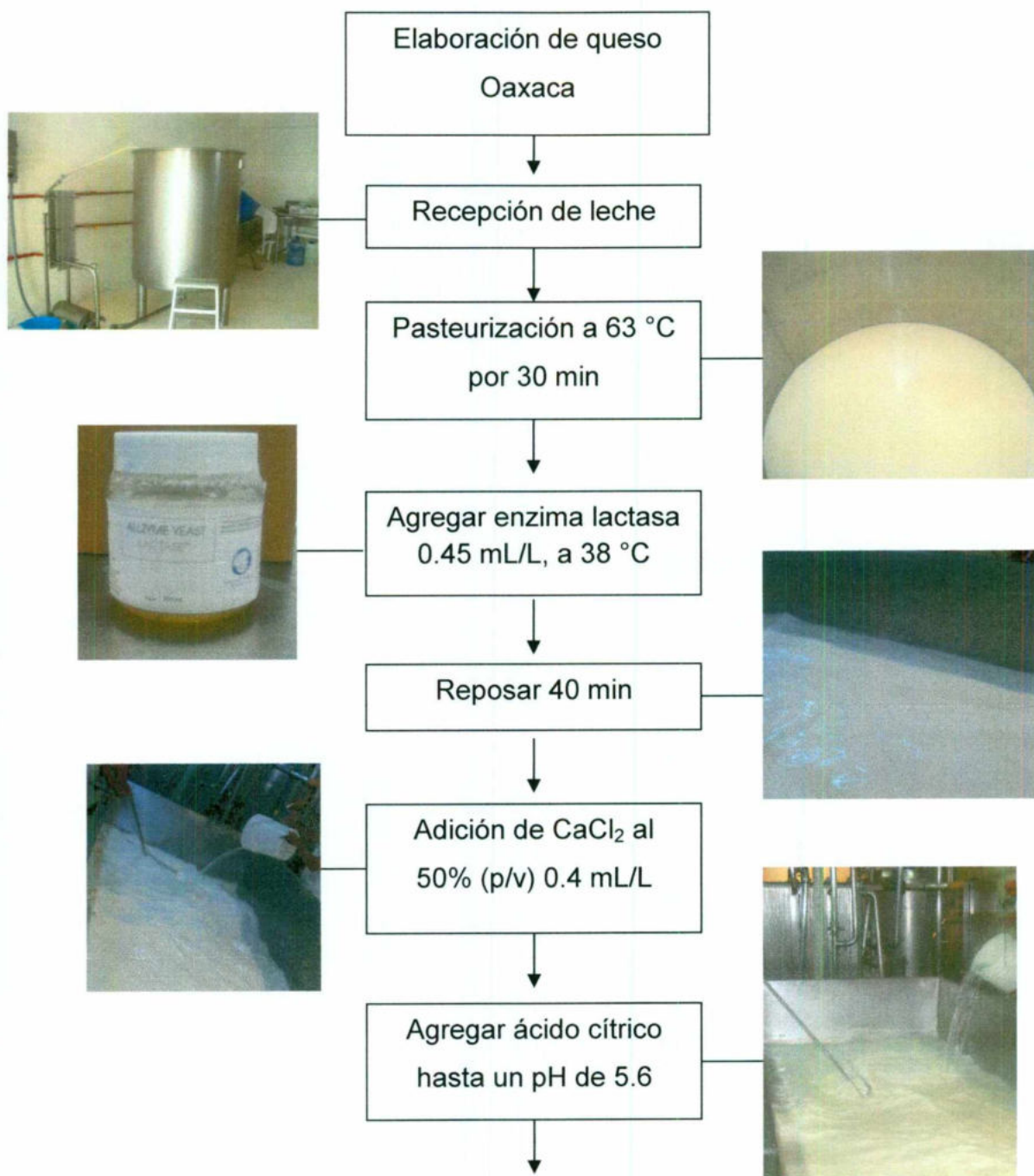


Figura 12. Diagrama de elaboración de queso Oaxaca deslactosado añadido con cepas probióticas.

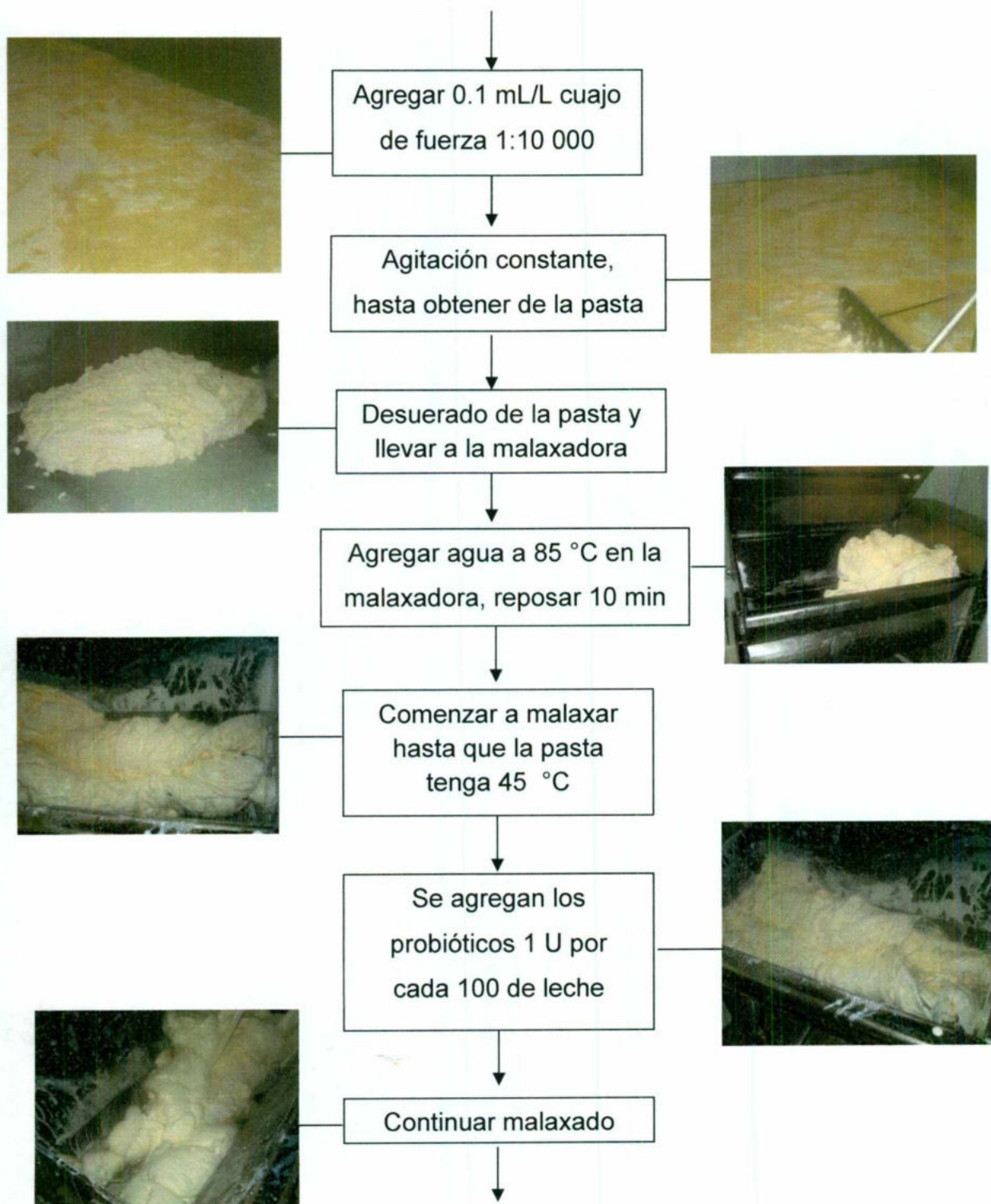


Figura 12. Diagrama de elaboración de queso Oaxaca deslactosado añadido con cepas probióticas (continúa).

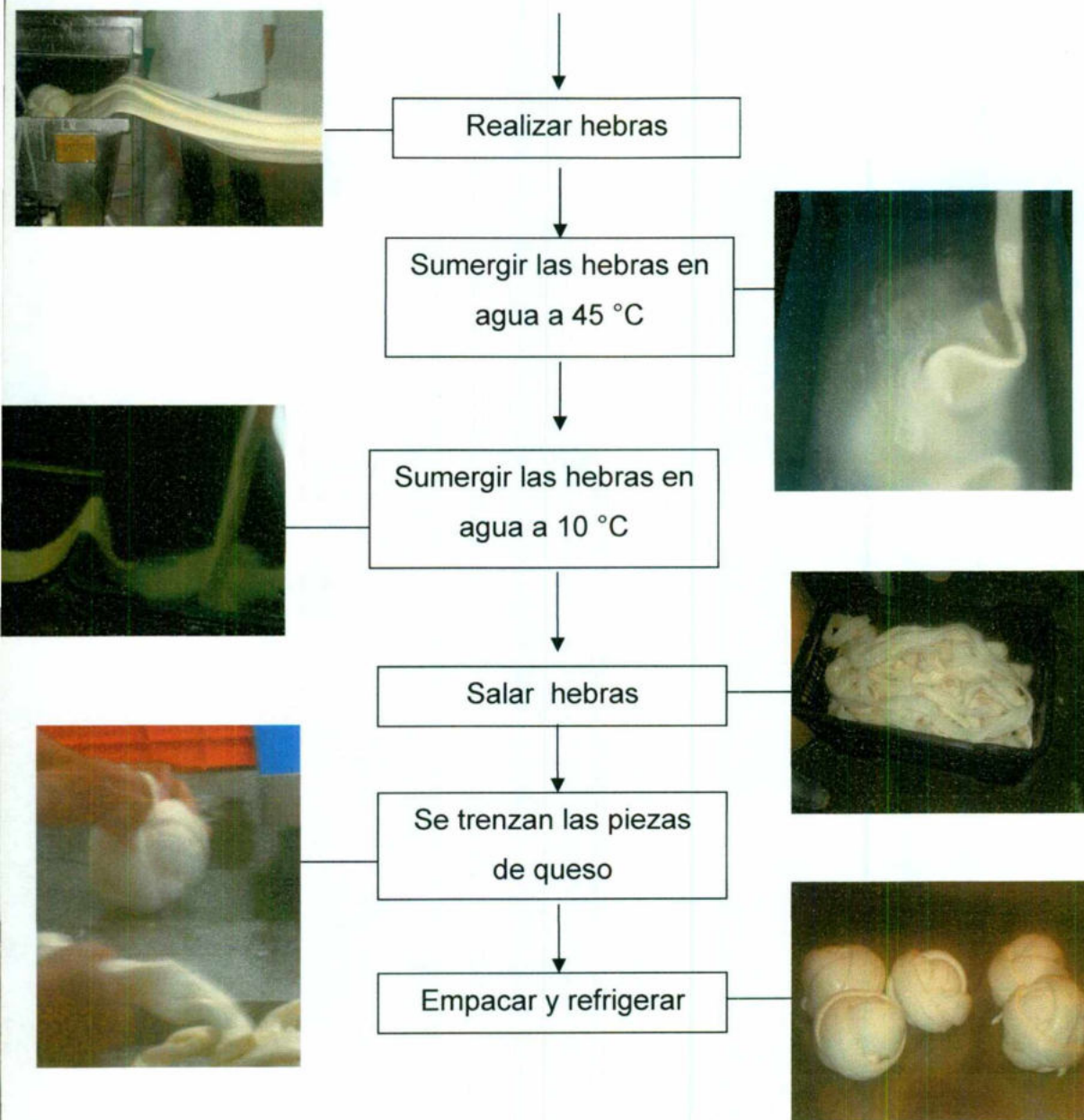


Figura 12 Diagrama de elaboración de queso Oaxaca deslactosado añadido con cepas probióticas (continúa).

El proceso de elaboración de los quesos presenta mermas debido a que la principal materia prima (leche) no es utilizada al 100%, pues de ella solo es posible emplear la caseína, en el Cuadro 8 se muestran los rendimientos de producción de los queso deslactosados añadidos con probióticos Panela y Oaxaca respectivamente,

así como un comparativo de sus precios contra quesos comerciales que no contienen cepas probióticas y no han sido deslactosados.

Cuadro 8. Porcentaje de rendimiento y costo de queso Oaxaca y Panela

Tipo de queso	Leche procesada (kg)	Queso obtenido (kg)	Rendimiento (%)	Precio sin probióticos* (\$/kg)	Precio con probióticos (\$/kg)
Panela	185	23	12.39	93	100
Oaxaca	309	32	10.34	95	100

*Profeco 2009

VI.2 Análisis fisicoquímicos

En el Cuadro 9 se muestran las propiedades fisicoquímicas analizadas del queso Panela deslactosado con *L. acidophilus* y *B. lactis* a lo largo del almacenamiento a 4° C por 30 días, donde se reporta el valor promedio de cada análisis efectuado a tres quesos del mismo lote \pm el límite de confianza (LC) con $\alpha=0.05$ (Ver anexo III).

El porcentaje de humedad del queso Panela a los 0 d de almacenamiento fue de 53.37 aumentando a los 15 d a 56.29 y finalmente disminuyendo a los 30 d a 54.28. La actividad de agua a los 0 d fue de 0.965, aumentando a 0.970 a los 15 d y al final del análisis incremento a 0.973. Los valores de pH a lo largo del estudio fueron disminuyendo, al inicio del análisis fue de 6.54, posteriormente de 6.08 y a los 30 d de almacenamiento fue de 5.94.

Las propiedades fisicoquímicas analizadas del queso Oaxaca deslactosado con *L. acidophilus* y *B. lactis* se presentan en el Cuadro 10 donde se reporta el valor promedio de cada análisis efectuado a tres quesos del mismo lote \pm LC con $\alpha=0.05$.

Cuadro 9. Propiedades fisicoquímicas de queso Panela a lo largo del almacenamiento a 4° C al vacío por 30 d.

Tiempo(d)	Humedad (%)	Actividad de agua	pH
0	53.37 ± 1.25	0.965 ± 0.004	6.54± 0.09
15	56.29 ± 1.47	0.970 ± 0.007	6.08± 0.11
30	54.28 ± 1.21	0.973 ± 0.004	5.94 ± 0.11

Los valores del porcentaje de humedad fueron de 50.60, 52.46 y 51.72 a los 0, 15 y 30 d respectivamente.

La actividad de agua presentó variaciones poco significativas, ya que mostró el mismo patrón que la humedad inicial de 0.960, aumentando ligeramente a 0.962 a los 15 d y disminuyendo a 0.957 a los 30 d. El pH presentó un patrón de reducción a lo largo del análisis comenzado a los 0 d con un valor de 6.19, posteriormente sin mostrar diferencia significativa a los 15 d fue de 5.96 y a los 30 d de 5.94.

La composición de leche con la cual fue elaborado el queso Panela y Oaxaca respectivamente, así como la composición final de ambos quesos se presentan en el Cuadro 11, donde se reporta el valor promedio de cada análisis efectuado a tres quesos del mismo lote ± el LC con $\alpha=0.05$.

VI. 3 Análisis proximal

El análisis proximal llevado a cabo al queso Panela mostró el valor de 20.8% de grasa y 20.4 de proteína. El queso Oaxaca presentó un porcentaje de grasa de 18.44 y un valor de proteína de 18.7%.

Cuadro 10. Propiedades fisicoquímicas de queso Oaxaca a lo largo del almacenamiento a 4° C al vacío por 30 d.

Tiempo (d)	Humedad (%)	Actividad de agua	pH
0	50.60 ± 0.39	0.960 ± 0.005	6.19 ± 0.11
15	52.46 ± 0.27	0.962 ± 0.004	5.96 ± 0.09
30	51.72 ± 0.47	0.957 ± 0.004	5.94 ± 0.08

Cuadro 11. Composición de leche con la cual fue elaborado el queso Panela y Oaxaca respectivamente, así como la composición final de ambos quesos.

	Grasa (%)		Proteína (%)	
	Leche	Queso	Leche	Queso
Panela	4.32	20.8 ± 2.43	3.13	20.4 ± 0.1
Oaxaca	2.8	18.4 ± 1.22	2.64	18.7 ± 0.4

En el Cuadro 12 Se muestran los valores de azúcares totales presentados por ambos quesos deslactosados con bacterias probióticas, se reporta el valor promedio del análisis realizado a tres quesos del mismo lote ± LC, con $\alpha=0.05$.

La medición de azúcares totales realizada al queso Panela y Oaxaca durante los 0, 15 y 30 d con diferencia significativa los siguientes valores fueron de 0.047, 0.20 y 0.019 respectivamente para el queso Panela, en tanto que en el queso Oaxaca fue de 0.059, 0.026 y 0.20 respectivamente para cada tiempo, con diferencia significativa.

Cuadro 12. Medición de azúcares totales a los quesos Panela y Oaxaca

Tiempo (d)	Panela Azúcares totales (%)	Oaxaca Azúcares totales (%)
0	4.7 ± 0.005	5.9 ± 0.017
15	2.0 ± 0.003	2.6 ± 0.005
30	1.9 ± 0.003	2.0 ± 0.002

VI. 4 Recuento de microorganismos

VI. 4.1 Análisis microbiológicos de grupos indicadores: Panela y Oaxaca

El queso es una matriz rica en nutrientes razón por la cual en ella se desarrollan distintos géneros y especies de microorganismos, dicha diversidad y cantidad dependerá de factores como: condiciones sanitarias en las cuales se realizó su producción, el tipo de materias primas que se emplearon, la maduración del queso (en caso de existir), el empleo de cepas iniciadoras o adjuntas y el tiempo transcurrido hasta el muestreo y ejecución del análisis. Dentro de esta variedad de microorganismos son de interés los llamados indicadores ya que nos muestran un panorama respecto a las prácticas sanitarias que se implementaron durante el proceso de elaboración de los quesos. Dentro del grupo de los indicadores, los más comúnmente utilizados son hongos, levaduras, bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y coliformes fecales.

Debido a fines prácticos se ha decidido utilizar como microorganismos indicadores en el presente estudio a hongos, levaduras y coliformes fecales, excluyendo a bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales.

Las bacterias mesófilas aerobias incluyen todas aquellas células que muestran capacidad para formar colonias viables, razón por la cual esta cuenta no sería confiable debido a que los quesos analizados están adicionados con bacterias probióticas, lo que provoca un aumento en el recuento de UFC/g y por lo tanto los datos obtenidos serían poco confiables para nuestros fines.

Fernández (2000) define a los coliformes totales como bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 horas a 35 °C, esta definición pretende involucrar bacterias de hábitat intestinal, sin embargo otros microorganismos cumplen con lo establecido en ella, por lo que para ser más específicos se optó por efectuar un recuento de coliformes fecales ya que estos son un grupo indicador más confiable, pues son más resistentes al medio ambiente, agentes químicos y factores que favorecen o impiden su desarrollo. El Cuadro 13 muestra los resultados obtenidos de los grupos indicadores presentes al analizar el queso Panela y Oaxaca, con la finalidad de conocer las prácticas sanitarias que se llevaron a cabo en su proceso de elaboración.

VI. 4.2 Análisis microbiológicos de cepas probióticas en queso Panela

En queso Panela la cuenta inicial de *L. acidophilus* fue de 3.4×10^5 UFC/g, 9.9×10^6 a los 15 d y aumentó a los 30 d a 1.04×10^8 UFC/g, lo cual es posible apreciarse en la Figura 13, en donde es claro observar el aumento logarítmico a lo largo de sus 30 d de anaquel a 4 °C empacados al vacío.

Por otro lado la cuenta de *B. lactis* a los 0 d fue de 4.9×10^5 UFC/g, 4.5×10^7 UFC/g a los 15 d, mientras que a los 30 d el recuento celular reportó 2.8×10^8 UFC/g, en la Figura 13 es apreciable éste aumento logarítmico a lo largo de su almacenamiento, bajo las condiciones establecidas.

Cuadro 13. Evaluación de UFC/g de hongos, levaduras y coliformes fecales en queso Oaxaca y Panela como estándar de calidad sanitaria.

Queso	Hongos UFC/g	Levaduras UFC/g	Coliformes Fecales NMP/g
Panela	334 ± 11	447 ± 25	107 ± 19
Oaxaca	< 10	220 ± 20	72 ± 6

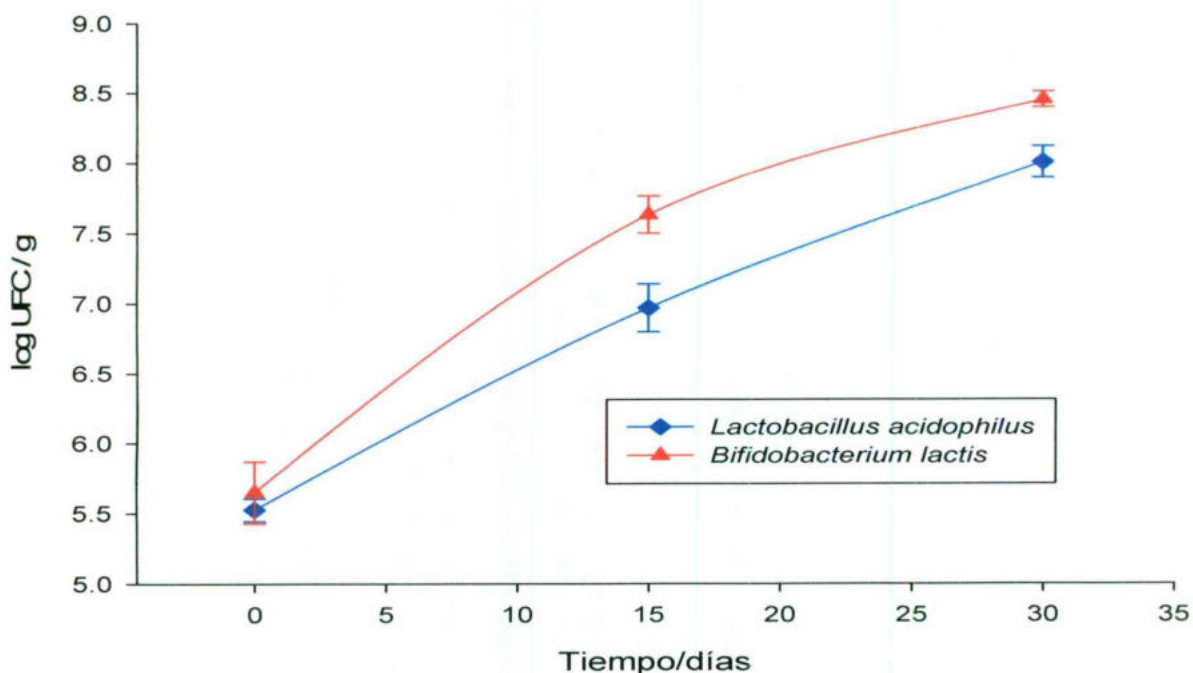


Figura 13. Evolución de la población de bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. lactis*, en queso Panela durante 30 d de almacenamiento a 4 °C, empacados al vacío.

En la Figura 14 se muestran distintas diluciones en las cuales puede apreciarse la morfología de las colonias de *L. acidophilus* y *B. lactis* en queso Panela, que presentaron a lo largo de los 30 d de almacenamiento a 4 °C.

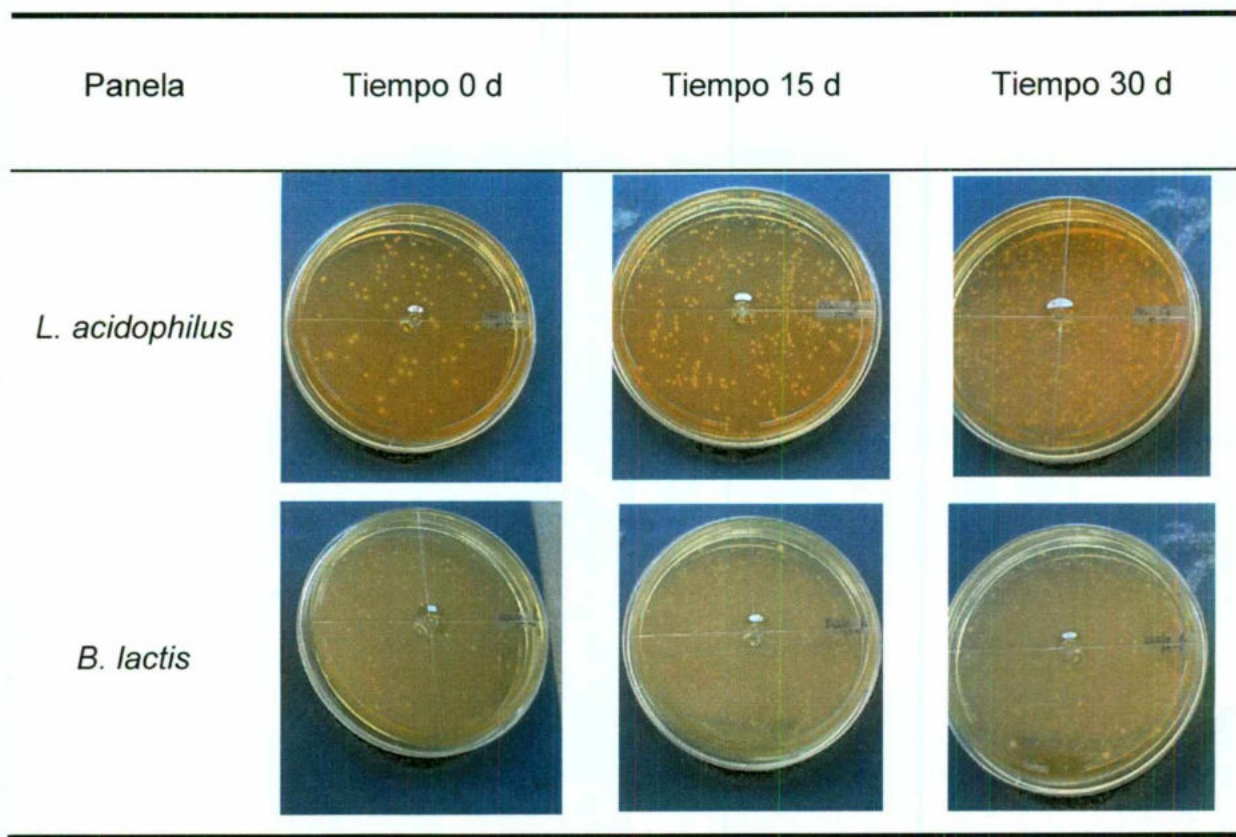


Figura 14. Fotografías del análisis microbiológicos de *L. acidophilus* y *B. lactis* respectivamente, tomadas a distintos tiempos durante los 30 d de almacén de queso Panela.

VI.4.3 Análisis microbiológicos de cepas probióticas en queso Oaxaca

La cuenta inicial de *L. acidophilus* en queso Oaxaca fue de 1.6×10^7 UFC/g, 2.1×10^8 a los 15 d y aumento a los 30 d a 2.2×10^8 UFC/g, este crecimiento bacteriano se muestra la Figura 15 en donde claramente se aprecia que del tiempo 0 d a los 15 d el aumento de UFC/g de esta cepa probiótica es de apenas 1 \log_{10} , y de los 15 d a

los 30 d, no presento un aumento logarítmico en la cuenta bacteriana, pese a ello los $8 \log_{10}$ cuantificados a los 15 d se mantuvieron hasta los 30 d.

El recuento de *B. lactis* a los 0 d fue de 3.2×10^6 UFC/g, 2.2×10^8 UFC/g a los 15 d, mientras que a los 30 d la cuenta fue de 3×10^8 UFC/g, la Figura 13 se presenta la curva de dicho crecimiento logarítmico.

En la Figura 16 se muestran fotografías de distintas diluciones que se tomaron a lo largo del análisis microbiano de estas cepas probióticas, en las cuales es posible apreciar la morfología tanto de *L. acidophilus* como de *B. lactis* en queso Oaxaca que presentaron a lo largo de 30 d de anaquel a 4 °C.

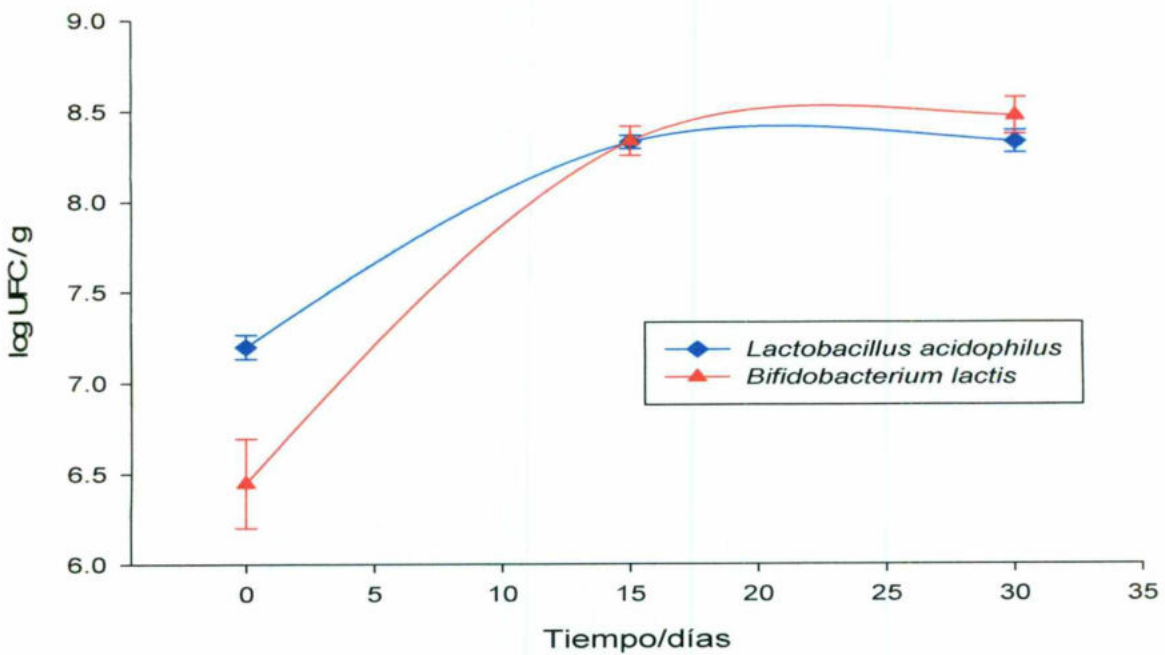


Figura 15. Evolución de la población de bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. lactis*, en queso Oaxaca durante 30 d de almacenamiento a 4 °C, empacados al vacío.

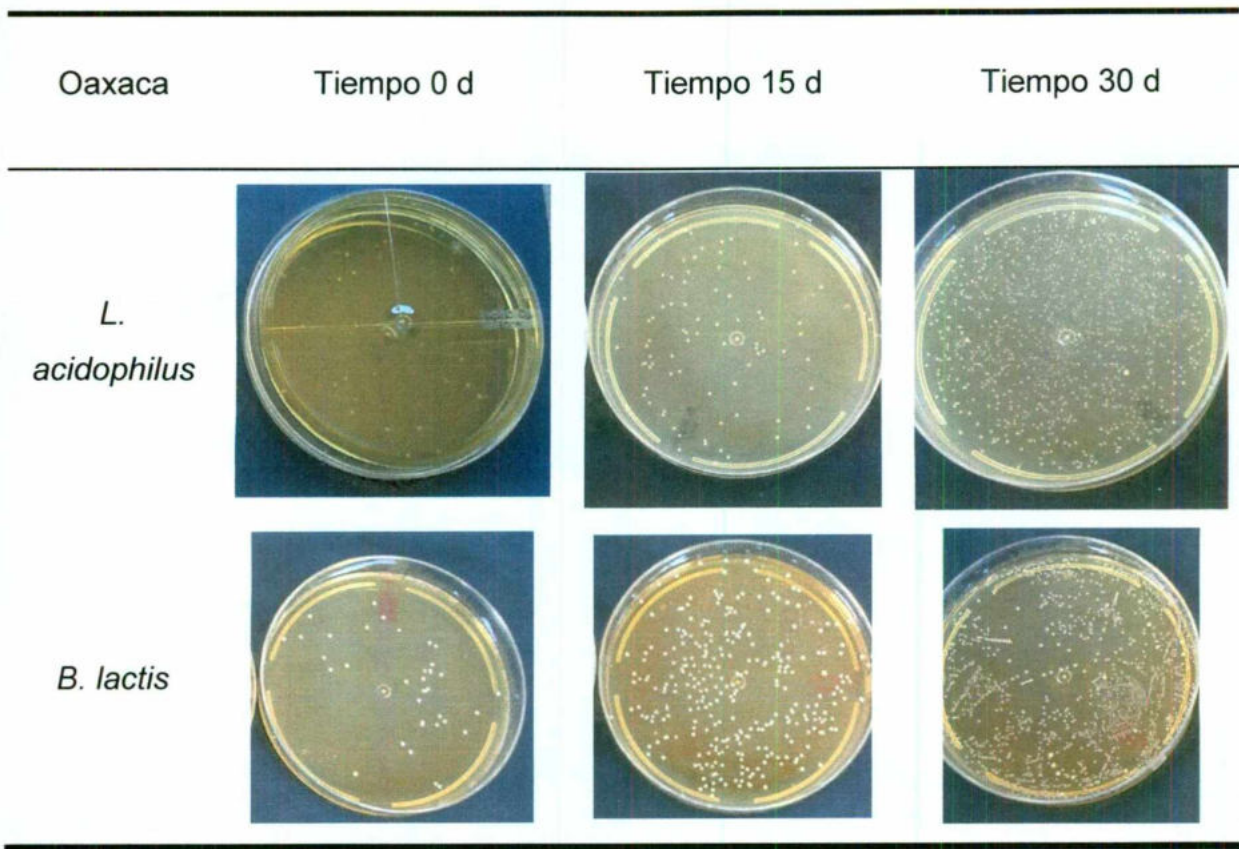


Figura 16. Fotografías del análisis microbiológicos de *L. acidophilus* y *B. lactis* respectivamente, tomadas a distintos tiempos durante los 30 d de almacén de queso Oaxaca.

VI. 5 Identificación de cepas probióticas

Existen diferentes caracteres para la identificación y clasificación bacteriana, los más tradicionalmente utilizados son los morfológicos, bioquímicos y fisiológicos.

Los morfológicos nos permiten la observación bacteriana mediante el microscopio, lo cual nos revela la forma de las células individuales y la disposición característica que éstas adoptan. La tinción Gram pone de manifiesto un carácter morfológico significativo, ya que nos indica si la bacteria tiene o no una membrana externa y si tiene una pared de peptidoglicano gruesa o fina, logrando con ello distinguir a las bacterias en Gram positivas o Gram negativas. Los análisis bioquímicos y

fisiológicos utilizados para clasificar a las bacterias se basan en las condiciones que permiten su crecimiento. Las fuentes de carbono que permiten el crecimiento bacteriano constituyen un conjunto de caracteres particularmente útiles, ya que la mayoría de las bacterias pueden utilizar muchas fuentes de carbono distintas (Ingraham y Ingraham, 1998).

Los sistemas de identificación del comercio reemplazaron en gran parte las compilaciones de medios de prueba y sustratos preparados en el laboratorio para la identificación bacteriana, éste reemplazo se debió a la evolución continua de los sistemas comerciales para maximizar la velocidad y por conveniencia ya estos kits cuentan con base de datos que las pruebas de laboratorio convencionales no tienen.

Se realizaron pruebas bioquímicas a las cepas aisladas de *L. acidophilus* y *B. lactis*, mediante el empleo del kit API 50 CH, los resultados obtenidos se encuentran en los Cuadros 14 y 15 respectivamente, en donde se destacan las similitudes entre los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicos y lo reportado en la literatura.

La Figura 17 muestra las galerías de la pruebas bioquímicas (API 50 CH) que se realizaron a la cepa de *L. acidophilus* y *B. lactis* respectivamente, en donde se aprecia de forma clara los cambios de color que cada cepa analizada presentó, debido a la capacidad o incapacidad que cada cepa presenta para lograr hidrolizar a los azúcares presentes en cada uno de los tubos de dicha galería. En la Figura 18 se observan fotografías de tinción Gram realizado a *L. acidophilus* y *B. lactis* respectivamente, estas fueron obtenidas con él a el uso del microscopio AxiosKop 40-Zeiss. En dichas fotografías es posible apreciar la morfología de estas células, las cuales muestran forma de bacilo para ambas cepas, sin embargo tienden a tener una ligera forma cocoide.

Cuadro 14. Carbohidratos fermentados por cepas de *L. acidophilus* (Buchanan y Gibbons, 1974; Sneath y col., 1986).

Carbohidratos	Respuesta según literatura	Respuesta según experimento
Amigdalina	+	-
Celobiosa	+	-
Arabinosa	-	-
Esculina	+	-
Fructosa	+	+
Galactosa	+	+
Glucosa	+	+
Gluconato	-	+
Lactosa	+	+
Maltosa	+	+
Manitol	-	-
Manosa	+	+
Melesitiosa	-	-
Melibiosa	d*	+
Rafinosa	d	+
Ramnosa	-	-
Ribosa	-	-
Salicina	+	-
Sorbitol	-	-
Sacarosa	+	+
Trehalosa	+	+
Xilosa	-	+
% de pruebas que coinciden		72

*d=11-89% cepas positivas

Cuadro 15. Carbohidratos fermentados por cepas *B. lactis*, (Buchanan y Gibbons, 1974; Sneath y col., 1986).

Carbohidratos	Respuesta según literatura	Respuesta según experimento
Almidón	+	-
L-Arabinosa	+	-
Celobiosa	d*	-
Fructosa	+	+
Galactosa	+	+
Gluconato	-	-
Inulina	-	-
Lactosa	+	+
Maltosa	+	+
Manitol	-	+
Manosa	d*	+
Melesitiosa	d*	-
Melibiosa	+	-
Rafinosa	+	-
D- Ribosa	+	+
Salicina	+	+
Sorbitol	-	-
Sacarosa	+	+
Trehalosa	d*	+
Xilosa	+	+
% de pruebas que coinciden		75

* d= 11-89% cepas positivas

Bioquímicas

Lactobacillus acidophilus

Bifidobacterium lactis

api CH 50

0 horas



api CH 50

48 horas



Figura 17. Fotografías tomadas a las 0 y 48 h de las pruebas api 50CH realizada a *L. acidophilus* y *B. lactis* respectivamente.

VI. 6 Análisis sensorial

Ambos quesos fueron evaluados por un panel no entrenado de 100 personas de entre 19 y 64 años, los cuales fueron considerados como consumidores regulares del producto. Este análisis se llevo a cabo a los 0 d de ambos quesos y posteriormente a los de 15 d de almacenamiento el queso Oaxaca fue nuevamente analizado.

Lactobacillus acidophilus

Bifidobacterium lactis

Tinción Gram

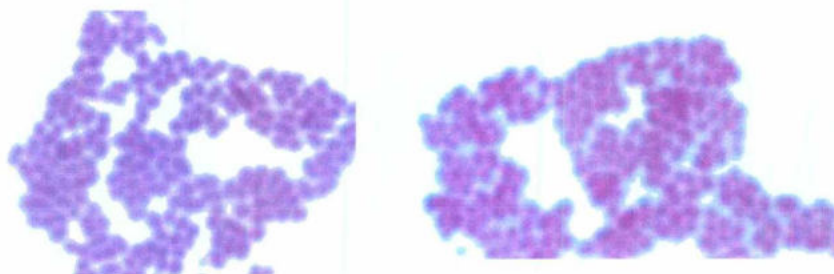


Figura 18. Fotografías de tinción Gram realizada a ambas bacterias probióticas.

En la prueba se evaluó el agrado del aroma, sabor y la consistencia de la muestra. Finalmente relacionando estas características se cuestionó acerca del agrado general del producto para determinar si el consumidor lo compraría.

Las muestras fueron proporcionadas de forma aleatoria. La cantidad de muestra fue de 1 a 2 g, se entregó 1 muestra por persona. La escala de aceptación fue de 7 cm. Se le otorgo la descripción de desagradable al valor de 0, el valor de 3.5 para indiferente y agradable para el valor de 7 en la escala presentada. Posteriormente se asigno la calificación del 1 al 10, de acuerdo con la medida determinada por cada evaluador en la escala para cada característica evaluada.

VI. 6.1 Análisis sensorial del queso Panela

En el Cuadro 16 y Figura 19 se presentan las calificaciones de las características evaluadas aroma y sabor incluyendo el agrado general del queso Panela y el número de consumidores que estarían dispuestos a comprar el producto.

El panel de consumidores al evaluar el queso Panela a los 0 d otorgó la calificación de 6.61 para el aroma, 5.76 para el sabor y 5.92 al agrado general, la consistencia

fue descrita como moderadamente suave por el 46% de los consumidores, como moderadamente dura por el 39%, suave por el 8% y dura por el 7%. El 52% del panel evaluador afirmó estar dispuesto a comprar el queso Panela deslactosado con bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. lactis*, de acuerdo con las características generales evaluadas del queso.

Cuadro 16. Calificación otorgada por el panel evaluador al queso Panela a los 0 d.

Característica	Calificación	
Aroma	6.61	
Sabor	5.76	
Agrado general	5.92	
Lo compraría	Si	No
	52	48

VI.6.2 Análisis sensorial del queso Oaxaca

En el Cuadro 17, Figura 20 y 21 se presentan las calificaciones de las características evaluadas aroma y sabor incluyendo el agrado general y la descripción asignada a la consistencia del queso Oaxaca y el número de consumidores que estarían dispuestos a comprar el producto.

Las calificaciones concedidas por los consumidores al queso Oaxaca a los 0 d, fueron de 6.88 para el aroma, 6.71 al sabor y 6.55 al agrado general, el 42% del panel identificó la consistencia como moderadamente dura, el 24% moderadamente suave, 20% dura y el 14% suave. El 73% de los consumidores aseveró compraría el queso Oaxaca deslactosado con bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. lactis*.

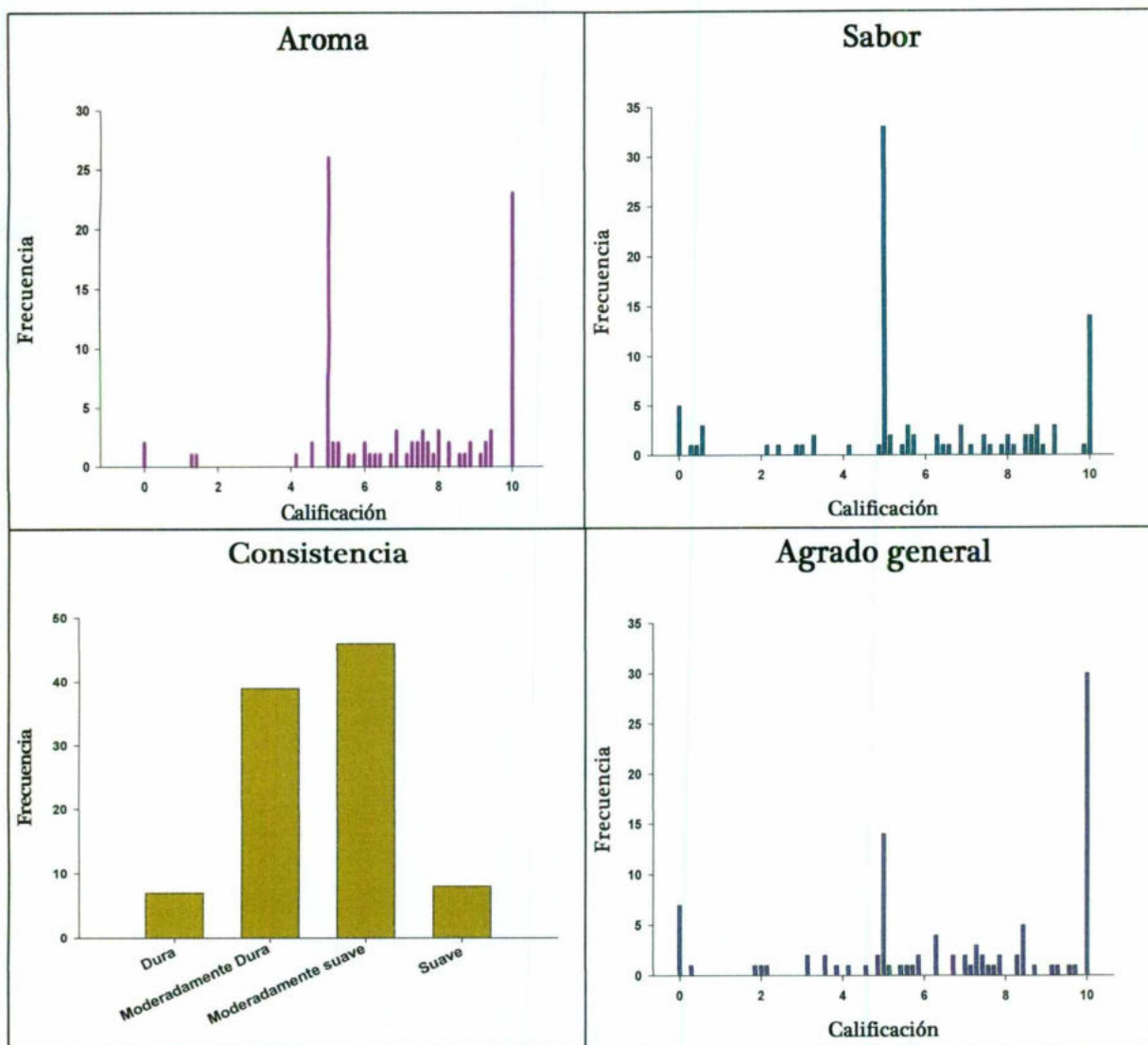


Figura 19. Calificaciones asignadas por los consumidores a las características evaluadas en el análisis sensorial realizado al queso al Panela deslactosado con bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. lactis*.

El análisis realizado al queso Oaxaca a los 15 d, dio como resultado las siguientes calificaciones: 6.9 para el aroma, 7.29 al sabor y 7.18 al agrado general, la descripción dada a la consistencia por los consumidores a los 15 d de almacenamiento de este queso fue de moderadamente dura por el 38%, 34% para moderadamente suave, el 11% dura y el 17% la consideró como suave.

Cuadro 17. Calificación otorgada por el panel evaluador al queso Oaxaca a los 0 y 15 d.

Característica	Oaxaca (0 d) Calificación		Oaxaca (15 d) Calificación	
Aroma	6.88		6.90	
Sabor	6.71		7.29	
Agrado general	6.55		7.18	
Lo compraría	Si	No	Si	No
	73	27	84	16

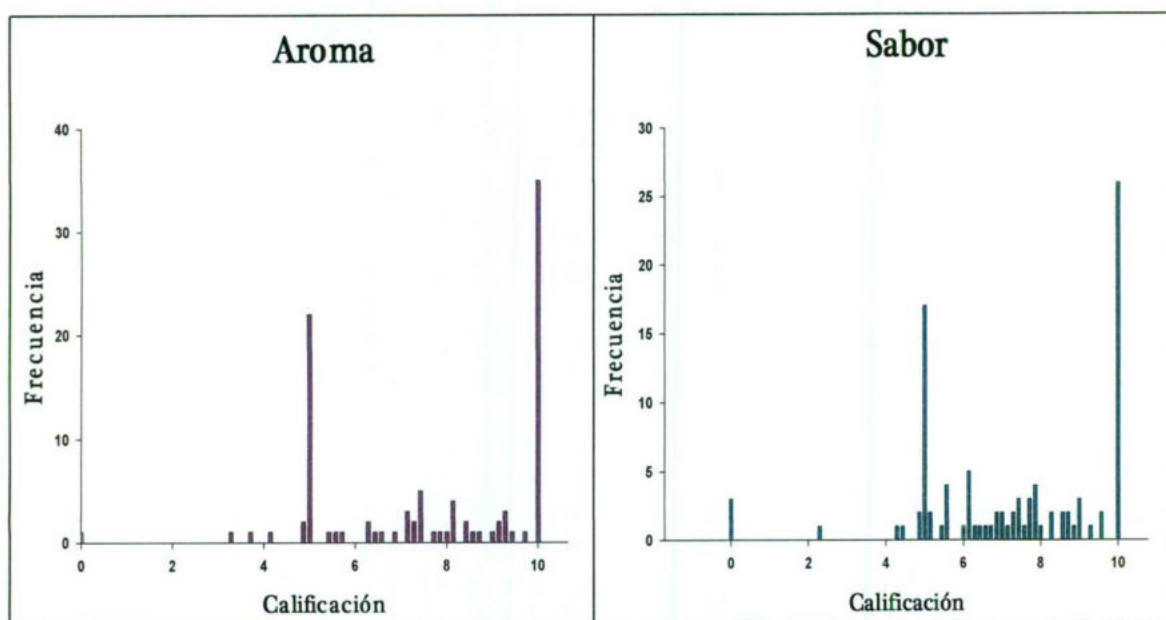


Figura 20. Calificaciones asignadas por los consumidores a las características evaluadas en el análisis sensorial realizado al queso al Oaxaca deslactosado con bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. lactis* a los 0 d.

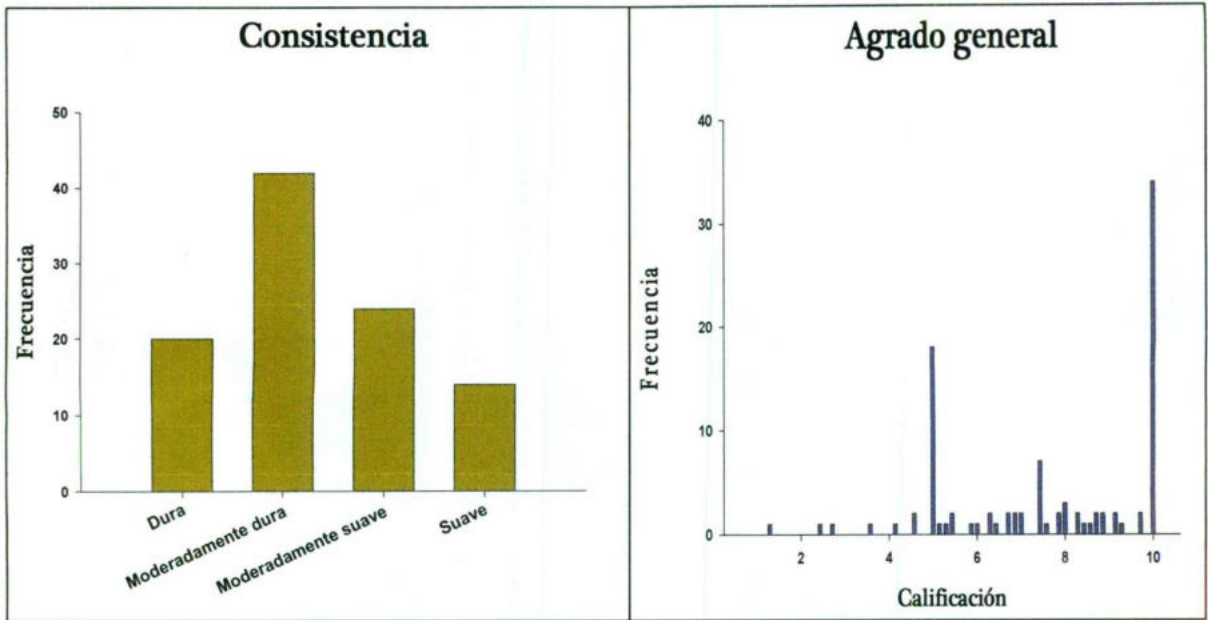


Figura 20. Calificaciones asignadas por los consumidores a las características evaluadas en el análisis sensorial realizado al queso al Oaxaca deslactosado con bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. lactis* a los 0 d (continúa).

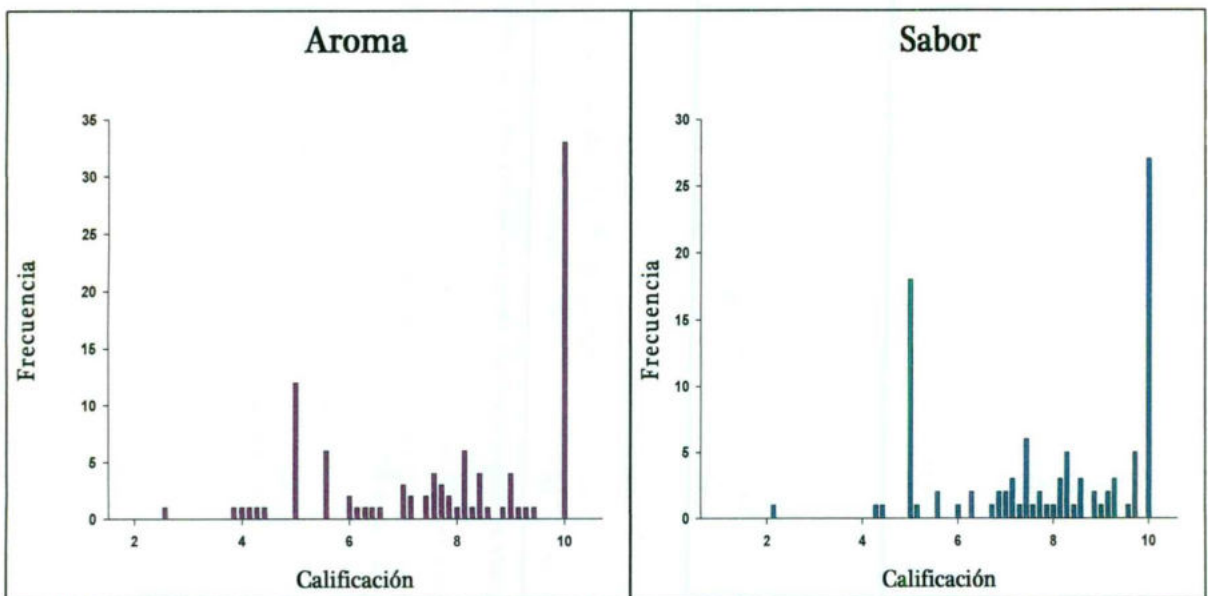


Figura 21. Calificaciones asignadas por los consumidores a las características evaluadas en el análisis sensorial realizado al queso al Oaxaca deslactosado con bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. lactis* a los 15 d.

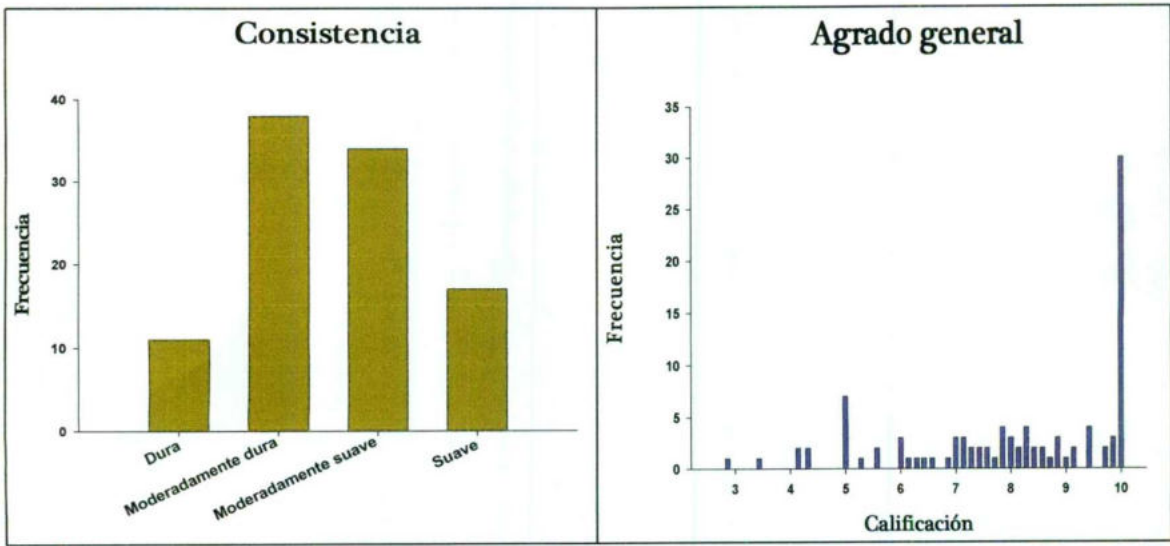


Figura 21. Calificaciones asignadas por los consumidores a las características evaluadas en el análisis sensorial realizado al queso al Oaxaca deslactosado con bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. lactis* a los 15 d (continúa).

VII. DISCUSIÓN

VII. 1 Elaboración de queso Panela y Oaxaca

El rendimiento y valor nutricional de los quesos cambia según el contenido de proteína y materia grasa en la leche. La composición de ésta es muy variable razón por la que no todas las leches son apropiadas para obtener el mejor rendimiento en la elaboración de quesos. Los factores que más influyen en dicha variación son: raza, ciclo de lactación, cantidad y composición del alimento, edad, ordeña, ejercicio, enfermedades así como cambios climáticos (Judikins, 1975).

Sin embargo existen otros factores en el proceso de producción que afectan dicho rendimiento como lo es el desuerado, ya que si en esta etapa la agitación no es adecuada habrá pérdidas de proteína en el suero. Debe también procurarse tener la menor cantidad de residuos durante la fabricación de queso para lograr un mayor rendimiento en la producción.

El rendimiento en queso Panela fue de 12.34% mientras que el de queso Oaxaca fue de 10.34 % (Cuadro 8). Según Alais (1998), el porcentaje de rendimiento en queso de pasta blanda es más alto que el de pasta cocida debido a que en este último hay pérdidas importantes en el desuerado y residuos de caseína.

Los precios de queso deslactosado Panela y Oaxaca añadidos de cepas probióticas se ofertan en \$ 100.00 M.N. por kilogramo (Cuadro 8). Al realizar un comparativo con respecto a otras marcas comerciales como lo son, Nochebuena, Volcanes, Alpura, Caperucita, Esmeralda, la Villita, Chalet y Franja, observamos que no existe una diferencia importante entre los precios, ya que en promedio éstas marcas ofertan el queso Panela y Oaxaca en \$93.00 y \$95.00 pesos por kg respectivamente. Es importante destacar que la microempresa Real Vagú, productora de los quesos con probióticos, no cuenta con la infraestructura adecuada para realizar un volumen de producción similar al de las empresas antes

mencionadas, por lo que no es posible comparar sus utilidades. Pese a ello, la micro empresa Real Vagú oferta su producto a un precio accesible al consumidor y con mayor valor agregado debido a la presencia de cepas probióticas y el hecho de ser un queso deslactosado.

VII. 2 Análisis fisicoquímicos

La actividad de agua del queso Panela al inicio del análisis fue de 0.965 (Cuadro 9), la cual es alta debido a la naturaleza del queso, incrementando a los 15 d y disminuyendo al final del análisis; todos los valores de este análisis mostraron una diferencia significativa ($\alpha=0.05$). Dicha disminución no limita el desarrollo de los microorganismos, ya que levaduras, hongos, bacterias deterioradoras y patógenas se desarrollan a $A_w > 0.85$ (Jay, 2000), lo cual queda dentro del rango de A_w que el queso Panela mostró a lo largo de los 30 d de almacenamiento.

La humedad del queso Panela mostró un comportamiento similar al de la A_w , observando diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre valores mostrados a los 0, 15 y 30 d, comenzando con una humedad de 53% (p/p) incrementando a los 15 d y decreciendo a los 30 d (Cuadro 9). De acuerdo con los parámetros de calidad señalados por la Profeco (2007), la humedad de un queso Panela varía de 50 a 60% por lo cual el queso analizado se mantuvo dentro de estos límites durante todo el estudio. El incremento de la población de las bacterias probióticas *B. lactis* y *L. acidophilus* observado durante el almacenamiento en ambos quesos acompañó la caída del pH (hasta 5.94 a los 30 d, Cuadro 9), siendo significativamente diferentes los valores de pH a lo largo del análisis ($\alpha=0.05$), debido a la producción de los distintos metabolitos como los ácidos láctico y acético, sintetizados por los probióticos. Escobar (2008), reportó que la combinación de microorganismos (*L. rhamnosus* GG y *B. breve*) disminuye el pH en mayor proporción que cuando las bacterias se adicionan por separado en queso Panela.

Al inicio del análisis el queso Oaxaca presentó una A_w de 0.960, la cual aumentó a los 15 d y finalmente a los 30 d fue menor a la inicial, la elevada A_w resultó apropiado para el desarrollo microbiano. Este mismo patrón siguió la humedad, que al inicio fue del 50%, aumentando a los 15 d y posteriormente fue de 51% a los 30 d (Cuadro 10); sin embargo, no se observó diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre las últimas dos mediciones de humedad. El aumento de humedad a los 15 d, con respecto al valor inicial, en ambos quesos; pudo deberse a que la sal no se difunde de manera homogénea a través de la matriz del queso. Se ha observado que el contenido de humedad en la superficie es menor que en el centro del queso, donde la humedad a través de la maduración permanece esencialmente sin cambio (Guinee y Fox, 1993). Al momento de realizar el muestreo de ambos quesos a los 15 d, pudo haberse tomado mayor muestra del centro de la matriz del queso, y esto provocó que se obtuviera un valor mayor de humedad en el análisis a este tiempo. De acuerdo con análisis realizados por Villegas (1993), a varias marcas comerciales de queso Oaxaca, observó que la humedad se encuentra entre 49 y 51%, al comienzo de su vida de anaquel, por lo que el queso analizado se encuentra dentro de este rango, satisfaciendo la calidad básica esperada.

El pH del queso Oaxaca disminuyó ligeramente a lo largo del periodo de almacenamiento, siendo el valor mínimo de 5.94, observando diferencia significativa entre cada valor obtenido en las mediciones a los 0, 15 y 30 d (Cuadro 10). Esta disminución en el pH se debió a la producción de ácidos orgánicos por ambas bacterias probióticas.

VII.3 Análisis proximal

El contenido de proteína y grasa fue diferente entre un tipo de queso y otro, esto puede deberse a que la leche usada en la producción de los quesos fue de diferentes lotes, por lo que una variación en el contenido de proteína y grasa de la leche usada se refleja en el producto final.

El contenido de proteína para el queso Panela fue de 20.4% (p/p) (Cuadro 11) el cual se encuentra en el rango de los valores reportados para quesos comerciales analizados por Profeco (2007), quienes obtuvieron valores entre 16 y 20% (p/p) en queso Panela de leche de vaca. Mientras que la grasa fue de 20.8% (Cuadro 11) lo cual concuerda con lo reportado por Profeco (2007) que está entre 19 y 29% (p/p).

Para queso Oaxaca el valor de proteína fue de 18.7% (Cuadro 10) (p/p), más bajo que el reportado por Villegas (1993) quien reportó valores de 24 a 25% (p/p) en quesos comerciales. Por otra parte, el contenido de grasa fue de 18.4% (p/p) (Cuadro 11) que se encuentra ligeramente por debajo de los valores reportados por Villegas los cuales fueron de 19 a 30% (p/p). Esta diferencia puede ser atribuida a la variabilidad en el contenido de proteína y grasa en la leche en función de la estación del año, tipo de alimento, edad, momento de lactación y temperatura (Fox y col., 2000).

El análisis de azúcares totales se llevó a cabo con el fin de determinar las concentraciones de lactosa presentes en el queso durante los 30 d de almacenamiento (Cuadro 12).

Sin embargo, este objetivo no se pudo cumplir ya que existe. Por lo tanto, este análisis sirvió para mostrar la disminución de los azúcares totales durante el periodo de almacenamiento, observándose un más de un azúcar reductor en la composición del queso deslactosado, como es el caso de la glucosa y la galactosa decremento debido a que los microorganismos presentes en el queso utilizaron los carbohidratos presentes como fuente de carbono que benefició su viabilidad y desarrollo en los quesos.

VII.4 Recuento de microorganismos

VII. 4.1 Análisis microbiológico de grupos indicadores: Panela y Oaxaca

El queso Oaxaca presentó una cuenta de coliformes fecales, hongos y levaduras dentro del límite máximo permitido por la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-994, "Quesos: frescos, madurados y procesados". Esto indica que se emplearon prácticas apropiadas de sanidad a lo largo de su proceso de elaboración.

Dicha norma establece que para hongos y levaduras no se debe sobrepasar las 500 UFC/g el queso Oaxaca se encuentra muy por debajo de esta cantidad (Cuadro 13). Para el caso de coliformes fecales se establecen como máximo 100 NMP/g, el análisis hecho al queso Oaxaca reportó 72 NMP/g, si bien se encuentra dentro de los límites permitidos por esta norma es importante prestar atención a las prácticas sanitarias que se realizan en el proceso de producción de este queso ya que si se tiene incluso un ligero descuido en ellas, sería sencillo rebasar los límites establecidos. Debe considerarse que no es necesario llegar a 100 NMP/g de coliformes fecales para tomar medidas pertinentes respecto a las buenas prácticas de manufactura, con la finalidad de producir alimentos inocuos.

Para el caso del queso Panela, las cuentas se encuentran fuera de los límites permitidos por la mencionada norma, lo cual indica que existen fallas en cuanto a sanidad se refiere, durante la elaboración de este queso. Las causas pueden ser múltiples como un mal saneamiento del equipo, leche con un tratamiento térmico deficiente, contaminación cruzada, o incluso biopelículas en superficies que están en contacto con el producto. El contar con evidencia de malas prácticas sanitarias durante el procesamiento de este queso no es razón suficiente como para condenar el producto, ya que se requiere de un análisis más exhaustivo que nos confirme la presencia de patógenos que podrían poner en riesgo la salud del consumidor. Estos grupos indicadores tienen el propósito de identificar contaminación en los alimentos y con ello evidenciar la necesidad de tomar

medidas energéticas y pertinentes para lograr obtener productos con una mayor calidad sanitaria y vida de anaquel.

VII.4.2 Análisis Microbiológicos de cepas probióticas en queso Panela

El queso Panela presentó para el caso de *L. acidophilus* un aumento de $2.5 \log_{10}$ a lo largo de sus 30 d de almacenamiento a 4 °C empacado al vacío. Con dicho aumento, al término de los 30 d el recuento fue de 1.04×10^8 UFC/g (Figura 13); resultados similares fueron reportados por Fernández y col. (2005) quienes demostraron la sobrevivencia de la cepa probiótica *L. delbrueckii* subsp. *lactis* UO 004 con elevados niveles celulares (10^8 a 10^9 UFC/g) en queso "Vidiago".

Por otro lado, en la cuenta de *B. lactis* fue apreciable un aumento de $3 \log_{10}$ durante los 30 d de almacenamiento, el recuento celular a los 30 d reportó una cuenta de 2.8×10^8 UFC/g (Figura 13), lo cual demuestra de una buena sobrevivencia y desarrollo de *B. lactis* durante la vida de anaquel del queso Panela.

Yilmaztekin y col. (2004) reportaron que en queso blanco prensado utilizando *B. bifidum* y *L. acidophilus* como bacterias adjuntas (aparte del cultivo iniciador), después de 90 d de almacenamiento el número de colonias probióticas se encuentra por arriba del mínimo (10^6 UFC/g) para poder tener un efecto probiótico.

Durante de los 30 d de almacén del queso Panela las BAL producen gran cantidad de metabolitos como lo es el ácido láctico, fórmico, acético, succínico y etanol (Sharpe y col., 1996), con lo cual la matriz en la que se desarrollan las bacterias probióticas se ve modificada, pese a ello su desarrollo no se ve afectado, siendo la cepa de *B. lactis* la que logra adaptarse mejor a estas condiciones.

La presencia de cantidades elevadas de UFC/g de hongos, levaduras y coliformes fecales que pudieran actuar como factores antagónicos al desarrollo de las bacterias probióticas que se adicionaron al queso debido a la competencia de

nutrientes y oxígeno que pudieran demandar, sin embargo se observó que a lo largo del almacenamiento estos factores no afectaron el crecimiento de las BAL ya que pese a la presencia de dichos grupos indicadores estas crecieron alcanzando los niveles establecidos para seguir considerando este queso como un alimento funcional. La sobrevivencia de las bacterias probióticas es probable que se mantenga gracias a los mecanismos de inhibición de las BAL contra microorganismos no deseados en los alimentos, como lo es la producción de ácido láctico, diacetilo, ácido piroglutámico, reuterina y peróxido de hidrogeno el cual tiene un efecto bactericida debido a su fuerte poder oxidante (Axxelson, 1998).

VII.4.3 Análisis microbiológicos de cepas probióticas en Queso Oaxaca

L. acidophilus en queso Oaxaca a lo largo de 30 d de almacenamiento mantuvo su viabilidad, sin embargo no se presentó un aumento logarítmico considerable, ya que este solo fue de un \log_{10} , pese a ello, el recuento celular obtenido a los 30 d fue de 2.2×10^8 UFC/g (Figura 15), lo cual se encuentra dentro de los parámetros establecidos para considerarse un alimento funcional.

El recuento celular de *B. lactis* reveló que durante los 30 d de almacenamiento de queso Oaxaca a 4 °C empacado al vacío, se mantiene la viabilidad de esta cepa probiótica y logrando además un aumento de 2 \log_{10} , con lo cual se alcanzó una cuenta de 3×10^8 UFC/g a finalizar los 30 d de almacenamiento (Figura 15) con lo que se encuentra dentro de los límites establecidos por Kumn (1988; $\geq 10^6$ UFC/g) para ser considerado un alimento funcional.

Ong y col. (2005) reportaron que la combinación de *Lactococci* con *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en queso Cheddar sobrevivieron al proceso de fabricación y mantuvieron su viabilidad fue mayor a 7.5 \log_{10} UFC/g durante un periodo de maduración de 6 meses.

El proceso de producción del queso Oaxaca incluye la etapa de malaxado, en la cual la pasta obtenida se introduce a agua caliente a 85 °C, se enfría a 50 °C, se agregan e incorporan las cepas probióticas para después introducirla en agua caliente a 45 °C y de inmediato a agua fría a 4 °C, estos cambios térmicos afectan la fase lag (fase de adaptación) de las cepas probióticas, presentando estrés. A dichas condiciones se atribuyó la poca proliferación celular, sin embargo esta parte del proceso no es posible modificarla ya que de ella depende el desarrollo de las características sensoriales de textura (“pechuga de pollo”) que el consumidor exige y espera en este tipo de queso.

VII.5 Identificación de cepas probióticas

Para la identificación de bacterias probióticas se utilizó el kit api 50 CH, los resultados obtenidos se compararon con los azúcares reportados en la literatura, que estas bacterias son capaces de fermentar, para el caso de *L. acidophilus* se obtuvo un porcentaje de compatibilidad del 72%, mientras que para *B. lactis* fue de 75%, este porcentaje nos indica de la probabilidad de que se trate específicamente de la cepa probiótica que estamos identificando, sin embargo es necesario aclarar que no todas las cepas del mismo género se comportan de igual manera, a veces se presentan diferencias incluso entre las especies. Para tener la certeza de una caracterización totalmente confiable, uno de los métodos apropiados es una identificación molecular, mediante el empleo de técnicas como lo es la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Tinción Gram. Ambas cepas presentan forma de bacilo, con cierta tendencia cocoide esta morfología puede presentarse de acuerdo con lo reportado en la literatura; así Sneath y col. (1994) describen las características morfológicas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* respectivamente como se presenta a continuación.

Lactobacillus. Las células son en forma de vara, con medidas de 0.5 - 1.2 μm de ancho y 1.0 - 10.0 μm de largo. Son usualmente varas largas pero a veces son casi cocoides, comúnmente en arreglos de cadenas cortas.

Bifidobacterium. Las colonias son de formas distintas, usualmente curvadas y achatadas y a veces ramificadas, con medidas de 0.5 - 1.3 μm de ancho y 1.5 - 8 μm de largo. Se encuentra organizado individualmente, en parejas, en arreglos en V, a veces en cadenas o en rosetas. En ocasiones presentan forma cocoide. Las especies pueden crecer con aire enriquecido en 10% de CO_2 . Fermentan carbohidratos con la producción de ácido acético y láctico en razón 3:2. Catalasa negativos, pero puede ser positivo cuando crecen con CO_2 añadido en el aire.

VII.6 Análisis sensorial

VII.6.1 Análisis sensorial queso Panela

La calificación asignada al aroma del queso Panela fue de 6.61, un agrado moderado. El sabor recibió la calificación de 5.76 (Cuadro 16), debido a que la concentración final de sal en el queso fue muy baja, alrededor del 1% (p/p). Gomes y col (1998) reportaron que el porcentaje de sal debe de estar entre 2 y 4% (p/p), un valor mayor a este afecta la viabilidad de las bacterias probióticas *B. lactis* y *L. acidophilus* en queso Gouda, esta última cepa presenta más susceptibilidad al contenido de sal, ya que se observó que con una concentración de 2% y 3.5% (p/p) la población fue de 4×10^8 y 2.5×10^8 UFC/g respectivamente, en una semana de almacenamiento. En base a esto se realizó la formulación del queso con una baja concentración de sal, para beneficiar el desarrollo y viabilidad de ambas bacterias probióticas. Sin embargo, como la concentración final de sal fue menor a la indicada por este autor, el sabor del queso Panela se vio afectado y añadido a esto al ser un queso elaborado con leche deslactosada el sabor dulce de la glucosa y galactosa se hizo más perceptible afectando la aceptación del queso por el consumidor describiéndose como poco agradable.

La consistencia fue descrita como moderadamente suave, propia de este tipo de queso fresco (Figura 19). La calificación del agrado general de esta muestra fue de 5.92, poco agradable. El 52% de los evaluadores afirmó que compraría el producto, lo que indico una leve aceptación de la muestra (Cuadro 16). No se observó que las bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. lactis* afectaran el aroma, sabor o consistencia del queso. Lo cual coincide con lo reportado por otros autores, como Escobar (2008), quien señaló que la adición de *L. rhamnosus* GG y *B. breve* a queso Panela, no modifica la aceptación del queso por el consumidor. Por su parte Bergamini y col. (2005) reportaron que la adición de bacterias probióticas (*L. acidophilus* y *L. paracasei*) en queso Patagrás no tiene efecto significativo en las características sensoriales y es aceptado por el consumidor.

VII.6.2 Análisis sensorial queso Oaxaca

La calificación asignada al aroma a los 0 d fue de 6.88, descrito como un agrado moderado (Cuadro 17), manteniéndose constante en la evaluación a los 15 d. El sabor fue calificado con 6.71, incrementado a 7.29 a los 15 d (Cuadro 17), en este tipo de queso el sabor dulce de la leche deslactosada no se hizo perceptible debido a que la concentración de sal fue la adecuada, lo que favoreció a que los consumidores no apreciaran diferencia entre el sabor de la muestra y el sabor que tienen identificado para este tipo de queso. La consistencia fue descrita como moderadamente dura, adecuada para el queso Oaxaca a los 0 d, se observó el mismo comportamiento a los 15 d no obstante apreció un ligero aumento de suavidad (Figura 20 y 21). Esto a causa de la proteólisis que es el evento bioquímico responsable de los cambios de textura (propiedades de dureza, elasticidad, cohesividad, fracturabilidad, estiramiento, adhesividad y actividad emulsificante) en los quesos durante la maduración ya que en este proceso se lleva a cabo la hidrólisis enzimática de la matriz de las proteínas y en conjunto con el cambio de pH, favorecen la modificación de la textura (Fox y col., 2000).

Se observaron comentarios sobre la característica propia de este queso y buscada por el consumidor de "formar pechuga", es decir que pueden formarse hebras delgadas y de aspecto fibroso con el queso.

El agrado general recibió la calificación de 6.55 a los 0 d y de 7.18 a los 15 d, con lo que se determinó un agrado moderado. A los 0 d y a los 15 d, el 73% y el 84% de los consumidores respectivamente (Cuadro 17), aseveraron estar dispuestos a comprar el producto, lo que reveló una aceptación amplia del queso Oaxaca deslactosado con *L. acidophilus* y *B. lactis*. Esto coincide con lo reportado por otros autores como De souza y col (2008), quienes reportaron que el queso fresco Minas con *L. acidophilus* La-5, presentó buena aceptación después de 7 y 14 d de almacenamiento. Por su parte Masco y col. (2004), observaron que usando *B. animalis* subsp. *lactis* Bd-12, el contenido de humedad del queso Cheddar era más alto, resultando una mejor proteólisis y sabor cuando se usó *B. longum*. Así mismo Ong y Shah (2009) observaron que la consistencia dura del queso Cheddar con la adición de bacterias probióticas entre ellas *B. animalis* subsp. *lactis* y *L. acidophilus* 4962 disminuyó al ir incrementando el tiempo de maduración (24 semanas) debido al aumento de la proteólisis a lo largo del almacenamiento, además que los productos (nitrógeno soluble) y ácidos orgánicos (ácido láctico, acético, y butírico) liberados durante este proceso, son de gran importancia en el sabor del queso Cheddar. Pudieron observar que los quesos con *Bifidobacterium* presentaron sabores más ácidos y vinagrados.

VIII. CONCLUSIONES

Las evaluaciones microbiológicas revelaron que las bacterias probióticas de *L. acidophilus* y *B. lactis* son capaces de sobrevivir y desarrollar a lo largo de 30 d de almacenamiento en queso Panela deslactosado empacado al vacío a 4 °C, logrando aumentar su población hasta 2.5 y 3 log₁₀ UFC/g respectivamente, de la cuenta inicial.

Las bacterias probióticas de *L. acidophilus* y *B. lactis* adicionadas a queso Oaxaca deslactosado mantienen su viabilidad a lo largo de 30 d de almacenamiento empacado al vacío a 4 °C, aumentando su población un log₁₀ UFC/g y 2 log₁₀ UFC/g respectivamente para cada bacteria probiótica, tomando como referencia la cuenta inicial.

Las cepas probióticas *L. acidophilus* y *B. lactis* en ambos quesos deslactosados empacados al vacío lograron sobrevivir 30 d de almacenamiento a 4 °C, además de aumentar su población, dicho aumento es más notorio en queso Panela que en Oaxaca, sin embargo ambos quesos se encuentran dentro de los límites establecidos para ser considerado un alimento funcional, mayor a 10⁶ UFC/g.

Del análisis sensorial se concluye que la adición de bacterias probióticas al queso Oaxaca y Panela no afecta el sabor, aroma y consistencia de los quesos, lo que resultó en una buena aceptación de los quesos por los consumidores. Sin embargo, se observó mayor aceptación del queso Oaxaca deslactosado en comparación con el queso Panela deslactosado, ya que en este se percibió en mayor medida el sabor dulce de la leche deslactosada.

Para lograr un mayor agrado y aceptación de estos productos es recomendable hacer una reformulación, específicamente en la cantidad de sal que se agrega al queso para evitar el notable sabor dulce que la leche deslactosada aporta a los

quesos, ya que ésta característica afectó el sabor del queso Panela, lo cual alteró la buena aceptación.

De las evaluaciones químicas y microbiológicas se concluye que los quesos deslactosados Panela y Oaxaca adicionados con bacterias probióticas son capaces de mantener una alta viabilidad de las bacterias probióticas incorporadas, que al ser ingeridas por el consumidor pueden colonizar el tracto intestinal y conferir los beneficios a la salud propuestos.

Es importante el uso de buenas prácticas de manufactura durante el procesamiento de quesos ya que las medidas de higiene que se empleen darán la pauta para incrementar la vida de anaquel de los productos y con ello se ofrecerá al consumidor un alimento de mayor calidad.

Ambos quesos deslactosados se consideran alimentos funcionales, con un gran futuro en la industria alimentaria ya que representan un factor clave en la elección del consumidor, lo que ha generado un rápido crecimiento y expansión de dichos productos en el mercado, ya que son sensorialmente aceptados. Además, cuentan con el valor añadido de ser deslactosados, característica que permite aumentar el número de consumidores con acceso a los beneficios de estos alimentos funcionales.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, S. 1992.** Lactic acid bacteria and the control of tumours. *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Wood, B. J. B. (Ed.) Elsevier Applied Science. London. Vol. 1: 233–226.
- Alais, C. 1998.** Ciencia de la Leche. Principios de Técnica Lechera. Compañía Editorial Continental, México: 39-41, 53-54, 88-90, 151, 168-169, 488.
- Aso, Y., y Alazan, H. 1992.** Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *International Journal of Urology*. Vol. 49: 125 - 129.
- Atlas, R. M. 1997.** Handbook of Microbiological Media CRC Press. 2da. ed. New York. 547, 789.
- Axxelson, L. T. 1998.** Lactic acid bacteria classification and physiology. Lactic acid bacteria. Salminen, S., von Wright, A. (Eds.) Marcel Dekker. New York. 1-64
- Azaldúa, A. 1994.** La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. Acriba. Zaragoza. 45-48.
- Baricault L., Denariáz, G., Hourí, J. J., Bouley, C., Sapin, C., Trugnan, G. 1995.** Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis*. Vol. 16: 245 - 252.
- Berg, R D. 1983.** Translocation of indigenous bacteria from the intestinal tract Human Intestinal Microflora in Health and Disease. Hentges D. J (Ed). Academic Pr
- Bergamini, C.V., Hynes, E.R., Quiberoni, A., Suárez, V.B., Zalazar, C.A. 2005.** Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in semi-hard Argentinean cheese. *Food Research International*. Vol. 38: 597-604
- Bibel, D. J. 1988.** Elie Metchnikoff's bacillus of long life. *American Society for Microbiology News*. Vol. 54: 661-665.
- Bjorksten, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T., Mikelsaar, M. 2001.** Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Vol. 108: 516-520.

Black, F., Einarsson, K., Lidbeck, A., Orrhage, K., Nord, C. E. 1991. Effect of lactic acid producing bacteria on the human intestinal microflora during ampicillin treatment. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. Vol. 23: 247-254.

Blanchette, L., Roy, D., Gauthier, S. F. 1996. Production of cultured cottage cheese dressing by bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. Vol. 78: 1421-1429.

Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B., Reinheimer, J.A. 2004. Incorporation of *Bifidobacterium* into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*. Vol. 14: 375-387.

Buchanan, R. E., y Gibbons, N. E. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8va. ed. Williams and Wilkins. Baltimore. 580-583, 659- 669.

Colombel, J. F., Cortot, A., Neut, C., Romond, C. 1987. Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin induced gastrointestinal effects. *Lancet*. Vol. 2: 43.

COFEPRIS. 2005. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Quesos de leche "bronca" pueden provocar enfermedades.

<http://www.cofepris.gob.mx/work/sites/cfp/resources/LocalContent/400/1/b18.pdf>

Consulta 09 de Julio de 2009.

Cross, M. L., Stevenson, L. M., Gill, H. S. 2001. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *International Immunopharmacology*. Vol. 1: 891-901.

Davidson, P. M., y Hoover, D. G. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Lactic acid bacteria*. Salminen, S., Von Wright A., (Eds.) Marcel Dekker. New York. 127-159.

De souza, C.H.B., Buriti, F.C.A, Behrens, J.H., Saad S.M.I. 2008. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. *International Journal of Food Science and Technology*. Vol. 43: 871-877.

Dinakar, P., y Mistry, V. V. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*. Vol. 77: 2854-2864.

Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fem, E. B., Robetfroid, B. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus Document. British Journal of Nutrition. Vol. 81: 1 - 27.

Driessen, F. M., y de Boer, R. 1989. Fermented milks with selected intestinal bacteria: a healthy trend in new products. Netherlands Milk and Dairy Journal. Vol. 43: 367.

Escobar, M. C. 2008. Efecto de la incorporación de un microorganismo probiótico y de almidón de haba en la calidad de un queso fresco tipo panela. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencia y tecnología de alimentos. 15

Fang, H., Elina, T., Heikki, A. y Seppo, S. 2000. Modulation of humoral immune response through probiotic intake. Immunological Medical Microbiological. 29: 47-52

FAO. 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Food and Agriculture Organization Food and Nutrition. Paper 85

Fernández, E. E. 1981. Microbiología sanitaria, agua y alimentos. Universidad de Guadalajara. 54-59

Fernández, E. E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México: 30

Fernández, M. F., Delgado, T., Boris, S., Rodríguez, A., Barbes, C. 2005. Awashed-curd goat's cheese as vehicle for delivery of potential probiotic bacterium *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO 004. Journal of Food Protection. Vol. 68: 2665-2671.

Fox, F.P., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. 2000. Fundamentals of cheese science. Aspen Publisher. Inc. Maryland: 20-22 255-278.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of applied bacteriology. Vol. 66: 365-378.

Gardiner, G., Ross, R. P, Stanton, C., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G. 1999a. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strains to the gastrointestinal tract. Journal Dairy Science. Vol. 82: 1379-1387.

- Gardiner G.**, Wallace, J. M., Scantan, F. P., Jägers P. P. J. M., Fitzgerald, G. F., Collins J. K., Stanton C. **1999b**. Influence of probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 47: 4907-4916
- Gilliland, S. E.**, y Nelson, A. **1985**. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 49: 377-381.
- Goldin, B. R.**, Gorbach S. L., Barakat, S., Gualtieri, L., Salminen, S. **1992**. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases Sciences*. Vol. 37: 121-128.
- Goldin, B. R.**, Gualtieri, L. J., Moore, R. P. **1996**. The effect of *Lactobacillus* GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutrition and Cancer*. Vol. 25: 197-204.
- Gomes, A. M. P.**, Vieira, M. M., Malcata, F. X. **1998**. Survival of probiotic microbial strain in cheese matrix during ripening: Simulation of rates of salt diffusion and microorganism survival. *Journal of Food Engineering* Vol. 36: 281-301.
- Guandalini, S.**, Pensabene, L., Zikri, M. A., Dias, J. A., Casali, L. G., Hoekstra, H., Kolacek, S., Massar, K., Micetic-Turk, D., Papadopoulou, A., de Sousa, J. S. Sandhu, B., Szajewska, H., Weizman, Z. **2000**. *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. Vol. 30: 54-60.
- Guinne, T.P.**, y Fox, P.F. **1993**. Salt in cheese: physical, chemical, and biological aspects. *Cheese: Chemistry, Physic and Microbiology*. Fox P.F (Ed). Elsevier. London. Vol. 1: 257-302.
- Guyton, A.** **1990**. Milks cultured with bifidobacteria and acidophilic lactobacilli. *Lait et Nous*. Vol. 3: 15.
- Halpern, G. M.**, Vruwink, K. G., van de Water, J., Keen, C. L., Gershwin, M. E. **1991**. Influence of long-term yoghurt consumption in young adults. *International Journal of Immunotherapy*. Vol. 7: 205-210.
- Havenaar R.**, y Huis in't Veld, J. **1999**. Probiotics: A general view. *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Wood B. J. B. (Ed.). Aspen publishers, New York. Vol. 1: 151-165.

- Hoover, D. G. 1993.** Bifidobacteria: activity and potential benefits. Food Technology. Vol. 47: 120.
- Hyung, S. K. 1988.** Characterization of lactobacilli and bifidobacteria as applied to dietary adjuncts. Culture Dairy Products Journal. Vol. 88: 6.
- Ingraham J., y Ingraham C. 1998.** Introducción a la Microbiología. Reverte. España: 235-236 agregada
- Ishibashi, N., y Shimamam, S. 1993.** Bifidobacteria research and development in Japan. Food Technology. Vol. 47: 126.
- Jay, J. M. 2000.** Modern Food Microbiology. 6ta. ed., Aspen, Gaithersburg. 114-115
- Jiang, T., Mustapha, A., Saviano, D. A. 1996.** Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. Journal of Dairy Science. Vol. 79: 41-42, 750-757.
- Judikins, H. F., y Harry, A. K. 1975.** La leche, su producción y procesos industriales. Compañía Editorial Continental. México: 38-44.
- Kim, H., Kwack, K., Kim, D. Y., Ji, G. E. 2006** Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumin induced allergy mouse model. FEMS Immunology and Medical Microbiology. Vol. 45: 259-267.
- Kumn, J. A. 1988.** Starters for fermented milks. International Dairy Federation. Bruselas. 227:41.
- Lampert, L. M. 1975.** Modern Dairy Products. 3ra ed. Chemical Publishing Company. New York. 49-55.
- Lidbeck, A., Gustafsson, T. A., Nord, C. 1987.** Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the human oropharyngeal and intestinal microflora. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. Vol. 19: 531-537.
- Lilly, D. M., y Stilwell, R. H. 1965.** Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganism. Science. Vol. 147: 747-748.
- Ling, W. H., Korpela, R., Mykkanen, H., Salminen, S., Hanninen, O. 1994.** *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. Journal of Nutrition. Vol. 124: 18- 23.

Ma, L., Deitch E., Specian, E. E., Steffen, E., Berg, R. 1990. Translocation of *Lactobacillus murinus* from the gastrointestinal tract. *Current Microbiology*. Vol. 20: 177-184.

Marteau, P., y Rambaud, J. C. 1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 12: 207-220.

Masco, L., Ventura, M., Zink, R., Huys, G. Swings, J. 2004. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1137-1143.

McConnell, M. A., y Tannock, G. W. 1993. A note on lactobacilli and β -glucuronidase activity in the intestinal contents of mice. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 74: 649- 651.

McFarland, L. V., Surawicz, C. M., Greenberg, R. N., Fekety, R., Elmer, G. W., Moyer, K. A., Melcher, S. A., Bowen, K. E., Cox, J. L., Noorani, Z., Harrington, G., Rubin, M., Greenwald, D. 1994. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *Journal of the American Medical Association*. Vol. 271: 1913-1918.

Mollet, B., y Rowland. 2002. Functional foods: at the frontier between food and pharma. *Current Opinion and Biotechnology*. Vol. 13: 483-485.

Navarrete, A. 1990. Manual de procedimientos de análisis de leche y sus derivados y la elaboración de productos lácteos. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de químico en alimentos. 1, 21 – 34.

NMX-F-099-1970. Método de prueba para la determinación de ph en quesos procesados. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Julio 10 de 2008.

NMX-F-308-1992. Alimentos - Cuenta de organismos coliformes fecales. Normas Mexicanas. Dirección general de normas. Julio 01 de 2008.

- NMX-F-100-1984.** Alimentos lácteos. Determinación de grasa butírica en quesos por el método de Gerber-Van Gulik. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Julio 01 de 2008.
- NMX-F-608-NORMEX-2002.** Determinación de proteínas en alimentos por el método Kjeldahl. Julio 01 de 2008.
- NOM-111-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana Bienes y Servicios. Método para cuenta de hongos y levaduras en alimentos. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Julio 01 de 2008.
- NOM-121-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana Bienes y Servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Octubre 25 de 2008.
- NOM-184-SSA1-2002.** Productos y Servicios. Leche, formula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias. Noviembre 10 de 2008.
- NOM-116-SSA 1-1994.** Norma Oficial Mexicana Bienes y Servicios. Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o gasa. Noviembre 10 de 2008.
- Ong, L., Heriksson, A., Shah, N. P. 2005.** Development of probiotic cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. Dairy International Journal. Vol. 16: 43-52.
- Ong, L., y Shah, N.P.,2009.** Probiotic Cheddar cheese: influence of ripening temperatures on proteolysis and sensory characteristics of Cheddar cheeses. Journal of Food Science. Vol. 74:S182-S191
- O'Sullivan, D. J. 2001.** Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 49: 1751-1760.
- Paige, D.M., Bayless, T.M., Mellits, E.D., Davis L., Dellinger W.S., Kreitner M. 1979.** Effects of age and lactose tolerance on blood glucose rise with whole cow and lactose-hydrolyzed milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 27:667-680.
- Paul, D., y Hoskins, L. C. 1972.** Effects of oral lactobacillus counts. American Journal of Clinical Nutrition. Vol. 25: 763-765.
- Parker, R. B. 1974.** Probiotics , the other half of the antibiotic story. Animal nutrition and health. Vol. 29: 4-8.

- Peng S., Lin J., Lin, M. 2007.** Antiallergic effect of milk fermented with lactic acid bacteria in a murine animal model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 55: 5092-5096.
- Profeco. 2007.** Revista del consumidor. 278, 48-49. Abril 24 de 2009
- Rao, C. V., Sanders, M. E., Indranie, C., Simi, B., Reddy, B. S. 1999.** Prevention of indices of colon carcinogenesis by the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM™ in rats. *International Journal of Oncology*. Vol. 14: 939-944.
- Rasic, L. J., y Kurmann, A. 1983.** *Bifidobacteria and Their Role*. Birkhauser Verlag, Berna. 102-103
- Reddy, B. S., y Rivenson, A. 1993.** Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3 methylimidazo [4,5] quinoline, a food mutagen. *Cancer Research*. Vol. 53: 3914-3918.
- Renner, H. W., y Munzner, R. 1991.** The possible role of probiotics as dietary antimutagens. *Mutation Research*. Vol. 262: 239- 245.
- Riel, R. 1991.** *Ciencia y Tecnología de la Leche. Composición y estructura físico-química de la leche*. Amiot, J. (Ed.). Acribia, Zaragoza: 1-53
- Rowland, I. R., Rumney, C. J., Coutts, J. T., Lievense, L. C. 1998.** Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*. Vol. 19: 281-285.
- Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Oung, I., Perman, J. A., Yolken, R. H. 1994.** Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*. Vol. 344:1046-1049.
- SAGARPA. 2008.** Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Enero 9 del 2009.
- Sanders, M. E. 1999.** Probiotics. *Food Technology*. Vol. 53: 67-77.
- Sanders, M. E., y Huis in't Veld, J. 1999.** Bringing a probiotic-containing functional food to the market: Microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 76: 293-315.
- Sandine, W. E. 1979.** Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *Journal of Food Protection*. Vol. 42: 259-262.

- Sancho**, J., Bota, E., de Castro, J.J. **2002**. Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Alfa omega. México. 207-209.
- Santos**, A. M. **1996**. Leche y sus derivados. Trillas, México: 33-37, 59-63, 79-89, 172-173, 181-198.
- Savaiano**, D. A., Aboelanaour, A., Smith, D. E. **1984**. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. American Journal of Clinical Nutrition. Vol. 40: 1219-1223.
- Savaiano**, D. A., y Levitt, M. D. **1987**. Milk intolerance and microbe-containing dairy foods. Journal of Dairy Science. Vol. 70: 397-406.
- Scrimshaw**, N.S., y Murray, E.B. **1988**. Bowes and chuch's food values of portions commonly used. Journal of Clinical Nutrition. Vol. 48:4.
- Sharpe**, M. E, Fryer, T.F. y Smith, D. G. **1996**. Identification of lactic acid bacteria. Acad. Press. London. 65-79.
- Singh**, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N., Reddy, B. S. **1997**. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. Carcinogenesis. Vol. 18: 833-841.
- Sneath**, P., Mair, N., Sharpe, M., Holt, J. **1986**. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. ed. Williams y wilkins, Baltimore. Vol. 2: 1428-1432.
- Sneath**, P., Holt J., Krieg, N., Staley, J. **1994**. Bergey's Determinative Bacteriology. ed. Williams and Wilkins. 9na edición. Baltimore. 566, 573 – 574
- Spiegel**, M. R. **1961**. Teoría y problemas de estadística. Mcgraw-Hill. 159, 344.
- Spreer**, E. **1998**. Milk and Dairy Product Technology. Marcel Dekker, New York: 248-274.
- Stanton**, C., Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Ross, R. P. **1998**. Probiotic Cheese. International Dairy Journal. Vol. 18: 491-496.
- Tamine**, A. Y., Saarela, M., Sondergaard, K., Kilstry, V. V., Shah, N. P. **2005**. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. In: Probiotic Dairy Products. (Ed.) A.Y. Tamine. Blackwell Publishing, Ayr. 39-63.

Taranto, P., y Médici, B. 2005. Alimentos funcionales probióticos. Revista Química Viva. Vol. 4: 26-28.

Tissier, H. 1906. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine. Vol. 60: 359-361.

Trapp, C. L., Chang, C. C., Halpern, G. M., Keen, C. L., Gershwin, M. E. 1993. The influence of chronic yogurt consumption on populations of young and elderly adults. International Journal of Immunotherapy. Vol. 9: 53-64.

Villegas, A., 1993. Los quesos Mexicanos. Ciestaam. México. 89-116.

ven de Water, J., Keen, C. L., Gershwin, M. E. 1999. The influence of chronic yogurt consumption on immunity. Journal of Nutrition. Vol. 129: 1492-1495.

Venturi, M., Hambly, R. J., Glinghammar, B., Rafter, J. J., Rowland, I. R. 1997. Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: A study using the alkaline comet assay. Carcinogenesis. Vol. 18: 2353-2359.

Vinderola, C. G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J. A. 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. Journal of Dairy Science. Vol. 83: 1905-1911.

Vinderola, C. G., Mocchiutti, P., Reinhermer, J. A. 2002. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. Journal of Dairy Science. Vol. 85: 721-729.

von de Weid, T., Ibnou-Zekri, N., Pfeifer, A. 2002. Novel probiotics for the management of allergic inflammation. Digestive and Liver Disease. 34 (Suppl. 2), 25-28.

Wang, X., y Conway, P.L. 1999. Adhesion of *Bifidobacterium ssp.* and *Lactobacillus* to amylase starch granules. CRC for Food Industry Innovation Internal Report N° 981110: 2

Warner, N. J. 1989. Principios de la Tecnología de Lácteos. AGT, México: 16-18, 23-24.

X. ANEXOS

ANEXO I

NÚMERO MÁS PROBABLE DE ORGANISMOS

COMBINACIONES DE TUBOS POSITIVOS			NMP/g
0.1	0.01	0.001	
0	0	0	<3
0	0	1	3
0	1	0	3
0	2	0	6
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
2	3	0	29
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	>1100

Fuente: NMX-F-308-1992. Alimentos - cuenta de organismos coliformes fecales.

Yeung, P. S. M., Cano, R., Tong, P. S., Sanders, M. E. **1999**. Comparison of API, 16S rDNA sequencing and fatty acid analysis as methods to speciate commercial probiotic bacteria. *Journal of Dairy Science*. 82: 6.

Yilmaztekin, M., Özer, B. H., Atasoy F. **2004**. Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in white-brined cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. Vol. 55: 53-60.



ANEXO II

Universidad Autónoma de Querétaro



Departamento de Investigación y Postgrado de Alimentos

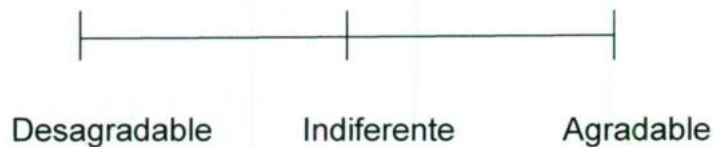
Tome la muestra 275 y califique los parámetros que se te preguntan, colocando una marca (x) en el lugar que considere apropiado según su criterio. Tome en cuenta que se trata de una escala continua.

Edad: _____ Sexo: M F

1. El **aroma** lo califica como:



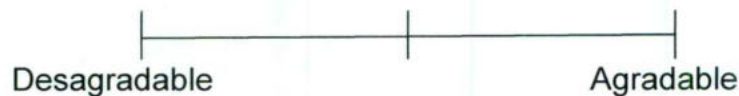
2. El **sabor** lo califica como:



3. La **consistencia** lo califica como:



4. **Agrado** de la muestra



5. En base al agrado, ¿compraría usted este producto?

Si _____ No _____

¡GRACIAS!



Universidad Autónoma de Querétaro

Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos

Tome la muestra 864 y califique los parámetros que se te preguntan, colocando una marca (x) en el lugar que considere apropiado según su criterio. Tome en cuenta que se trata de una escala continua.

Edad: _____ Sexo: M F

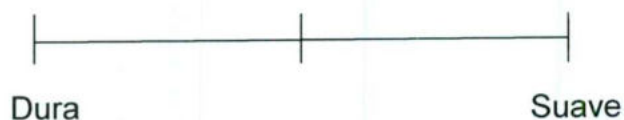
1. El **aroma** lo califica como:



2. El **sabor** lo califica como:



3. La **consistencia** lo califica como:



4. **Agrado** de la muestra



5. En base al agrado, ¿compraría usted este producto?

Si _____ No _____

¡GRACIAS!

ANEXO III

Fórmula utilizada para calcular el límite de confianza

$$x \pm \frac{z\sigma}{\sqrt{n}}$$

x = promedio

z = valor de tabla de *t student*

σ = desviación estándar

n = número de muestra

Fuente: Spiegel, 1961.

Tabla t-Student



Grados de libertad	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	1.0000	3.0777	6.3137	12.7062	31.8210	63.6559
2	0.8165	1.8856	2.9200	4.3027	6.9645	9.9250
3	0.7649	1.6377	2.3534	3.1824	4.5407	5.8408
4	0.7407	1.5332	2.1318	2.7765	3.7469	4.6041
5	0.7267	1.4759	2.0150	2.5706	3.3649	4.0321
6	0.7176	1.4398	1.9432	2.4469	3.1427	3.7074
7	0.7111	1.4149	1.8946	2.3646	2.9979	3.4995
8	0.7064	1.3968	1.8595	2.3060	2.8965	3.3554
9	0.7027	1.3830	1.8331	2.2622	2.8214	3.2498
10	0.6998	1.3722	1.8125	2.2281	2.7638	3.1693
11	0.6974	1.3634	1.7959	2.2010	2.7181	3.1058
12	0.6955	1.3562	1.7823	2.1788	2.6810	3.0545
13	0.6938	1.3502	1.7709	2.1604	2.6503	3.0123
14	0.6924	1.3450	1.7613	2.1448	2.6245	2.9768
15	0.6912	1.3406	1.7531	2.1315	2.6025	2.9467
16	0.6901	1.3368	1.7459	2.1199	2.5835	2.9208
17	0.6892	1.3334	1.7396	2.1098	2.5669	2.8982
18	0.6884	1.3304	1.7341	2.1009	2.5524	2.8784
19	0.6876	1.3277	1.7291	2.0930	2.5395	2.8609
20	0.6870	1.3253	1.7247	2.0860	2.5280	2.8453
21	0.6864	1.3232	1.7207	2.0796	2.5176	2.8314
22	0.6858	1.3212	1.7171	2.0739	2.5083	2.8188
23	0.6853	1.3195	1.7139	2.0687	2.4999	2.8073
24	0.6848	1.3178	1.7109	2.0639	2.4922	2.7970
25	0.6844	1.3163	1.7081	2.0595	2.4851	2.7874
26	0.6840	1.3150	1.7056	2.0555	2.4786	2.7787
27	0.6837	1.3137	1.7033	2.0518	2.4727	2.7707
28	0.6834	1.3125	1.7011	2.0484	2.4671	2.7633
29	0.6830	1.3114	1.6991	2.0452	2.4620	2.7564
30	0.6828	1.3104	1.6973	2.0423	2.4573	2.7500
31	0.6825	1.3095	1.6955	2.0395	2.4528	2.7440
32	0.6822	1.3086	1.6939	2.0369	2.4487	2.7385
33	0.6820	1.3077	1.6924	2.0345	2.4448	2.7333
34	0.6818	1.3070	1.6909	2.0322	2.4411	2.7284
35	0.6816	1.3062	1.6896	2.0301	2.4377	2.7238
36	0.6814	1.3055	1.6883	2.0281	2.4345	2.7195
37	0.6812	1.3049	1.6871	2.0262	2.4314	2.7154
38	0.6810	1.3042	1.6860	2.0244	2.4286	2.7116
39	0.6808	1.3036	1.6849	2.0227	2.4258	2.7079
40	0.6807	1.3031	1.6839	2.0211	2.4233	2.7045
41	0.6805	1.3025	1.6829	2.0195	2.4208	2.7012
42	0.6804	1.3020	1.6820	2.0181	2.4185	2.6981
43	0.6802	1.3016	1.6811	2.0167	2.4163	2.6951
44	0.6801	1.3011	1.6802	2.0154	2.4141	2.6923
45	0.6800	1.3007	1.6794	2.0141	2.4121	2.6896
46	0.6799	1.3002	1.6787	2.0129	2.4102	2.6870
47	0.6797	1.2998	1.6779	2.0117	2.4083	2.6846
48	0.6796	1.2994	1.6772	2.0106	2.4066	2.6822
49	0.6795	1.2991	1.6766	2.0096	2.4049	2.6800

Tabla t student (continúa)

50	0.6794	1.2987	1.6759	2.0086	2.4033	2.6778
51	0.6793	1.2984	1.6753	2.0076	2.4017	2.6757
52	0.6792	1.2980	1.6747	2.0066	2.4002	2.6737
53	0.6791	1.2977	1.6741	2.0057	2.3988	2.6718
54	0.6791	1.2974	1.6736	2.0049	2.3974	2.6700
55	0.6790	1.2971	1.6730	2.0040	2.3961	2.6682
56	0.6789	1.2969	1.6725	2.0032	2.3948	2.6665
57	0.6788	1.2966	1.6720	2.0025	2.3936	2.6649
58	0.6787	1.2963	1.6716	2.0017	2.3924	2.6633
59	0.6787	1.2961	1.6711	2.0010	2.3912	2.6618
60	0.6786	1.2958	1.6706	2.0003	2.3901	2.6603
61	0.6785	1.2956	1.6702	1.9996	2.3890	2.6589
62	0.6785	1.2954	1.6698	1.9990	2.3880	2.6575
63	0.6784	1.2951	1.6694	1.9983	2.3870	2.6561
64	0.6783	1.2949	1.6690	1.9977	2.3860	2.6549
65	0.6783	1.2947	1.6686	1.9971	2.3851	2.6536
66	0.6782	1.2945	1.6683	1.9966	2.3842	2.6524
67	0.6782	1.2943	1.6679	1.9960	2.3833	2.6512
68	0.6781	1.2941	1.6676	1.9955	2.3824	2.6501
69	0.6781	1.2939	1.6672	1.9949	2.3816	2.6490
70	0.6780	1.2938	1.6669	1.9944	2.3808	2.6479
71	0.6780	1.2936	1.6666	1.9939	2.3800	2.6469
72	0.6779	1.2934	1.6663	1.9935	2.3793	2.6458
73	0.6779	1.2933	1.6660	1.9930	2.3785	2.6449
74	0.6778	1.2931	1.6657	1.9925	2.3778	2.6439
75	0.6778	1.2929	1.6654	1.9921	2.3771	2.6430
76	0.6777	1.2928	1.6652	1.9917	2.3764	2.6421
77	0.6777	1.2926	1.6649	1.9913	2.3758	2.6412
78	0.6776	1.2925	1.6646	1.9908	2.3751	2.6403
79	0.6776	1.2924	1.6644	1.9905	2.3745	2.6395
80	0.6776	1.2922	1.6641	1.9901	2.3739	2.6387
81	0.6775	1.2921	1.6639	1.9897	2.3733	2.6379
82	0.6775	1.2920	1.6636	1.9893	2.3727	2.6371
83	0.6775	1.2918	1.6634	1.9890	2.3721	2.6364
84	0.6774	1.2917	1.6632	1.9886	2.3716	2.6356
85	0.6774	1.2916	1.6630	1.9883	2.3710	2.6349
86	0.6774	1.2915	1.6628	1.9879	2.3705	2.6342
87	0.6773	1.2914	1.6626	1.9876	2.3700	2.6335
88	0.6773	1.2912	1.6624	1.9873	2.3695	2.6329
89	0.6773	1.2911	1.6622	1.9870	2.3690	2.6322
90	0.6772	1.2910	1.6620	1.9867	2.3685	2.6316
91	0.6772	1.2909	1.6618	1.9864	2.3680	2.6309
92	0.6772	1.2908	1.6616	1.9861	2.3676	2.6303
93	0.6771	1.2907	1.6614	1.9858	2.3671	2.6297
94	0.6771	1.2906	1.6612	1.9855	2.3667	2.6291
95	0.6771	1.2905	1.6611	1.9852	2.3662	2.6286
96	0.6771	1.2904	1.6609	1.9850	2.3658	2.6280
97	0.6770	1.2903	1.6607	1.9847	2.3654	2.6275
98	0.6770	1.2903	1.6606	1.9845	2.3650	2.6269
99	0.6770	1.2902	1.6604	1.9842	2.3646	2.6264
100	0.6770	1.2901	1.6602	1.9840	2.3642	2.6259
∞	0.6745	1.2816	1.6449	1.9600	2.3263	2.5758