



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

**ESTUDIO DE ADECUACIÓN DE CEPAS
LÁCTICAS AUTÓCTONAS AISLADAS DE LECHE
CRUDA DE OVEJA GUIRRA PARA LA
ELABORACIÓN DE QUESO**

Memoria presentada para optar al Título de Doctor en Veterinaria

JOAQUIM MORAIS

Barcelona (España) - 2004



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

Membre de:



**XARXA DE CENTRES
DE SUPORT
A LA INNOVACIÓ
TECNOLÒGICA**



CeRTA
Centre de Referència
en Tecnologia d'Aliments
de la Generalitat de Catalunya



**Planta de
Tecnologia
dels Aliments
UAB**

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL Y DE LOS ALIMENTOS

**CENTRE ESPECIAL DE RECERCA PLANTA DE TECNOLOGIA DELS
ALIMENTS**

**ESTUDIO DE ADECUACIÓN DE CEPAS LÁCTICAS
AUTÓCTONAS AISLADAS DE LECHE CRUDA DE
OVEJA GUIRRA PARA LA ELABORACIÓN DE QUESO**

**Memoria presentada para optar al Título
de Doctor en Veterinaria**

JOAQUIM MORAIS

Directores de tesis

Dr. BUENAVENTURA GUAMIS LÓPEZ

Dr. MARTÍN NICOLÁS BUFFA DUNAT

Barcelona (España) – 2004

Dedicatoria

A mis queridos padres, hermanos y mi amada esposa, con amor, porque es el vínculo perfecto de unión.

Financiación

Este trabajo se ha realizado con financiación aportada por:

* Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) por haberme concedido una beca para poder realizar estudios de postgrado dentro del Programa de Doctorado “Ciencias de los Alimentos”.

* Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA) por haberme dado la oportunidad de trabajar en el Proyecto de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (Modalidad P4) titulado “Recuperación y optimización de quesos tradicionales de la Comunidad Valenciana”. También por haberme concedido una beca de Investigación Científica y así poder acabar el presente trabajo.

Agradecimientos

- 1- Agradezco eternamente a los directores de esta tesis, Dr. Buenaventura Guamis López y Dr. Martín Nicolás Buffa Dunat, por su permanente disponibilidad, por sus grandes cualidades personales y profesionales que durante estos años de trabajo me han servido de estímulo y apoyo en la elaboración de la tesis.
- 2- Agradezco a Amparo Cardona, Bibiana Juan, Pilar Pérez, Joan Miquel Quevedo Terre, Victor Manuel Gelvez, Lamy Daoudi, Israte Normahomed, Sònia Llorens, Dr. Ramón Gervilla Fernández y al Dr. Antonio José Trujillo Mesa por la ayuda, paciencia y atención que me han ofrecido durante la realización de este trabajo.
- 3- A Agatângelo Joaquim Dos Santos Eduardo por ser un compañero y amigo de toda la vida y sus consejos en momentos de desesperación.
- 4- Al finalizar, muchas gracias a todos los miembros de la Unidad de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Veterinaria (UAB), CERPTA, Universidad Politécnica de Valencia (UPV) y Formatgeria Granja Rinya. Fue un privilegio trabajar con todos vosotros.

ÍNDICE

1 – INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 – CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE DE OVEJA.....	19
1.1.1- Composición general.....	19
1.1.2- Propiedades funcionales, aptitud quesera.....	21
1.1.3- Características generales de la leche de oveja Guirra.....	23
1.2 – FERMENTOS LÁCTICOS.....	25
1.2.1- Características generales de las bacterias lácticas.....	25
1.2.2- Aislamiento de cepas lácticas.....	27
1.2.3- Propiedades deseables de las bacterias lácticas.....	30
1.2.4- Definición y tipos fermentos lácticos.....	33
1.2.5- Papel de los fermentos lácticos.....	35
1.3 – FABRICACIÓN DE QUESO.....	37
1.3.1– Proceso general de elaboración del queso.....	37
1.3.2– Fenómenos bioquímicos durante el proceso y madurado del queso.....	39
1.3.2.1– Glicólisis.....	39
1.3.2.2 – Lipólisis.....	40
1.3.2.3 – Proteólisis.....	41
1.3.3– Uso de cepas lácticas autóctonas en la fabricación de queso.....	42
2 – ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	47
2.1 – Antecedentes.....	49
2.2 – Objetivos.....	52
2.3 – Plan de trabajo.....	53

3 – MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
3.1 – CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE CEPAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS AISLADAS EN LA LECHE CRUDA DE OVEJA GUIRRA.....	61
3.1.1- Conservación de las cepas lácticas.....	61
3.1.2- Prueba de la actividad lipolítica.....	62
3.1.3- Prueba de las actividades proteolítica y acidificante.....	62
3.1.4- Prueba de producción de gas.....	63
3.1.5- Determinación cuantitativa de la actividad acidificante.....	63
3.1.6- Determinación cuantitativa de la actividad proteolítica.....	64
3.2 – FERMENTOS LÁCTICOS AUTÓCTONOS.....	64
3.2.1- Formulación de los fermentos.....	64
3.3– ELABORACIÓN DE QUESOS.....	67
3.4– ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LOS QUESOS.....	69
3.4.1 Determinación del pH.....	69
3.4.2 Determinación del extracto seco.....	69
3.4.3 Determinación de la grasa.....	69
3.4.4 Determinación del nitrógeno total.....	70
3.4.5 Determinación del nitrógeno soluble.....	70
3.4.6 Determinación de los aminoácidos libres.....	71
3.4.7 Determinación del contenido en cloruros.....	71
3.5- EVALUACIÓN SENSORIAL.....	72
3.6- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS.....	72

4 –	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
4.1 –	CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE LAS CEPAS LÁCTICAS AISLADAS DE LA LECHE CRUDA DE OVEJA GUIRRA.....	75
4.1.1-	Distribución de las cepas lácticas autóctonas.....	76
4.1.2-	Actividad lipolítica.....	77
4.1.3-	Actividad acidificante.....	79
4.1.4-	Determinación cuantitativa de la actividad acidificante.....	81
4.1.5-	Actividad proteolítica.....	85
4.1.6-	Determinación cuantitativa de la actividad proteolítica.....	86
4.1.7-	Producción de gas.....	88
4.2 –	EVALUACIÓN DE LA EFICACIA QUESERA DE LAS CEPAS LÁCTICAS AISLADAS DE LA LECHE CRUDA DE OVEJA GUIRRA.....	89
4.2.1-	Producciones de quesos en la Planta Piloto.....	90
4.2.1.1-	Primer experimento: serie P1.....	90
4.2.1.2-	Primer experimento: serie P2.....	98
4.2.2-	Producciones de quesos en Formatgeria Granja Rinya.....	103
5 –	CONCLUSIONES.....	109
6-	BIBLIOGRAFÍA.....	115
7 -	ANEXO	137
	I- Lista de cepas lácticas autóctonas aisladas en leche cruda de oveja Guirra.....	139

ÍNDICE DE FIGURAS

1- Plan de trabajo (parte I).....	56
2- Plan de trabajo (parte II).....	57
3- Protocolo utilizado en la preparación del fermento con cepas lácticas.....	66
4- Protocolo utilizado en la elaboración de quesos.....	68
5- Colonias de <i>Lactobacillus curvatus</i> (nº 39) en Agar Nata.....	78
6- Evolución del pH de los quesos de leche de oveja elaborados con fermentos lácticos autóctonos.....	91
7- Evolución de NS/NT de los quesos de leche de oveja elaborados con fermentos lácticos autóctonos.....	93
8- Evolución del contenido de los aminoácidos libres totales de los quesos de leche de oveja elaborados con fermentos lácticos autóctonos.....	96
9- Evolución del pH de los quesos de leche de vaca elaborados con fermentos lácticos autóctonos.....	99
10- Evolución de NS/NT de los quesos de leche de vaca elaborados con fermentos lácticos autóctonos.....	100
11- Evolución del contenido de los aminoácidos libres totales de los quesos de leche de vaca elaborados con fermentos lácticos autóctonos.....	101
12- Evolución del pH de los quesos de leche de oveja Guirra elaborados con fermentos lácticos autóctonos.....	104
13- Evolución de NS/NT de los quesos de leche de oveja Guirra elaborados con fermentos lácticos autóctonos.....	106
14- Evolución del contenido de los aminoácidos libres totales de los quesos de leche de oveja Guirra elaborados con fermentos lácticos autóctonos.....	107

ÍNDICE DE TABLAS

1- Composición media de la leche de vaca y oveja.....	21
2- Propiedades fisicoquímicas de la leche de vaca y oveja.....	23
3- Medios de cultivo más utilizados para aislar las cepas lácticas.....	28
4- Algunas pruebas utilizadas en la caracterización tecnológica de las bacterias lácticas empleadas en cultivos iniciadores.....	32
5- Clasificación de los fermentos lácticos.....	34
6- Utilización de cepas lácticas autóctonas como fermentos iniciadores.....	45
7- Microorganismos usados como fermentos en este estudio.....	65
8- Composición de los fermentos utilizados en la elaboración de queso curado....	65
9- Distribución de las cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja Guirra.....	77
10- Actividad acidificante de las cepas lácticas aisladas de leche cruda de oveja Guirra.....	80
11- Distribución de las cepas lácticas autóctonas que coagularon totalmente el medio Litmus Milk el primer día de incubación.....	81
12- Valores medios de la capacidad acidificante de las cepas de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> que coagularon el medio Litmus Milk después de 24 h de incubación.....	83
13- Valores medios de la capacidad acidificante de las cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. y <i>Leuconostoc</i> spp.....	84
14- Identificación las cepas lácticas autóctonas con indicios de actividad proteolítica en medio Litmus Milk.....	85
15- Actividad proteolítica de las cepas lácticas aisladas de leche cruda de oveja Guirra.....	87
16- Producción de gas de las cepas de <i>Leuconostoc</i> ssp. y <i>Lactobacillus salivariuss</i> (nº 46), aisladas de leche cruda de oveja Guirra.....	89
17- Valores medios de composición de los quesos elaborados con leche pasteurizada de oveja.....	93
18- Análisis sensorial de los quesos de leche de oveja elaborados con fermentos lácticos autóctonos.....	97
19- Análisis sensorial de los quesos de leche de vaca elaborados con fermentos lácticos autóctonos.....	104

20- Valores medios de composición de los quesos elaborados con leche de oveja Guirra.....	105
--	-----

RESUMEN:

En este trabajo se caracterizaron tecnológicamente 169 cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja Guirra, con el objetivo de seleccionar las cepas con buena aptitud quesera para utilizarlas posteriormente como fermento iniciador en la elaboración de queso.

Inicialmente se utilizaron métodos cualitativos y cuantitativos para determinar las actividades lipolítica, proteolítica, acidificante y producción de gas de las cepas. Aproximadamente el 30% del total de cepas presentó buena capacidad acidificante bajando el pH de la leche a valores inferiores a 5 tras 24 h de incubación a 30° C. Cuatro cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* n° 18, 40, 67 y 148, una de *Lactobacillus plantarum* n° 4 y una de *Lactobacillus pentosus* n° 65, presentaron buena capacidad proteolítica. Solamente una cepa de *Lactobacillus curvatus* n° 39 presentó los halos característicos de lipólisis alrededor de las colonias y otra de *Lactobacillus salivarius* n° 46 produjo gas.

De acuerdo a sus aptitudes tecnológicas, se seleccionaron diez cepas para la preparación de los fermentos, que por lo general estuvieron constituidos por una cepa acidificante (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) más una cepa proteolítica (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* o *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus pentosus*) más una cepa lipolítica (*Lactobacillus curvatus*). Con estos fermentos lácticos autóctonos se elaboraron tres series de producciones de quesos, dos en planta piloto y una en industria y se realizaron análisis físico-químicos (pH, extracto seco, grasa, sal, nitrógeno total), proteólisis secundaria (nitrógeno soluble a pH 4,6 y aminoácidos libres totales) y organolépticos (intensidad de olor y sabor, calidad de sabor, regusto y aceptación general).

No se observaron diferencias importantes en la composición general de los quesos de todas las producciones. Sin embargo, la concentración de aminoácidos libres totales de los quesos elaborados con lactobacilo proteolítico añadido en el fermento presentaron los mayores valores, resaltando la importante contribución de los lactobacilos en la liberación de aminoácidos libres totales.

En los quesos de la primera serie, los catadores observaron varios defectos importantes, atribuidos a los valores de pH muy bajos, que afectaron la calidad de los mismos. En la segunda serie, los quesos de dos producciones presentaron sabores intensos y amargos, posiblemente debido a su excesiva proteólisis, mientras que los de

otras dos producciones mostraron sabores intensos y de buena calidad. Con respecto a las producciones industriales (tercera serie), los quesos presentaron sabores intensos y de buena calidad, sin regustos amargos ni picante, mostrando una valoración global buena.

La selección de cepas lácticas autóctonas y su utilización para la elaboración de quesos, permiten la obtención de productos al menos similares, en cuanto a características organolépticas, a los obtenidos con fermentos industriales, por lo que se abre una vía para futuros estudios que nos permitan avanzar en la línea de obtención de quesos más personalizados.

ABSTRACT

One hundred sixtieth nine strains of autochthonous lactic acid bacteria isolated from raw milk of Guirra sheep, were technologically characterized with the aim of selecting those with good aptitude to be used later as a starter culture in cheese elaboration.

Qualitative and quantitative methods were used in order to determine the lipolytic, proteolytic, acidifying activities, as well as the production of gas of the strains. Approximately 30% of the strains showed good acidifying capacity; reducing the milk pH up to values lower than 5 after 24 h off incubation at 30°C. Four strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* n° 18, 40, 67 and 148, one strain of *Lactobacillus plantarum* n° 4 and one of *Lactobacillus pentosus* n° 65, showed good proteolytic capacity. Only one strain of *Lactobacillus curvatus* n° 39 showed the characteristic halos of lipolysis around the colonies and other of *Lactobacillus salivarius* n° 46 produced gas.

According to their technologic capacities, ten strains were selected for the preparation of starter culture, which generally were constituted by an acidifying strain (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) plus a proteolytic strain (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus pentosus*) plus a lipolytic strain (*Lactobacillus curvatus*). Three series of productions of cheese were elaborated with these autochthonous lactic starter culture, two of them in pilot plant and one in industry. Physical-chemical (pH, moisture, fat, salt, total nitrogen), secondary proteolysis (soluble nitrogen at pH 4,6 and total free amino acids) and organoleptic (odour and flavour intensity, flavour quality, aftertaste and general analysis acceptation) were also made.

No differences were observed in the general composition of cheeses of all productions. However, the concentration of total free amino acids of cheeses made with the proteolytic lactobacilli added in the starter culture showed the highest values, setting out the important contribution of the lactobacilli in the releasing of total free amino acids.

In cheeses from the first series, tasters observed several important defects, attributed to the very low pH values, which affected to the quality of themselves. In the

second series, cheeses from two productions showed intense and bitter flavour, possibly due to excessive proteolysis, whereas other cheeses from other two productions showed intense flavour of good quality. Cheese of the industrial productions (third series), presented intense flavour of good quality without bitter or spicy aftertastes, showing too a good global valuation.

The selection of autochthonous lactic strains and its utilization for cheesemaking, allows the obtaining of similar products, at least as for organoleptics characteristics, to those obtained with industrial starter cultures. This opens a way for future studies that will allow us to advance in the obtaining of more personalized cheeses.

1- INTRODUCCIÓN

1.1 – CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE DE OVEJA

Es difícil remontarse a los orígenes exactos de la utilización del ganado ovino. Se sabe que el rebaño de ovejas ha acompañado el desarrollo de la civilización en el Mediterráneo. En numerosos escritos antiguos como la Biblia, la Iliada, la Odisea o las Bucólicas aparecen relatos pastoriles, en los cuales el rebaño de ovejas ha acompañado al hombre de esas épocas. Podemos encontrar también en estos libros relatos del ordeño de ovejas y de la fabricación de queso.

La mayor parte de los quesos fabricados hoy en día con leche de oveja son productos de tradiciones ancestrales. La leche de oveja se ha considerado siempre como una leche de características específicas, y en ciertos casos, como un producto más noble que las otras leches (Assenat, 1991).

1.1.1- COMPOSICIÓN GENERAL

Globalmente podemos observar que la leche de oveja difiere de las otras leches especialmente por su riqueza en los componentes principales del queso; la materia grasa y la proteína (Tabla 1). Es evidente que sobre la composición de la leche influyen numerosos factores como las condiciones climáticas, la alimentación o la raza. Además, la composición de la leche varía en función de la lactación, así como de las condiciones de explotación del rebaño (Alais, 1981). Sin embargo, podemos mencionar algunas características generales de su composición:

a) **Agua.** El porcentaje de agua en la leche de oveja oscila entre 80-85%; estas variaciones están principalmente afectadas por las fluctuaciones en el contenido graso que experimenta la leche de oveja a lo largo de su ciclo de lactación (Sctott, 1991; Spreerr, 1991).

b) **Lípidos.** En la leche de oveja, los triglicéridos representan el 98-99% del total de los lípidos, valor semejante al de la leche de vaca. El olor y el gusto característico de la leche de oveja están en estrecha relación con el mayor contenido de ácidos grasos de 6 a 12 átomos de carbono. La proporción de ácido caprílico (C₈) es particularmente alta, aproximadamente de 1,7-4% en peso de ácidos grasos totales en la leche de oveja, frente a 1-1,8% en la leche de vaca. Lo mismo sucede con el ácido cáprico (C₁₀), de 4 a 11% en la oveja y 2,1 a 3,5% en la vaca (Assenat, 1991). Precisamente, un componente aromático muy importante en queso de oveja son los ácidos grasos de cadena corta liberados a través de fenómenos de lipólisis y otros asociados.

En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados, éstos representan un 26% en la leche de oveja frente al 30% en la leche de vaca. Por lo que respecta a los ácidos grasos poliinsaturados, su contenido es del 5 y 4% en leche de oveja y vaca, respectivamente (Anifantakis, 1986; Assenat, 1991; Alichanidis et al., 1996).

c) **Proteínas.** La leche de oveja, a igual que la leche de vaca, posee un contenido en caseínas respecto a las proteínas totales que oscila entre el 78 y 80%. Sin embargo, la leche de oveja tiene el mayor contenido proteico (Tabla 1), lo que constituye una característica de especial interés en la elaboración de quesos dado su óptimo rendimiento y excelente aptitud frente a la coagulación (Anifantakis, 1986; Assenat, 1991).

La leche de oveja contiene poco nitrógeno no proteico, aproximadamente 5%, siendo en este aspecto semejante a la leche de vaca. La relación entre nitrógeno proteico y nitrógeno total no es constante a lo largo del período de lactación, disminuyendo con el transcurso del mismo, aspecto que resulta interesante al evaluar el rendimiento quesero de la leche por lo que respecta al contenido en proteínas (Gervilla, 2001).

d) **Lactosa.** En la leche de oveja, el valor medio se sitúa entre 40 y 50 g/L. En la práctica quesera, el contenido de lactosa disponible en la leche de oveja es más que suficiente para asegurar una correcta fermentación láctica (Alais, 1985; Veisseyre, 1988).

e) **Minerales.** Dependiendo del tipo de sal que se trate, su contenido medio difiere en mayor o menor grado respecto a la leche de vaca, pero en conjunto la leche de

oveja presenta mayor contenido de minerales. Por ejemplo el calcio, fósforo, cobre y hierro en la leche de oveja son aproximadamente de 193, 158, 0,11 y 0,1mg/100g de leche, respectivamente; mientras que en la leche de vaca son de 119, 93, 0,02 y 0,05mg/100g de leche (Anifantakis, 1986; Haenlein, 1996).

f) **Vitaminas.** Al igual que ocurre con la composición de minerales, la composición de vitaminas en la leche es muy variable en función de cada una de ellas. Se puede destacar el contenido de las vitaminas C y B₃ en la leche de oveja que es de 5000 y 410 µg / 100 g de leche, mientras que en la de vaca es de 1000 y 80 µg / 100 g de leche, respectivamente (Alichanidis et al., 1996).

Tabla 1: Composición media de la leche de oveja y vaca

Variables (%)	Leche de Oveja	Leche de Vaca
Extracto seco	15,0 - 20,0	12,5 - 13,0
Materia grasa	6,0 - 10,0	3,0 - 4,0
Proteína total	5,0 - 6,5	3,0 - 3,6
Lactosa	4,0 - 5,0	4,5 - 5,0
Cenizas	0,9 - 1,1	0,7 - 0,9

Fuente: Anifantakis, 1986; Scott, 1991; Assenat, 1991; Spreer, 1991; Alichanidis et al., 1996; Muñoz et al., 2000.

1.1.2- PROPIEDADES FUNCIONALES, APTITUD QUESERA

La leche de oveja difiere de la de vaca y cabra en varias características físicas y químicas (Anifantakis, 1986; Luquet, 1991; Buxadé-Carbó, 1997). Suncitamente podemos resumirlas:

1. En la observación visual, la leche de oveja es de color blanco nacarado, semejante a la porcelana. Su opacidad es mayor que la de las leches de vaca y de cabra.
2. La viscosidad de la leche de oveja es más elevada que la de leche de vaca (Tabla 2), característica ligada a su riqueza en proteínas y lípidos.
3. La acidez de la leche de oveja, expresada en grados Dornic, se sitúa en el intervalo de 18 y 22 grados, mientras que la de vaca se sitúa entre 15 y 18 grados Dornic.

4. La leche de oveja tiene un olor característico del animal que la produce. Este olor, es relativamente débil en la leche recogida en buenas condiciones.
5. La leche de oveja tiene una resistencia especialmente elevada a la proliferación de bacterias en las primeras horas después del ordeño, que se debe atribuir en parte a la actividad inmunológica típica de esta leche, y por otra a las lacteninas que son sustancias antibacterianas de la leche fresca en las dos o tres horas después del ordeño (Assenat, 1991). A esto se añade que la leche de oveja tiene doble contenido de minerales que la leche de la vaca, siendo su capacidad tampón claramente superior, lo que representa una ventaja de cara a su conservación. Esto puede convertirse en un inconveniente si se trata esta leche fresca, ya que ofrece una resistencia mayor a las fermentaciones lácticas (Luquet, 1991; Cottier, 1991).
6. La leche de oveja posee una composición cuantitativa que la hace idónea para la elaboración de queso, especialmente por su elevado contenido en proteína y grasa. Es habitual decir que para cantidades de leche idénticas, se obtiene de media dos veces más de queso con leche de oveja que con leche de vaca, o lo que es lo mismo que el rendimiento quesero es mayor en la elaboración de queso de oveja que en la de vaca. Diferentes estudios (IDF, 1994) aportan información precisa respecto al contenido de proteínas coagulables y la tasa de recuperación de la materia grasa y de los compuestos nitrogenados totales.
7. La leche de oveja produce una cuajada dura, este hecho debe tenerse en cuenta en la práctica quesera, haciendo más resistentes las herramientas utilizadas para trabajar la cuajada.
8. Los productos queseros obtenidos de la leche de oveja tienen ciertas particularidades en su aspecto y en su sabor. La pasta es, en general, más blanca, y es relativamente difícil la aparición de sabores amargos (Luquet, 1991). Los sabores típicos y más intensos que tienen la mayor parte de los quesos de oveja se deben, en primer lugar, a la materia grasa. Los triglicéridos de esta leche tienen una proporción diferente de ácidos grasos. Como ejemplo se puede indicar la proporción particularmente alta de ácido caprílico y cáprico como hemos comentado anteriormente (Sección 1.1.1).

Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas de la leche de oveja y vaca

	Leche de Oveja	Leche de Vaca
Acidez titulable (° Dornic)	18 - 22	15 - 18
Conductividad (ohm ⁻¹ cm ⁻¹)	0,0038 - 0,0040	0,0040 - 0,0055
Densidad (g/cm ³) a 15°C	1,034 - 1,038	1,028 - 1,038
PH	6,4 - 6,7	6,5 - 6,7
Punto crioscópico (°C)	(-0,570) - (-0,575)	(-0,540) - (-0,0550)
Tensión superficial (Dinas/cm)	44,9 - 48,7	42,3 - 52,1
Viscosidad (mPa.s)	2,86 - 3,93	1,95 - 2,55

Fuente: Anifantakis, 1986; Buxadé-Carbó, 1997

1.1.3- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA LECHE DE OVEJA GUIRRA

Posiblemente el origen de la oveja Guirra sea africano (costa atlántica de Marruecos), aunque algunos autores le atribuyen diferentes procedencias clasificándola dentro de un tronco indeterminado. La oveja Guirra se adapta perfectamente a las condiciones climáticas Mediterráneas (elevadas temperaturas y escasa pluviosidad), como el del Levante español, particularmente la zona costera de Valencia, Alicante y Castellón. Geográficamente, sus principales núcleos de explotación son las comarcas de la Vall d'Albaida, Marina Alta y Marina Baixa de la Comunidad Valenciana (Muñoz et al., 1986; Dory et al., 1990; García, 2000). Actualmente se encuentra en franco peligro de extinción, con un censo estimado inferior a 3.500 cabezas, repartidas en rebaños marginales de escasa dimensión, en muchos casos de menos de 50 cabezas (García, 2000).

Esta raza de oveja tiene tendencia a la hipermetría y perfil ultraconvexo. Su color de piel es rojo oscuro; posee vellón semicerrado formado por la unión de fibras rojas y blancas que la cubre el tronco, cuello y parte proximal de las extremidades, aunque abundan los animales semideslanados (García, 2000). La cabeza tiene el perfil acarnerado, morro ancho, acorne en ambos sexos y orejas medianas horizontales. El cuello es largo y cilíndrico, con el borde traqueal desprovisto de lana. En el tronco tiene una línea dorso-lumbar ligeramente ensillado, grupa caída y mama globosa y bien

implantada. Las extremidades de esta oveja son bien aplomadas, fuertes, largas y finas. El peso medio de los machos es aproximadamente de 75-85 kg y las hembras 60-65 kg.

En cuanto a las aptitudes y sistemas de producción, la oveja Guirra tiene una triple aptitud: carne, leche y lana. Una de las características de estos animales que más destacan los ganaderos es su actitud dócil ante el ordeño, la facilidad para el ordeño manual y la elevada persistencia de su curva de lactación permite prolongar el ordeño hasta seis u ocho meses (Rodríguez et al., 2002).

Los primeros resultados de producción y composición de la leche en la oveja Guirra fueron aportados por Rodríguez et al. (2002). Estos autores utilizaron el sistema de lactancia natural durante otoño e invierno, obteniendo en cuatro meses una producción de aproximadamente 128 L de leche en ovejas con parto simples y 143 L en ovejas de parto doble. Estos volúmenes de leche son similares a los obtenidos con ovejas de raza Churra (Kaabi et al., 2000), Lacha (Gabiña et al., 1993; Lana et al., 1998) y Manchega (Fernández et al., 1997).

En cuanto a la composición físico-química, se ha observado un 7,38-7,9% de materia grasa y un 6,19-7,19% de proteína en la leche de oveja Guirra. Estos valores son más altos que en las restantes razas autóctonas de ordeño, por ejemplo, la raza Manchega presenta un 6,8% de grasa y un 5,8% de proteína (Carrasco, 1991), la Lacha 6,82% de grasa y 5,56% de proteína (Lana et al., 1998) y la Churra un 6,54% de grasa y 5,70% de proteína (Fuertes et al., 1998). Los valores superiores en proteína en la leche de oveja Guirra la hace poseer una muy buena aptitud quesera.

También se ha estudiado la influencia de la época del año en la producción y composición de la leche de oveja Guirra (Rodríguez et al., 2003). Es conocido que en primavera la producción de leche aumenta, pero se reduce el contenido en grasa y proteínas de la misma. En este experimento el promedio de producción diaria de las ovejas Guirra en primavera fue de aproximadamente 1157 mL de leche por oveja, mientras que en otoño-invierno fue de 1015 mL (Rodríguez et al., 2003). La composición de proteína de la leche en primavera fue aproximadamente 6,33% que es inferior a la observada en el periodo otoño-invierno (~6,69%). Lo mismo ocurrió con la grasa que fue de 7,1% en primavera y 7,64% en otoño-invierno.

Resumiendo, la elevada persistencia de la curva de lactación que permite prolongar el ordeño y los elevados valores de proteína otorgan una muy buena aptitud quesera a la leche de oveja Guirra. Estas son ventajas indiscutibles para incrementar la producción de leche e industrialización de sus derivados.

1.2- FERMENTOS LÁCTICOS

Se puede decir que los estudios de microbiología láctica comenzaron con la investigación del proceso de acidificación que ocurre naturalmente en la leche, suero de quesería o suero de manteca (Hassan y Frank, 2001). Estos productos acidificados ya se habían utilizado mucho tiempo antes como inóculo para producir queso, mantequilla, y cultivos lácticos, pero las fermentaciones resultantes eran imprevisibles y de calidad desigual. Pasteur, en 1857, fue el primero en demostrar que la fermentación láctica era de origen microbiano. Más tarde, en 1878, Lister aisló cultivos puros de bacterias ácido lácticas responsables de la acidificación de la leche (Brock, 1961). En los años 1880, Conn en los Estados Unidos, Storch en Dinamarca, y Weigmann en Alemania demostraron las ventajas de usar bacterias ácido lácticas en cultivos puros aisladas de nata la fabricación de mantequilla (Knudson, 1931; Cogan, 1996). La producción comercial de cultivos lácticos iniciadores y su uso crecieron rápidamente en la industria láctea debido a sus numerosas ventajas. Antes de su empleo para producir queso Cheddar era necesario madurar la leche 6-7 h y muchas veces el producto no resultaba de buena calidad (Conn, 1895). La fermentación lenta también tenía sus implicaciones en la salud pública, porque la leche para la fabricación de quesos no se pasteurizaba.

Actualmente, muchos productos lácteos se elaboran con cultivos lácticos iniciadores comerciales, que han sido aislados y seleccionados en función de la variedad, de las propiedades deseadas y de la velocidad de producción de ácido láctico. Entre las propiedades deseadas pueden incluirse la producción de sabores/aromas, resistencia a los bacteriófagos, tolerancia a la sal, producción de bacteriocinas, etc.

En esta sección comentaremos algunas de las características de las bacterias lácticas, y sus propiedades más importantes en quesería.

1.2.1- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Aunque las bacterias lácticas tienen características genéticas diversas, en general son microorganismos gram-positivas, no pigmentados, no forman esporas, y no reducen

los nitratos, ni producen catalasa. Las bacterias lácticas son anaerobias pero aerotolerantes, y se caracterizan también por una producción de cantidades importantes de ácido láctico como resultado del metabolismo de los hidratos de carbono (Eck, 1990; Stanley, 1998; Fox et al., 2000; Hassan y Frank, 2001). Las bacterias lácticas requieren aminoácidos específicos, vitaminas B y otros factores de crecimiento, y son incapaces de utilizar hidratos de carbono complejos (Stanley, 1998; Hassan y Frank, 2001).

Según el criterio taxonómico genético hay 12 géneros de bacterias lácticas que comprende *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* y *Weissella* (Fox et al., 2000). De todas ellas normalmente cuatro se encuentran en los cultivos lácticos iniciadores: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Un quinto género, *Enterococcus*, se encuentra en algunos fermentos o cultivos iniciadores mixtos debido a su efecto beneficioso en el desarrollo del aroma, sabor y textura de los productos lácteos (Tzanetakis et al., 1989; Fox et al., 2000; Hassan y Frank, 2001).

Las bacterias lácticas pueden clasificarse también por un criterio taxonómico fenotípico que incluye la apariencia morfológica (bastones o cocos), fermentación de los hidratos de carbono (homofermentativas o heterofermentativas), intervalo de temperatura de crecimiento (mesófilas o termófilas) y la tolerancia a la sal (halotolerantes y no halotolerantes) (Eck, 1990; Axelsson, 1993; Mäyrä-Mäkinen et al., 1993; Fox et al., 2000).

Las bacterias lácticas homofermentativas producen como mínimo 1,8 moles de ácido láctico por mol de glucosa fermentada, mientras que las bacterias lácticas heterofermentativas producen aproximadamente un mol de ácido láctico por mol de glucosa y cantidades apreciables de productos secundarios, principalmente gas carbónico, etanol y ácido acético (Eck, 1990; Stanley, 1998).

Las bacterias lácticas empleadas en la industria láctea se pueden clasificar también según su temperatura óptima de crecimiento en mesófilas y termófilas. Las primeras crecen a una temperatura de 10-40°C con un óptimo cercano a 30°C (Stanley, 1998). En la industria se utilizan principalmente las especies de los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc lactis* y *Leu. cremoris*. El grupo de las termófilas presenta una temperatura óptima de crecimiento de 40-45°C y se emplean en yogures y quesos de pasta cocida. Las bacterias termófilas más importantes

son *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*S. thermophilus*) *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*), *Lb. helveticus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (*Lb. lactis*) (Stanley, 1998).

1.2.2- AISLAMIENTO DE CEPAS LÁCTICAS

Se dispone actualmente de muchos medios de cultivo para el aislamiento y diferenciación de las bacterias lácticas (Tabla 3), aunque sólo algunos de ellos se los considera efectivamente selectivos (Stanley, 1998; Hassan y Frank, 2001). La capacidad diferenciadora se basa en las características bioquímicas (sensibilidad al oxígeno, resistencia a los antibióticos, producción de ácido, etc) y bioproductos (ácido acético, diacetilo, acetoína, gas carbónico, etc) de las especies a aislar (Hassan y Frank, 2001).

Normalmente, los medios de cultivo más utilizados para aislar bacterias lácticas son: el M17 para *Lactococcus* spp. (Terzaghi and Sandine, 1975); MRS para *Lactobacillus* spp. (DeMan et al., 1960); y el MSE para *Leuconostoc* spp. (Mayeux et al., 1962).

Se ha observado que cambiando alguna condición del medio utilizado para aislar una especie en particular, éste sirve para otra; por ejemplo el M17 es utilizado a 37°C para el aislamiento de *S. thermophilus* y a 25°C para *Lactococcus* spp. Sin embargo, se ha comprobado también que muchos de éstos medios no son absolutamente selectivos, pudiendo ocasionar errores en la identificación de las especies (Pouillet et al., 1993; Centeno et al., 1996; Elortondo et al., 1998). Así, Centeno et al. (1996) al aislar las bacterias lácticas (LAB) presentes en leche de vaca, observaron que de las 106 cepas de LAB aisladas en agar M17, un 55% fueron lactococos y un 32% fueron enterococos; de las 118 cepas de LAB aisladas en agar MRS a pH 5.5, un 42% fueron lactobacilos y un 40% lactococos; y de las 78 cepas de LAB aisladas en agar MSE un 72% eran leuconostoc. De acuerdo con los criterios de Coppola et al. (1988) estos resultados son muy bajos para medios de cultivos selectivos.

Varios autores han aislado bacterias lácticas a partir de la leche (Zárate et al., 1997; Elortondo et al., 1998; Medina et al., 2001; Alonso-Calleja et al., 2002) y de quesos artesanos (Fernández del Pozo et al., 1988; Pouillet et al., 1991, 1993; Centeno et al., 1996; Cogan et al., 1997; Arizcun et al., 1997; Zárate et al., 1997; Elortondo et al., 1998; Ortigosa et al., 1999; Durlu-Ozkaya et al., 2001; Medina et al., 2001; Alonso-Calleja et al., 2002; Caridi, 2003; Herreros et al., 2003) con el objetivo de identificarlas

y caracterizarlas tecnológicamente. Como se ha comentado, estos autores utilizaron con mayor frecuencia los medios de cultivo M17, MRS y MSE.

Tabla 3. Medios de cultivo más utilizados para aislar las cepas lácticas

Microorganismos	Medio	Referencias
Bacterias ácido lácticas	Agar láctico Elliker	Elliker et al., 1956
<i>S. thermophilus</i>	M17 <i>S. thermophilus</i> agar	Terzaghi et al., 1975 Dave y Shah, 1996
<i>Lactobacillus</i> ssp.	MRS Rogosa	DeMan et al., 1960 Pouillet et al., 1993
<i>Lactococcus</i> ssp.	M17	Terzaghi et al., 1975
<i>Leuconostoc</i> ssp. <i>Leuconostoc</i> ssp.	MSE LUSM	Mayeux et al., 1962 Benkerroum et al., 1993
<i>Enterococcus</i> ssp.	Agar citrato azida SBA	Reinbold et al., 1953 Caridi, 2003
<i>Lb. acidophilus</i>	Agar MRS-salicina Agar MRS-sorbitol	Hull y Roberts, 1984 Hull y Roberts, 1984
Bifidobacteria	BL-OG	Lim et al., 1995
Propionibacterias	Agar lactato sódico	Vedamuthu et al., 1967
Diferenciación entre bacilos y cocos en fermentos de yogurt.	Agar yogurt láctico	Matalan et al., 1986
Diferenciación entre homo- y heterofermentativas.	HHD	McDonald et al., 1987
Diferenciación subespecies <i>Lc. lactis</i>	Agar diferencial FSDA	Reddy et al., 1972 Huggins y Sadine, 1984

Adaptado de Marth (2001).

M = Milieu; MRS = De Man, Rogosa y Sharpe; MSE = Mayeux, Sandine y Elliker; LUSM = Leuconostoc Selective Medium; SBA = Slanetz-Bartley Agar; BL-OG = Blood-glucose Liver Oxgall Gentamycin Agar; HHD = Hidrobacteriograma Diferencial; FSDA = Fast-Slow Differentiation Agar.

En algunos de estos trabajos se aislaron e identificaron las cepas lácticas a partir de leches y/o quesos artesanos de oveja para conocer los microorganismos presentes y estudiar su multiplicación, supervivencia e implicación en los procesos de elaboración y

maduración de quesos (Fernández del Pozo et al, 1988; Pouillet et al., 1991; Pouillet et al., 1993; Ortigosa et al., 1999; Medina et al., 2001; Caridi, 2003). Mientras que en otros trabajos el objetivo de la caracterización tecnológica de las cepas fue el de incluirlas posteriormente en los fermentos iniciadores, posibilitando producciones industriales de quesos con características similares a los artesanos (Arizcun et al., 1997; Cogan et al., 1997; Elortondo et al., 1998; Durlu-Ozkaya et al., 2001).

Las bacterias lácticas presentes en la leche varía de explotación a explotación y fundamentalmente dependen de la calidad higiénica del ordeño. Por ejemplo, *Lactococcus* spp. fueron los microorganismos más encontrados en leches para la elaboración de queso Idiazábal (Elortondo et al., 1998) y Casar de Cáceres (Pouillet et al., 1991), mientras que *Lactobacillus* spp. fueron mayoritarios en leche utilizada para la elaboración de queso La Serena (Fernández del Pozo et al., 1988). En otro trabajo con leche de oveja utilizada para la elaboración de queso del noroeste Argentino las bacterias más abundantes encontradas fueron del género *Enterococcus* indicando que el método de ordeño utilizado tenía deficiencias higiénicas (Medina et al., 2001).

En quesos artesanos los microorganismos lácticos más aislados en los primeros días de maduración son *Lactococcus* spp. (Cogan et al, 1997). La dominancia de *Lactococcus* spp. en los primeros días de maduración de los quesos elaborados con leche cruda es bien conocida (Núñez et al., 1976; Núñez, 1978; Litopoulon-Tzanetaki et al., 1992; Tornadijo et al., 1995; Centeno et al., 1996; Zárate et al., 1997; Estepar et al., 1999), y se puede explicar por el elevado número de estas bacterias en la leche. En las etapas posteriores del madurado (30 a 45 días), la proporción entre *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. se invierte y pasan a dominar *Lactobacillus* spp. (Núñez et al., 1976; Núñez, 1978; Ordóñez et al., 1977; Litopoulon-Tzanetaki et al., 1992; Mas, 1992).

Elortondo et al. (1998) aislaron en leche y cuajada *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp ~57 y 14%, respectivamente, mientras que en queso madurado aislaron un 10% de *Lactococcus* spp. y un 31% de *Lactobacillus* spp. Estos resultados pueden deberse a que en etapas posteriores de la maduración escasea la lactosa, por lo que el número de *Lactococcus* (homofermentativos) declina, mientras que *Lactobacillus* spp. (heterofermentativos) al utilizar otras fuentes de energía, dominan el medio. También pueden influir otros factores, como la concentración de sal en humedad, pues concentraciones superiores a 4% inhiben el crecimiento de algunos *Lactococcus* spp.

Sin embargo, cuando las medidas higiénicas tomadas durante el ordeño, transporte y elaboración de quesos son deficientes predominan las bacterias del género

Enterococcus del principio hasta al final de la maduración (Ordóñez et al., 1978; Suárez et al, 1983). Medina et al. (2001) observaron que los aislamientos de bacterias de leche cruda de oveja estaban compuestos por *Enterococcus* ssp., *Lactobacillus* ssp., *Lactococcus* ssp. y *Leuconostoc* ssp. en un 48, 30, 14 y 8%, respectivamente. En los quesos de 30 días de maduración elaborados con esta leche encontraron más *Enterococcus* ssp. (~59%) y también más *Lactobacillus* ssp. (41%).

Las bacterias lácticas menos aisladas en leche, cuajada y queso corresponden al género *Leuconostoc*. Esto es debido a la poca selectividad de los medios de cultivo y el número muy pequeño de leuconostoc presentes en estos productos, pues requieren nutrientes complejos para su correcto desarrollo, como vitaminas del complejo B (Garvie, 1984; Jordan y Cogan, 1993).

En lo que respecta a microorganismos patógenos, durante los primeros 60 días de maduración de los quesos elaborados con leche cruda todos ellos pierden viabilidad debido al efecto combinado de los bajos valores de pH, concentración de sal, actividad de agua, bacteriocinas, etc. en el interior del queso (Johnson et al., 1990a,b,c). La producción de bacteriocinas por las LAB en quesos ha sido demostrada en particular en bacterias lácticas aisladas de leche cruda de oveja, por ejemplo *Enterococcus faecalis* (Oumer et al., 2001), *Enterococcus faecium* (Oumer et al., 2001a), *Lactobacillus curvatus* (Casla et al., 1996), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Atanassova et al., 2001) y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Moschetti et al., 2001). Diferentes autores han estudiado el efecto de las bacteriocinas en la reducción de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* (Rodríguez et al., 2001), *Bacillus cereus* (Morgan et al., 2001), *Staphylococcus aureus* (Olasupo et al. 1999) en quesos.

1.2.3- PROPIEDADES DESEABLES DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las propiedades específicas deseadas en cultivos lácticos iniciadores dependen del producto a elaborar, pero que pueden resumirse en dos: producción rápida de ácido y una correcta producción de sabor/aroma (Hassan y Frank, 2001). Debido a que algunos microorganismos autóctonos poseen lenta capacidad de acidificación y/o producen sabores anormales (a fruta, amargo, malta, etc.) es importante la correcta caracterización tecnológica de cada cepa aislada para la formulación de los fermentos lácticos iniciadores autóctonos.

Buchenhüskes (1993) resumió los criterios de selección para las bacterias lácticas destinados para la fermentación de los alimentos; éstos incluyen (1) falta de patogenicidad o actividad tóxica (p.e. producción de aminas biogénicas), (2) la habilidad de producir cambios deseados (acidificación, proteólisis y lipólisis que contribuyen en el sabor, aroma y textura de los derivados de la leche), (3) la habilidad de dominar la microbiota competitiva (acidificación y producción de bacteriocinas), (4) la facilidad de propagación, (5) la facilidad de preservación, y (6) la estabilidad de las propiedades deseables durante los cultivos y almacenamiento.

En la Tabla 4 se encuentran algunas de las pruebas que se pueden realizar para caracterizar tecnológicamente las cepas lácticas autóctonas. Podemos decir que aunque hay varias formas de caracterizar tecnológicamente una cepa, normalmente se evalúan las capacidades acidificantes, proteolítica, lipolítica y de producción de gas.

La determinación de la capacidad acidificante se puede realizar de dos formas, cualitativamente mediante la observación de la coagulación de la leche y cuantitativamente determinando las curvas de acidificación (Amariglio, 1986; IDF, 1995). La capacidad proteolítica de una cepa puede determinarse cualitativamente con los medios de cultivos Litmus Milk (Harrigan y McCance, 1976) o FSDA (Huggins y Sandine, 1984) o cuantitativamente con los métodos espectrofotométricos utilizando o-phthaldialdehído (Church, 1983), cadmio-ninhidrina (Forkertsma y Fox, 1992), ácido trinitrobenzenosulfónico (Jarrett et al., 1983), tirosina (IDF standard 149 A, 1997) y métodos fluorométricos (Wallace y Fox, 1998).

Actualmente se usan varios métodos y solventes para extraer los compuestos nitrogenados solubles del queso, que varían con respecto a la cantidad y tipos de péptidos y aminoácidos a extraer. La solubilidad en agua a pH 4,6 es un método ampliamente usado, y que sirve para iniciar el fraccionamiento de los compuestos nitrogenados en el queso o como un índice bruto de proteólisis. Este método solo requiere equipo simple para la preparación del extracto, y el volumen de los compuestos nitrogenados del extracto puede ser cuantificado por el método de Kjeldahl o por métodos espectrofotométricos utilizando el reactivo ninhidrina o ácido trinitrobenzeno sulfónico (TNBS) (Farkye y Fox, 1990).

Tabla 4- Algunas pruebas utilizadas en la caracterización tecnológica de las bacterias lácticas empleadas en cultivos iniciadores.

Objetivo	Pruebas
Fermentación de la leche	<ul style="list-style-type: none"> Efecto sobre el sabor, aroma y textura Velocidad de acidificación (a diferentes temperaturas) Insensibilidad a los fagos (en relación con otras cepas) Compatibilidad con otras cepas (ausencia de inhibición y producción de bacteriocinas) Resistencia a las temperaturas de cocción Actividad proteolítica Actividad lipolítica Producción de gas Halotolerancia Producción de mucopolisacáridos Producción de aminas biógenas
Producción de cultivos	<ul style="list-style-type: none"> Rendimiento en la fermentación industrial Medición de la biomasa Mantenimiento de la viabilidad/actividad durante el proceso de fabricación Estabilidad en forma liofilizada/congelada Actividad del cultivo para inoculación directa

Fuente: Early (1998).

La capacidad lipolítica puede determinarse mediante los métodos Agar Tributirina (Oterholm et al., 1968), Agar Nata y API-ZYM. Finalmente, la capacidad de producción de gas se determina con Campana de Durhan en el medios de cultivo líquidos (Caldo Nutritivo lactosado o MRS más glucosa) (Centeno et al., 1996).

Como se observa en la Tabla 5 también se pueden realizar otras determinaciones útiles, como la proporción de acidificación máxima (V_m) (Spinnler y Corrieu, 1989), la capacidad del cultivo de responder a un nuevo ambiente (Barreto et al., 1991), la

medición de la biomasa a través del recuento total de las bacterias lácticas en placa de petri (Olivares et al., 1993) o mediante determinación de conductancia e impedancia (Lanzanova et al., 1993; Tsai y Luedecke, 1989), la producción de β -galactosidasa (Ord'Zez y Jeon, 1995) y la estabilidad del cultivo durante el almacenamiento (Demirci y Hemme, 1995).

1.2.4- DEFINICIÓN Y TIPOS DE FERMENTOS

Los fermentos lácticos son cultivos puros en proporciones definidas de diferentes bacterias lácticas, las cuales al multiplicarse en la leche y en el queso garantizan las funciones esenciales de disminuir el pH (acidificación) y contribuir al desarrollo de las características organolépticas de los derivados lácteos (Eck, 1990; Stanley, 1998).

La Tabla 5 muestra una clasificación de los fermentos lácticos iniciadores utilizados en la elaboración de productos lácteos. Para un fermento iniciador homofermentativo el ácido láctico es el único producto residual del metabolismo de la lactosa, ruta que las bacterias utilizan para producir energía en forma de adenosín-trifosfato (ATP). Sin embargo, algunos fermentos lácticos heterofermentativos además del ácido láctico producen como metabolitos ácido acético, ácido propiónico, etanol, diacetilo, acetoína, dióxido de carbono, entre otros (McSweeney y Sousa, 2000).

Según su temperatura óptima de crecimiento se puede clasificar a los cultivos lácticos iniciadores en mesófilos, que se emplean cuando los procesos fermentativos se llevan a cabo a temperaturas entre 10-40°C, o termófilos que se emplean cuando los procesos fermentativos se llevan a cabo a temperaturas entre 30-50°C (Cogan, 1996).

Comercialmente se utilizan tres tipos de fermentos para la elaboración de quesos los cultivos puros, mixtos y natural. Los fermentos de cultivos puros, están formados por una sola cepa de bacterias lácticas que puede ser una cepa de lactococos mesófilo, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc* o un lactobacilo termófilo (Eck, 1990). Estos fermentos son sensibles a los fagos y deben ser empleados en alternancia (rotación) de cepas no emparentadas a nivel fágico. El empleo de fermentos constituidos por una sola cepa seleccionada a partir de cultivos secundarios resistentes a los fagos, también ha sido propuesto (Eck, 1990).

Tabla 5- Clasificación de los fermentos lácticos

	Tipo	Definición
Fermentación	Homo-Fermentativos	El único metabolito producido por las bacterias lácticas es el ácido láctico
	Hetero-Fermentativos	Además de ácido láctico las bacterias producen otros metabolitos como ácido acético, propiónico, etanol, CO ₂ , etc.
Temperatura óptima de crecimiento	Mesófilos	Los procesos de fermentación ocurren a temperaturas comprendidas entre 10-40°C
	Termófilos	Los procesos de fermentación ocurren a temperaturas comprendidas entre 30-50°C
	Mixto	Los procesos de fermentación ocurren a temperaturas comprendidas entre 30-40°C
N° de cepas	Puro	Constituido solamente por una cepa de bacterias Lácticas
	Mixto	Constituido por una mezcla de cepas de bacterias lácticas bien definidas
	Natural	Constituido por una mezcla de cepas de bacterias lácticas indefinidas
Forma comercial	Líquidos	Vendidos en estado líquido
	Deshidratados	Vendidos en estado sólido por deshidratación
	Congelados	Vendidos en estado sólido por congelación
	Liofilizados	Vendidos en estado sólido por liofilización

Normalmente los fermentos lácticos iniciadores son cultivos mixtos de varios géneros, especies o cepas de bacterias lácticas que juntos constituyen un cultivo dinámico y complejo. Las cepas lácticas difieren en la velocidad de crecimiento, producción de ácido, actividad proteolítica, lipolítica, producción de bacteriocina,

sensibilidad y resistencia a los fagos, etc. (Demirci y Hemme, 1995). Sin embargo, algunos microorganismos, pueden convertirse en dominantes, bien sea por la producción de bacteriocinas (nisina o lacticina) o bien por sus características de crecimiento (tiempo de latencia y/o de generación). Estos fenómenos exigen una vigilancia de los fermentos mixtos en el momento de los repicados sucesivos (Choisy, 1990a; Hassan y Frank, 2001).

Los fermentos naturales están formados por mezclas cuya composición exacta es indeterminada. Por ejemplo los cuajos artesanos, empleados en queserías del Jura o de los Alpes, contienen generalmente diferentes especies de lactobacilos (*Lactobacillus fermentum*, *helveticus* y *lactis*) y de estreptococos (*S. thermophilus*) (Eck, 1990).

1.2.5- PAPEL DE LOS FERMENTOS LÁCTICOS

Las bacterias lácticas pueden contribuir al sabor de tres maneras: en primer lugar modificando las condiciones del medio para que tengan lugar las reacciones enzimáticas y no enzimáticas (Eck, 1990), por ejemplo, por acidificación y cambios del potencial redox en el queso; en segundo lugar produciendo metabolitos que contribuyen al sabor directamente a partir de la lactosa o el citrato (Farye y Fox, 1990; Stanley, 1998; McSweeney y Sousa, 2000); y por último hidrolizando las proteínas y la grasa de la leche dando origen a la liberación de péptidos, aminoácidos y ácidos grasos volátiles (Farye y Fox, 1990; Stanley, 1998; McSweeney y Sousa, 2000).

La función principal de las bacterias lácticas es la acidificación de la leche y sus derivados. Ellas transforman la lactosa en ácido láctico, bajando el pH del medio hasta valores que inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos y alterantes (Stanley, 1998). Además de la acidificación favorece la expulsión de suero de la cuajada durante el proceso de prensado del queso, contribuyendo de esta forma en la reducción del contenido en humedad y ejerciendo así un mayor efecto conservante (Stanley, 1998). La acidez final o los valores de pH de la cuajada, determinan en gran parte la textura final del queso. Según Stanley (1998) los quesos con un pH de 5,2-5,5 presentan una textura elástica porque los agregados proteicos se encuentran en forma globular parecida a la que poseen en la leche (10-15 nm de diámetro). En los quesos de pH bajo (pH 4,8) como los ingleses Cheshire y Lancashire, los agregados proteicos son más

pequeños (3-4 nm) y la textura se define como pasta corta, no cohesiva o desmenuzable (Early, 1998).

Además del ácido láctico, los microorganismos producen otros metabolitos al fermentar los carbohidratos de la leche (ácido acético, ácido pirúvico, ácido propiónico, ácido butírico, etc) que influyen en el sabor/aroma (González del Llano et al., 1995). Algunas subespecies de bacterias lácticas producen determinadas sustancias importantes en el sabor de los quesos, por ejemplo, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produce diacetilo y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* produce acetoína. Otras especies son productoras de CO₂ que produce los ojos redondos en la pasta del queso, y aunque otros géneros pueden tener cepas productoras de gas, normalmente se utiliza las cepas del género *Leuconostoc* (McSweeney y Sousa, 2000).

Durante la maduración de los quesos, la proteólisis es catalizada por enzimas del extracto coagulante (quimosina y pepsina), de la leche (plasmina, catepsina D y quizás otras proteinasas de células somáticas), del fermento iniciador, de las bacterias lácticas que no pertenecen al fermento iniciador, del fermento secundario (por ejemplo, *P. camemberti*, *P. roqueforti*, *Propionibacterium* ssp., *Br. linens*) y por las proteinasas y/o peptidasas exógenas utilizadas para acelerar la maduración (McSweeney y Sousa, 2000). Por ejemplo, en los quesos de pasta blanda madurados por mohos, la textura es inicialmente firme, pero evoluciona hasta convertirse en una textura blanda, casi 'fluida' por acción de la microbiota secundaria (*P. camemberti* y levaduras) que neutraliza el ácido láctico y va hidrolizando la caseína por acción de sus enzimas proteolíticas (McSweeney y Sousa, 2000).

La lipólisis, que consiste en la liberación de ácidos grasos volátiles a partir de la grasa de leche, contribuye significativamente en el sabor de los quesos. Los ácidos grasos volátiles contribuyen al sabor del queso, particularmente cuando están correctamente equilibrados con los productos de proteólisis u otras reacciones (Bosset et al., 1993; Rychlik et al., 1997). Sin embargo, una lipólisis extensa es considerada indeseable porque los niveles altos de ácidos grasos en quesos originan fenómenos de rancidez.

1.3- FABRICACIÓN DE QUESO

1.3.1- PROCESO GENERAL DE ELABORACIÓN DE QUESO

La fabricación del queso tiene como principio la concentración de la caseína y grasa en un factor de 6 a 12, según la variedad. Esta concentración se consigue normalmente por coagulación de la caseína, formando un gel donde queda retenida la grasa. Cuando este gel se corta o se rompe y se contrae (sinéresis) libera el lactosuero, que contiene principalmente proteínas solubles, la lactosa y una parte de los componentes salinos. La sinéresis depende fundamentalmente de la temperatura, pH, agitación, concentración proteica y los iones de calcio (Eck, 1990; Walstra et al., 2001).

La coagulación de la leche se induce habitualmente por el uso de enzimas específicas pertenecientes a las familias de las proteasas ácidas o aspartoproteasas, que hidrolizan la κ -Cn. También la coagulación de la leche puede lograrse por precipitación isoeléctrica (pH \sim 4,6) mediante una acidificación de origen biológico (bacterias lácticas) o químico (p.e. glucono- δ -lactona), y por calentamiento de la leche a 80-90°C a pH \sim 5,2 (Eck, 1990).

La transformación de la leche en queso, tradicionalmente se divide en las siguientes etapas: tratamiento previo de la leche, coagulación, desuerado, moldeado, prensado, salado y maduración (Eck, 1990; Luquet, 1991, Scott, 1991; Sprerr, 1991; Walstra, 1999). Según el tipo de queso que se desea elaborar, estas etapas pueden verse sometidas a pequeñas modificaciones en intensidad, duración, número y orden. Las etapas de elaboración del queso se pueden resumir del siguiente modo:

- a) **Tratamientos previos:** Conjunto de operaciones a las que se somete la materia prima (leche), previamente a la elaboración del queso y básicamente destinadas a la limpieza física, microbiana, normalización o estandarización y conservación. La primera operación consiste en la limpieza de los contaminantes físicos (pelos y otras partículas sólidas), y se realiza utilizando los métodos de tamización, filtración y/o clarificación por centrifugación.

La normalización de la leche se lleva a cabo para facilitar las otras etapas de fabricación y para uniformizar los productos acabados. Esta puede ser realizada

mediante el desnatado o adición de nata a la leche para la normalización de la grasa, por adición de caseína en polvo o ultracentrifugación para concentración de la leche y adición de CaCl_2 para equilibrar los iones de calcio.

La limpieza microbiana consiste en la eliminación de la mayor parte de los microorganismos presentes en la leche a través de los tratamientos de termización, bactofugación, pasterización y microfiltración. Finalmente la conservación de la leche se hace por refrigeración.

- b) **Coagulación:** Como se ha comentado anteriormente, consiste en la desestabilización de la fase micelar por adición de enzimas (cuajo) y/o ácidos que provocan la gelificación de la leche, atrapando en su interior el agua, los glóbulos grasos y las bacterias.
- c) **Desuerado:** Se inicia con el corte del gel, tras el cual el proceso se regula mediante agitación y/o tratamiento térmico adecuados. Durante esta etapa de fabricación ocurre la sinéresis y la separación de las fases sólida y líquida con obtención de la cuajada. El desuerado permite la regulación de la humedad y del contenido en lactosa de la cuajada mediante desmineralizado y deslactosado.
- d) **Moldeado:** Consiste en llenar los moldes con cuajada obtenida tras la separación de la mayor parte del lactosuero. Con esta operación se da la forma y tamaño de los quesos.
- e) **Prensado:** En esta etapa de elaboración la cuajada en el interior de los moldes es sometida a presión que permite completar el desuerado de la cuajada y regular la humedad del queso. Los microorganismos lácticos presentes en el queso al utilizar la lactosa como nutriente, producen ácido láctico acidificando así la cuajada.
- f) **Salado:** La adición de sal (NaCl) al queso recién obtenido puede realizarse por salado en seco o por inmersión en salmuera. El salado tiene un efecto conservante, pues disminuye la actividad de agua regulando de esta forma la actividad microbiana y enzimática, favorece la formación de la corteza y también contribuye al sabor de los quesos.
- g) **Maduración:** Se lleva a cabo en cámaras con temperatura y humedad relativa controladas. En este período, ocurre la evaporación de agua, formación de la corteza y los complejos fenómenos bioquímicos (glicolisis, proteólisis y lipólisis) que permiten la neutralización parcial del pH de la pasta y la formación de los compuestos aromáticos (aminoácidos libres, ácidos grasos libres, etc.)

1.3.2- FENÓMENOS BIOQUÍMICOS DURANTE EL PROCESADO Y MADURADO DEL QUESO

Durante la maduración de los quesos intervienen numerosos fenómenos bioquímicos como la glicólisis, proteólisis y lipólisis, reacciones que influyen en la composición, aspecto, textura, sabor y aroma de los quesos (Desmazeaud y Gripon, 1977; Law, 1981, 1984). En esta sección se comentarán brevemente estos procesos haciendo hincapié en el papel de los fermentos y/o microbiota natural de la leche sobre ellos.

1.3.2.1- Glicólisis

La glicólisis es la fermentación de lactosa residual a ácido láctico, producida por las bacterias lácticas del fermento iniciador añadido y/o por la microbiota natural de la leche en quesos elaborados con leche cruda (Farkye y Fox, 1990; McSweeney y Sousa, 2000).

La producción de ácido láctico afecta decisivamente a casi todas las etapas de la fabricación del queso, condicionando la composición y calidad finales (Fox et al., 1990). El desarrollo de la acidez incrementa la sinéresis de la cuajada, que a su vez afecta a la composición y así al madurado y la calidad final del queso.

El pH al cual se produce el desuerado determina el contenido mineral de un queso, la pérdida de calcio y fósforo procedentes de las micelas de caseína es un factor decisivo en la proteólisis posterior y así condiciona la estructura básica y textura del queso (Lawrence et al., 1983). Como consecuencia, cuajadas con un pH muy bajo, tienen en general una textura quebradiza, mientras que cuajadas con pH más elevados, como en el queso Emmental, tienden a ser más elásticas y manejables (Lawrence et al., 1983).

O'Keeffe et al. (1975) y Creamer et al. (1985), observaron que la caseína se hidroliza más rápidamente a bajo pH debido principalmente a la solubilización del complejo fosfato cálcico coloidal de las micelas de caseína que forman la cuajada, haciendo que las micelas sean más susceptibles a la proteólisis. Paralelamente, se produce también más retención de quimosina (enzima principal de los extractos de

cuajo), más activa a pH ácido, siendo ésta la principal causa del incremento de proteólisis que exhiben los quesos de bajo pH.

El pH afecta también la cantidad de sal retenida durante el salado, como se ha observado en cuajadas tipo Cheddar que retienen más cantidad de sal a pH más alto y viceversa (Gilles, 1976).

1.3.2.2- Lipólisis

La lipólisis es un fenómeno bioquímico que consistente en la liberación de ácidos grasos a partir de la grasa del queso, compuestos importantes en el desarrollo de sabor y aroma (Farkye y Fox, 1990; McSweeney y Sousa, 2000).

La leche contiene una lipasa muy potente, la lipoproteín-lipasa, con una relativa estabilidad térmica, pues se requiere un tratamiento térmico de 15 s a 78°C para alcanzar su inactivación completa (Driessen, 1985). Así, es probable que esta lipasa tenga alguna contribución a la lipólisis en queso fabricado a partir de leche pasteurizada.

Los quesos con cultivos adjuntos fúngicos, especialmente los de vena azul, son los que presentan un nivel más elevado de lipólisis, donde más del 25% del total de los ácidos grasos son liberados en algunas variedades (Gripon, 1993). Esta intensa lipólisis se debe principalmente a las lipasas extracelulares liberadas por *Penicillium roqueforti* y *P. camembert* (Gripon, 1993).

Algunas bacterias ácido lácticas, especialmente *Lactococcus* y *Lactobacillus*, presentan actividad lipásica y esterásica pequeñas pero cuantificables (Kamaly et al., 1990). Freitas et al. (1999) y Katz et al. (2002) observaron actividad lipolítica en cepas de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* en agar tributirina. Herreros et al. (2003) cuantificaron con el método API-ZIM las actividades de la lipasa y esterasa, de diferentes microorganismos aislados de queso Armada, observando que una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* presentó una actividad enzimática de 10 nmol de lipasa y 10 nmol de esterasa-lipasa, 4 cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* presentaron 5-20 nmol de actividad esterasa-lipasa y 10-20 nmol de esterasa. Menéndez et al. (1999) estudiaron las actividades enzimáticas de 4 cepas de lactobacilos aisladas de queso Arzúa-Ulloa, encontrando que todas mostraron actividades estearásica y/o estearasa-lipasa (~5-30 nmol). Estos estudios demuestran la actividad lipolítica de algunas cepas lácticas en el proceso de maduración de los quesos.

1.3.2.3- Proteólisis

La proteólisis es el fenómeno bioquímico más importante durante la maduración del queso y ha sido objeto de numerosos estudios (Grappin et al., 1985; Fox, 1988, 1989a; Fox y Law, 1991; Farkye y Fox, 1990; McSweeney y Sousa, 2000). Los procesos proteolíticos contribuyen directa e indirectamente al gusto y aroma del queso, potenciando el sabor al provocar la liberación de compuestos sápidos durante la masticación (aminoácidos libres). Por otra parte, la proteólisis determina de modo decisivo el desarrollo de la textura, debido a la ruptura de la red de caseína y al aumento de pH (Fox, 1989; Farkye y Fox, 1990; McSweeney y Sousa, 2000).

En la mayoría de las variedades de queso, la hidrólisis inicial de las caseínas es causada por las enzimas coagulantes residuales y en menor grado por la plasmina y tal vez por la catepsina D (McSweeney y Sousa, 2000). Sin embargo, se ha observado que las proteasas del fermento y de la microbiota que no forma parte del fermento pueden también degradar las caseínas (Fox y Stepaniak, 1993). Esta hidrólisis origina péptidos grandes (insolubles en agua) y medianos (solubles en agua) que son posteriormente degradados por las enzimas coagulantes y de los microorganismos. La producción de pequeños péptidos y aminoácidos libres es finalmente causada por la acción de las proteasas y peptidasas microbianas.

McSweeney et al. (1993) observaron que aquellos quesos elaborados con leche cruda (que poseen la microbiota endógena de la leche) exhibieron mayores concentraciones de aminoácidos libres totales (AA) que sus correspondientes quesos control de leche pasteurizada (~6,5 y 4 mg Leu. g⁻¹ queso, respectivamente). Estos resultados fueron explicados por la mayor actividad peptidásica en los quesos de leche cruda, presumiblemente originada por los microorganismos de la microbiota endógena de la leche cruda.

De la misma forma, Lane y Fox (1996), Lynch et al. (1997 y 1999) elaboraron queso Cheddar utilizando un fermento y una combinación de diferentes especies de lactobacilos (*Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. pseudoplantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, etc) como fermentos adjunto. En estos trabajos se observó una mayor concentración de AA en los quesos elaborados con el fermento adjunto de lactobacilos, indicando que las peptidasas de los lactobacilos contribuyen a la liberación de AA.

La presencia de la microbiota autóctona de la leche cruda modifica también el perfil peptídico de los quesos, principalmente en las cantidades de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos. De acuerdo con González del Llano et al. (1995) los péptidos hidrofóbicos se relacionan con los sabores amargos del queso. La menor cantidad de péptidos hidrofóbicos encontrada en los quesos elaborados con leche cruda está relacionada con los mayores recuentos de bacterias autóctonas observados en estos quesos. Estas bacterias presentan una gran actividad peptidásica, y serían las responsables de hidrolizar los péptidos hidrofóbicos en este tipo de quesos (Beuvier et al. 1997; Ginzinger et al. 1999a).

1.3.3- USO DE CEPAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS EN LA FABRICACIÓN DE QUESOS

Los consumidores aprecian los quesos artesanos por sus singulares características de sabor y aroma, que es generalmente atribuida a la actividad metabólica de la microbiota autóctona presente en la leche cruda (Beuvier et al., 1997; Bachmann et al., 1998; Ginzinger et al., 1999; Skeie y Ardö, 2000; Rehman et al., 2000).

Tradicionalmente los quesos artesanos han sido elaborados con leche cruda sin fermentos lácticos añadidos. Sin embargo, el contenido y variedad de microorganismos lácticos de la leche cruda son normalmente muy inconstantes (González et al., 2003). Esto puede originar problemas tales como la acidificación lenta (que no inhibe el desarrollo de los microorganismos patógenos y alterantes del queso) y una falta de uniformidad del producto final. Deseando corregir estos inconvenientes, los fabricantes de quesos han comenzado a utilizar fermentos lácticos comerciales. Aunque esto resuelve los problemas microbiológicos, puede ocasionar una pérdida gradual de las cepas salvajes alterando las propiedades típicas de los quesos. Además, un mismo fermento comercial es utilizado para fabricar varios tipos de quesos, originando productos finales escasamente discernibles entre si (González et al., 2003).

La pasteurización de la leche permite obtener productos lácteos con mejores características higiénicas, pues con este proceso se destruyen la mayor parte de los microorganismos patógenos y alterantes del queso. Sin embargo se ha visto que los quesos elaborados con leche pasteurizada tienen menor sabor que los de leche cruda (Gaya et al., 1990; McSweeney et al., 1993; Beuvier et al., 1997; Bachmann et al.,

1998; Ginzinger et al., 1999; Rehman et al., 2000; Gómez-Ruiz et al., 2002; Fernández-García et al., 2002). Los cambios en leche causada por la pasteurización incluyen la inactivación de enzimas, ligera denaturación de las proteínas del suero, y destrucción de microbiota termolábil. Según McSweeney et al. (1993) la destrucción de la microbiota de la leche, principalmente las bacterias lácticas que no forman parte del fermento, probablemente sea el factor más influyente en el proceso de maduración.

Varios autores han observado que, la utilización de leche pasteurizada y fermentos lácticos autóctonos ayuda a obtener productos lácteos con características similares a los productos elaborados con leche cruda (Centeno et al., 1996; Medina et al., 2001; González et al., 2003.).

Por todas estas razones, existe un gran interés en el estudio de los fermentos lácticos autóctonos, y poder así utilizarlos a escala industrial en la fabricación de quesos tradicionales que conserven sus propiedades típicas y sean simultáneamente más seguros desde el punto de vista higiénico (Centeno et al., 1996; Menéndez et al., 1998, 1999; Estepar et al., 1999; Medina et al., 2001; Alonso-Calleja et al., 2002; Caridi, 2003; González et al., 2003; Herreros et al., 2003; Pérez et al., 2003).

En la Tabla 6 se puede observar algunos de los trabajos realizados en el empleo de cepas lácticas autóctonas como fermento iniciador y su influencia en las características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales durante el proceso de elaboración y maduración de quesos.

Medina et al. (1991), Gómez et al. (1999) y González et al. (2003) observaron que las cepas lácticas autóctonas utilizadas en la elaboración de los quesos experimentales La Serena, Manchego e Ibores, respectivamente, disminuyeron rápidamente el pH a valores que inhibieron el desarrollo de los microorganismos indeseables. Estos autores también observaron que las concentraciones de caseínas residuales fueron más altas en quesos elaborados con fermentos autóctonos en comparación con los quesos control. Es posible que los pH más bajos en los quesos experimentales hayan inhibido las actividades de las enzimas proteolíticas endógenas de la leche (Tzanetakis et al., 1995). Los valores de nitrógeno soluble (NS) y nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (NSTCA) fueron más bajos en los quesos elaborados con fermentos autóctonos, mientras que Candioti et al. (2002) encontraron valores similares de pH y NS entre el queso experimental y control.

Los microorganismos lácticos autóctonos afectan las características sensoriales del queso de diversas maneras; mientras que algunos autores han observado que los

quesos elaborados con los fermentos lácticos autóctonos fueron similares a los quesos control, otros obtuvieron valoraciones sensoriales mayores o menores. Gómez et al. (1999), Alonso-Calleja et al. (2002) y González et al. (2003) encontraron valoraciones de calidad de sabor y su intensidad similar entre los quesos experimental y control. Candiotti et al. (2002) observaron algunos cambios en las características sensoriales, aunque la calidad global fue alta para todos los quesos. Ortigosa et al. (1999) encontraron que los quesos experimentales mostraron mayor intensidad en los atributos refrescante, astringente y dulzura. Además los quesos experimentales fueron más elásticos y menos amargos. Por otro lado, Medina et al. (1991) observaron que los valores de pH más bajos en los quesos elaborados con fermentos lácticos autóctonos afectaron negativamente la textura y sabor de los mismos.

Alonso-Calleja et al. (2002) demostraron que la correcta caracterización tecnológica de las cepas lácticas autóctonas permite seleccionar las cepas con propiedades deseadas como fermentos iniciadores para las producciones industriales de queso manteniendo algunas características típicas del queso artesano.

Tabla 6- Utilización de cepas lácticas autóctonas como fermentos iniciadores

Referencia	Queso	Fermento/Control	Conclusiones
Lee et al. (1990)	Cheddar	Se prueban 10 cepas de lactobacilos añadidas en un fermento comercial de <i>Lc. lactis</i> (control).	El descenso de pH fue mayor al utilizar cepas de <i>Lb. casei rhamnosus</i> , <i>Lb. casei pseudoplantarum</i> y <i>Lb. plantarum</i> . Concluyeron que las mejores cepas adjuntas al fermento fueron <i>Lb. casei casei</i> y <i>Lb. casei pseudoplantarum</i>
Lee et al. (1990)	Cheddar	1 = Fermento (<i>Lc. lactis</i> + <i>Lc. cremoris</i>) + <i>Lb. casei</i> 2 = Fermento + <i>Lb. casei pseudoplantarum</i> 3 = Fermento + <i>Lb. plantarum</i> .	Los recuentos de lactobacilos alcanzan valores mínimos a los ocho meses, coincide con valores máximos del NSTCA. Concluyeron que las mejores cepas adjuntas al fermento fueron <i>Lb. casei casei</i> y <i>Lb. casei pseudoplantarum</i> .
Medina et al. (1991)	La Serena (oveja)	<i>Lc. lactis lactis</i> INIA399/ Sin Fermento	Los RTBM y la concentración de NS fueron menores en los QE. El pH fue menor en los QE, afectando negativamente la textura y sabor
Requena et al. (1992)	Cabra	Prueban ocho variedades de <i>Lactococcus</i> ssp.; <i>Lactobacillus</i> ssp. y <i>Leuconostoc</i> ssp. en diferentes combinaciones	Estos autores observaron que algunos quesos resultaron muy ácidos, amargos, con defectos en sabor y textura, atribuyéndolo a la elevada capacidad de acidificación del lactococo utilizado. El pH más bajo provocó mayor retención de cuajo y como consecuencia mayor hidrólisis de la caseína y mayor NS en el queso.
González-Crespo et al. (1993)	Cabra	1 = <i>Enterococcus faecalis</i> 2 = <i>Lc. lactis lactis</i> 3 = <i>Lc. lactis</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	Los RTBM fueron menores en el tratamiento 2 e intermedio en el 3. Se observó una progresión más rápida de la acidificación durante el prensado en el tratamiento 2, seguido de 3 y del 1. Las características sensoriales de los quesos fueron de pasta reseca, ciega y poco madurado, color blanco intenso y falta de sabor típico. Concluyeron que la acidificación obtenida resultó excesiva, lo que posiblemente afectó el desarrollo de la proteólisis y el nivel de maduración de los productos, sin diferencias apreciables entre los tratamientos.
Tzanetakis et al. (1995)	Cabra	1 = <i>S. thermophilus</i> + <i>Lb. delbruekii</i> ; 2 = <i>Lc. lactis lactis</i> + <i>Leuc. mesenteroides cremoris</i> + <i>Lb. casei casei</i> ; 3 = <i>Lc. lactis lactis</i> + <i>Lb. casei casei</i> + <i>Enterococcus durans</i> ; 4 = <i>Lc. lactis lactis</i> + <i>Lb. casei casei</i> + <i>E. durans</i> + <i>L. mesenteroides cremoris</i>	Los valores de pH y NS fueron mayores en el fermento 1. Los quesos elaborados con el fermento 4 mostraron los mayores valores de AA. Los quesos con mayores concentraciones de AA presentaron las mejores características organolépticas.
Lane et al. (1996)	Cheddar	Prueban 6 cepas de lactobacilos acidificando con fermento (<i>Lc. lactis cremoris</i>) o con GDL.	Los quesos acidificados con GDL mostraron mayor pH, que disminuyó la acción de la quimosina (observada en los menores valores de NS). Los AA fueron mayores en los quesos acidificados con fermento con relación a los con GDL. De igual forma los AA fueron mayores en los quesos elaborados con lactobacilos añadidos y la diferencia fue mayor en los quesos acidificados con GDL, indicando la actividad peptidásica del fermento.

RTBM = recuentos totales de bacterias mesófilas; QE = quesos experimentales; QC = queso control; NS = Nitrógeno soluble; NSTCA = Nitrógeno soluble en ácido Tricloroacético AA = aminoácidos libres totales; GDL = Glucono- δ -Lactona

Tabla 6- (continuación)

Referencia	Queso	Fermento/Control	Conclusiones
Gómez et al. (1999)	Manchego	<i>Lc. lactis lactis</i> / Fermento comercial	Los RTBM fueron mayores en QE. El pH, NS y NSTCA fueron más bajos en QE. La elasticidad, fracturabilidad y dureza fueron más altos en QE, mientras que la calidad de sabor y su intensidad fueron similares.
Lynch et al. (1999)	Cheddar	1 = Fermento (<i>Lc. lactis cremoris</i>) + <i>Lb. paracasei</i> . 2 = Fermento + <i>Lb. plantarum</i> .	No se observaron diferencias en la proteólisis primaria de los quesos. Sin embargo los QE (especialmente el fermento 1) mostraron mayores valores de AA. Los QE mostraron más sabor, más aroma y más amargor durante la evaluación sensorial.
Menéndez et al. (2001)	Arzúa-Ulloa (vaca)	LBA = <i>Lc. lactis lactis</i> + <i>Lc. lactis lactis diacetyllactis</i> + <i>Lb. casei casei</i> + <i>Lb. pseudoplantarum</i> . LBB = <i>Lc. lactis lactis diacetyllactis</i> + <i>Lb. casei casei</i> + <i>Lb. pseudoplantarum</i> . LC = <i>Lc. lactis lactis</i> + <i>Lc. lactis diacetyllactis</i> (control)	Los RTBM al igual que el pH fueron menores en los QE con respecto al control. Los valores de NS y NSTCA fueron mayores en LBA, correspondiendo los valores mínimos al LBB. Los AGLV fueron mayores en los lotes elaborados con cepas de <i>Lb. casei</i> (LBA y LBB). Los valores más altos en la evaluación sensorial fueron otorgados al LBA, y los mínimos al LBB. La inclusión de cepas seleccionadas de <i>Lb. casei casei</i> en los fermentos iniciadores parece mejorar las características bioquímicas y organolépticas de esta variedad de queso.
Alonso-Calleja et al. (2002)	Valdeteja (cabra)	<i>Lc. lactis lactis</i> / Queso Valdeteja artesano	Los QE y QC con leche pasteurizada mostraron características sensoriales similares. Se seleccionó un <i>Lc. lactis lactis</i> , productor de acetoina, para ser incluido como fermento iniciador en la elaboración industria del queso de cabra Valdeteja.
Candiotti et al. (2002)	Reggianito Argentino (vaca)	<i>Lb. helveticus</i> SF133, SF138 y SF209/ Fermento natural (suero)	Los RTBM de QE fueron similares al QC. La capacidad de acidificación, proteólisis primaria y lipólisis fueron similares. La proteólisis secundaria fue diferente influyendo en la intensidad del sabor del queso, aunque la calidad global fue alta para todos los quesos
González et al. (2003)	Ibores (cabra)	1 = <i>Lc. lactis lactis</i> 2 = Fermento comercial 3 = Sin fermento (control)	Los QE presentaron menor recuento de coliformes y estafilococos coagulasa-positivo con relación a los QC. QC (sin fermento) presentaron mayores valores de pH. Los valores de NS y NSTCA fueron más altos en QC. Durante la evaluación sensorial se otorgaron mayores valores a algunos QE, aunque las diferencias no fueron significativas con respecto al QC.
Hynes et al. (2003a)	Tipo Saint-Paulin (vaca)	Estudian 10 cepas de lactobacilos con dos tipos de fermento <i>Lc. lactis lactis</i> o <i>Lc. lactis cremoris</i> .	La proteólisis primaria fue similar para los QE y QC. La concentración de AA fue mayor en los quesos elaborados con fermento <i>Lc. lactis cremoris</i> . Observaron también el efecto sinérgico, pues determinadas cepas adjuntas producían mayor concentración de AA con un fermento que con el otro.

AGLV = ácidos grasos libres volátiles

2- ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 – ANTECEDENTES

Este trabajo está enmarcado en el proyecto de investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (Modalidad P4) para la recuperación y optimización de los quesos tradicionales de la Comunidad Valenciana, elaborados con leche de oveja Guirra. El objetivo último de este proyecto es proporcionar a la industria láctea los procesos de elaboración optimizados de los quesos elaborados con leche de oveja Guirra, con un coste asumible y sin impedimentos legales, que mejoren la calidad de los productos que actualmente se fabrican y contribuyan a desarrollar la ganadería de la Comunidad, para en el futuro poder obtener la Denominación de Calidad o de Origen.

Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en la Comunidad Valenciana se obtuvieron 481.000 litros de leche de oveja, de los que 167 mil se transformaron en queso en las propias explotaciones ganaderas y 314 mil se destinaron a su industrialización, mayoritariamente a la fabricación de quesos de mezcla (MAPA, 2001). La producción total española del mismo año fue de ~349 millones de litros, de los que ~24 millones se transformaron en queso en las propias explotaciones ganaderas. Se deduce que la transformación de leche de oveja de la Comunidad Valenciana representa menos de 0,5% del total nacional y por tanto es un sector con una gran potencialidad de expansión.

Con la leche de oveja Guirra antiguamente se fabricaban quesos frescos tradicionales valencianos, como los de “Servilleta” y “Caçoleta” (Compaire, 1976). Con esta leche también se elaboraban quesos curados de oveja, como el queso de Burriana (Fleischmann, 1924), que ha desaparecido en la actualidad, y el queso Tronchón (Canut y Navarro, 1980; Canut et al, 1990, 1992; Generalitat Valenciana, 1997) en la zona del Maestrazgo.

En la actualidad, el queso Servilleta se elabora con leche de oveja, cabra o sus mezclas e incluso con vaca, en dos comarcas principalmente, La Costera y Alto Vinalopó. De formato discoidal, la pieza de queso adquiere forma de servilleta donde se escurre y prensa; su peso varía entre 0,5 y 1,5 kg. Presenta una textura friable y blanda, y gusto suave y agradable. Se consume fresco, aunque también se puede elaborar con cultivos iniciadores y orear sobre estanterías de madera para su consumo después de una corta maduración (Canut et al, 1990, 1992; Generalitat Valenciana, 1997).

En cuanto a los quesos curados, el queso de Caçoleta se elabora en las comarcas valencianas de l'Horta, La Canal de Navarrés y La Costera, y en menor medida en las zonas de Puçol y Burriana. En estos dos últimos sólo se está elaborando para autoconsumo de unos pocos ganaderos que no comercializan. Para su elaboración se emplea leches de diferentes especies según la época del año o mezcla de leche de vaca, cabra y oveja, en proporciones variables. Este queso tiene un formato característico debido al molde de madera en forma de “cazuelilla” con el fondo cónico; el peso de la pieza varía de 200 g a 500 g. Se trata de un queso de pasta blanda y blanca, textura gomosa, gusto salado y olor agradable de leche. Este queso se consume fresco, pero también se puede curar, oreándolo sobre cañizos durante una semana (Canut et al, 1990, 1992; Generalitat Valenciana, 1997).

El queso Tronchón se elabora en todo el macizo del Maestrazgo a partir de leche de oveja, cabra o con sus mezclas. Tiene un formato cilíndrico, con las caras en forma de volcán, el peso es muy variable de 0,5 a 2,5 kg. Se trata de un queso de pasta compacta, de graso a extragrasso y tiene el sabor intenso, un poco ácido y picante, textura mantecosa y aroma característico de oveja o cabra. Se consume tanto fresco como curado (Canut y Navarro, 1980; Canut et al, 1990, 1992; Generalitat Valenciana, 1997).

Los quesos que en la actualidad se comercializan bajo las denominaciones de Servilleta y Caçoleta tienen en común con los quesos que se elaboraban con leche de oveja Guirra sólo el formato del producto. Se caracterizan en cambio por la heterogeneidad en el sabor, calidad, tipo de leche y en ocasiones la tecnología de elaboración. Además, no hay estudios científicos disponibles en bibliografía sobre los quesos Servilleta, Caçoleta y Burriana, que se elaboraban exclusivamente con leche de oveja Guirra, tanto frescos, como curados. Dada esta situación, plantea una gran dificultad la defensa de una denominación de origen de estos quesos autóctonos y más aún conferirles una imagen de calidad.

Con la recuperación de la actividad de ordeño en la raza de oveja Guirra, que se está llevando a cabo en los últimos años, es posible también recuperar una serie de productos lácteos tradicionales elaborados con su leche. Esto permitiría la recuperación de un valioso patrimonio de la Comunidad Valenciana (genético y gastronómico), teniendo como principal objetivo la calidad.

El sector quesero está muy interesado en conseguir una mayor proyección de sus productos, que se elaboran mayoritariamente en queserías artesanales o semi-industriales, y en ocasiones vendidos exclusivamente a nivel local-comarcal. La recuperación de la producción de quesos autóctonos de gran calidad, que pudieran conseguir Denominación de Calidad o de Origen, incidiría directamente en el desarrollo del sector ganadero de leche y queso de la Comunidad Valenciana y, a la vez, sería una alternativa más para el desarrollo rural en ciertas comarcas.

La Denominación de Origen o de Calidad demanda una buena calidad microbiológica y uniformidad de los quesos comercializados. Sin embargo, el contenido y variedad de microorganismos de la leche cruda utilizada para elaborar los quesos son normalmente muy inconstantes. Esto puede originar problemas tales como un aumento en el número de coliformes y una falta de uniformidad del producto final. La utilización de fermentos lácticos comerciales ayuda a corregir estos inconvenientes. Aunque esto puede resolver los problemas microbiológicos, puede ocasionar una pérdida gradual de las cepas salvajes alterando las propiedades de los quesos (González et al, 2003). Por este motivo, es deseable seleccionar y proporcionar un fermento láctico iniciador para la elaboración de los quesos de oveja Guirra con que se obtendría productos más seguros mientras se conservan las características originales. Deseosos de lograrlo, recibimos de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) 169 cepas lácticas aisladas de la leche cruda de oveja Guirra. Con estas cepas realizamos una caracterización tecnológica para posteriormente comprobar la eficacia quesera de las mismas en la elaboración de quesos curados.

El estudio de la microbiota láctica autóctona en la leche cruda de oveja Guirra servirá para incidir en la tecnología de elaboración, con el objetivo de optimizar la calidad de los quesos fabricados. Cuando la tecnología esté establecida, se definirán cuáles serán las características sensoriales definitivas de estos quesos. El estudio de las características físico-químicas y su evolución a lo largo de la maduración de los quesos permitirán definirlos y prevenir o incidir en posibles defectos de elaboración o conservación.

2.2 – OBJETIVOS

La personalización de los quesos es un objetivo de gran interés por parte de las industrias alimentarias que ven como cada día es más difícil encontrar diferencias entre los productos del mercado. Así, la obtención y utilización de cepas autóctonas contribuyen a la personalización de los quesos y a mejorar la variedad de los productos disponibles por parte del consumidor. Puesto que las características sensoriales de los quesos son siempre el factor determinante de su éxito comercial, un objetivo intrínseco de este trabajo es el desarrollo de productos con características únicas y definitorias de su leche de origen, que sean apreciados y distinguidos por su calidad. Por todo esto, el presente estudio es de gran interés ya que establece una metodología que se puede utilizar de forma sistemática en los estudios de recuperación de quesos autóctonos.

El proyecto de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico, que sirve de marco al presente trabajo se ha estructurado de forma coordinada por dos grupos de investigación, uno en la Universidad Politécnica de Valencia y otro en la Universidad Autónoma de Barcelona. Correspondió al primer grupo la determinación de la microbiota autóctona y contaminante de la leche de oveja Guirra, mientras que el segundo se ocupó de **caracterizar y utilizar las cepas lácticas autóctonas aisladas de esta leche, y desarrollar y optimizar los procesos industriales mediante el control de la elaboración y los parámetros de maduración.**

Para alcanzar este objetivo se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

- 1- Estudiar la actividad acidificante, lipolítica, proteolítica y producción de gas de las cepas lácticas autóctonas aisladas por la Universidad Politécnica de Valencia de leche cruda de oveja Guirra.
- 2- Formular fermentos con cepas lácticas autóctonas, teniendo en cuenta sus características tecnológicas.
- 3- Elaborar quesos experimentales a escala de planta piloto para comprobar la aptitud quesera de las cepas lácticas autóctonas seleccionadas en el proceso anterior.
- 4- Estudiar los fenómenos de proteólisis secundaria (determinación de fracciones nitrogenadas y aminoácidos libres), y realizar un análisis organoléptico de los quesos experimentales.

- 5- Basado en estos experimentos previos, seleccionar un fermento con características óptimas para su utilización en producción industrial de quesos con leche de oveja Guirra.
- 6- Estudiar la proteólisis secundaria (determinación de fracciones nitrogenadas y aminoácidos libres), y realizar un análisis organoléptico de los quesos elaborados en las producciones industriales.

2.3 – PLAN DE TRABAJO

De una forma esquemática, en las Figuras 1 y 2 se presenta el plan de trabajo seguido en los estudios de esta tesis. La leche cruda fue obtenida por ordeño mecánico en la granja de la Universidad Politécnica de Valencia e inmediatamente refrigerada a 10–12°C. En el Departamento de Microbiología de la misma Universidad se realizó el aislamiento e identificación de las cepas lácticas autóctonas, en un período de 6 meses. Seguidamente una parte del cultivo fresco de cada cepa fue conservado en esta Universidad, y otra parte inoculada en agar MRS Lactosa fue enviada al Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA) de la Universidad Autònoma de Barcelona, para realizar la caracterización tecnológica de las cepas y las pruebas de adecuación de los fermentos.

En el mismo día de llegada al CERPTA, las cepas lácticas fueron conservadas a –20° C en viales para crioconservación. Posteriormente se realizaron las pruebas de caracterización tecnológica quesera que consistieron en: 1. Determinación cualitativa de la actividad acidificante-proteolítica; 2. Determinación de la actividad lipolítica; 3. Cuantificación de la actividad proteolítica; 4. Cuantificación de la actividad acidificante (pH); 5. Prueba de producción de gas.

Una vez caracterizadas las cepas se seleccionaron las más adecuadas para su inclusión en los fermentos lácticos que se utilizaron en la elaboración de los quesos curados. El estudio de la adecuación de las cepas lácticas autóctonas en la elaboración y maduración del queso de leche de oveja Guirra fue llevado a cabo en dos grandes experimentos:

- El primero de ellos consistió en dos series de producciones de quesos (P1 y P2) realizadas en el CERPTA a escala de planta piloto. Para la realización de este trabajo se efectuaron un total de nueve producciones de queso por duplicado y

utilizando leche pasteurizada para evitar las interferencias de los microorganismos presentes de forma natural en la leche cruda.

- El segundo experimento fue llevado a cabo en la Formatgeria Granja Rinya de Valencia, trabajando con un mayor volumen de leche y siguiendo un protocolo de fabricación idéntico al establecido en las producciones efectuadas en el CERPTA. Se trabajó con leche cruda de oveja Guirra y se realizaron tres producciones de queso (P3) por duplicado.

En el primer experimento se realizaron inicialmente cuatro producciones de queso con leche pasteurizada de oveja (P1.A, B, C y D), utilizando una mezcla de microorganismos lácticos autóctonos para evaluar la influencia de las diferentes cepas proteolíticas en la maduración

En estas producciones de queso se estudiaron las características de composición general (extracto seco, materia grasa, pH, nitrógeno total, nitrógeno soluble, sal), de proteólisis secundaria (fracciones nitrogenadas, aminoácidos libres) y análisis organoléptico con un panel de catadores al final de la maduración (Figura 2). Las diferencias encontradas entre los quesos, así como el grado de aceptación por el panel de catadores, fue parcialmente atribuida a las diferentes actividades del fermento utilizado que provocó un marcado descenso de pH, como veremos a continuación. Así, se planteó la realización de una segunda serie de producciones de queso modificando la composición del fermento para determinar la influencia de otras cepas acidificantes en la maduración.

Sin embargo, en la época del año que se planteó esta segunda serie de fabricaciones de quesos, nos encontramos con el problema de la estacionalidad y dificultades de obtención de leche de oveja. Así, y ya que el estudio debía de progresar decidimos realizar esta fase con leche de vaca, teniendo en cuenta que la validación final se realizaría con leche de oveja. Previamente, se comprobó que la capacidad acidificante de los fermentos era esencialmente similar en leche de vaca y de oveja. Si bien la composición de las leches de vaca y oveja es diferente, sobre todo del punto de vista cuantitativo, los resultados obtenidos nos permitirían, como así fue, obtener datos para planificar mejor las pruebas definitivas con leche de oveja que correspondían a la escala industrial.

Se realizaron en total cuatro producciones de queso (P2.E, F, G, H) por duplicado, más una producción utilizando fermento comercial como control (P2.I). Con

estas producciones de queso se pudo estudiar la composición físico-química, proteólisis secundaria y aspectos sensoriales (Figura 2).

En estas producciones experimentales se observó que, en general, el pH estaba acorde con el tipo de queso que deseábamos elaborar. Sin embargo, algunos quesos, según la formulación de fermentos utilizada, desarrollaron una gran proteólisis secundaria, que afectó negativamente su aceptación por el panel de catadores.

De acuerdo con los resultados de composición y de proteólisis y del panel de catadores de los quesos elaborados en la Planta Piloto en las dos series de queso (P1 y P2) del primer experimento se seleccionaron dos fermentos para realizar el segundo experimento a escala industrial (P3). Los quesos de producción industrial (P3.J y L) obtuvieron una buena aceptación por el panel de catadores clasificándolos de forma global como buenos.

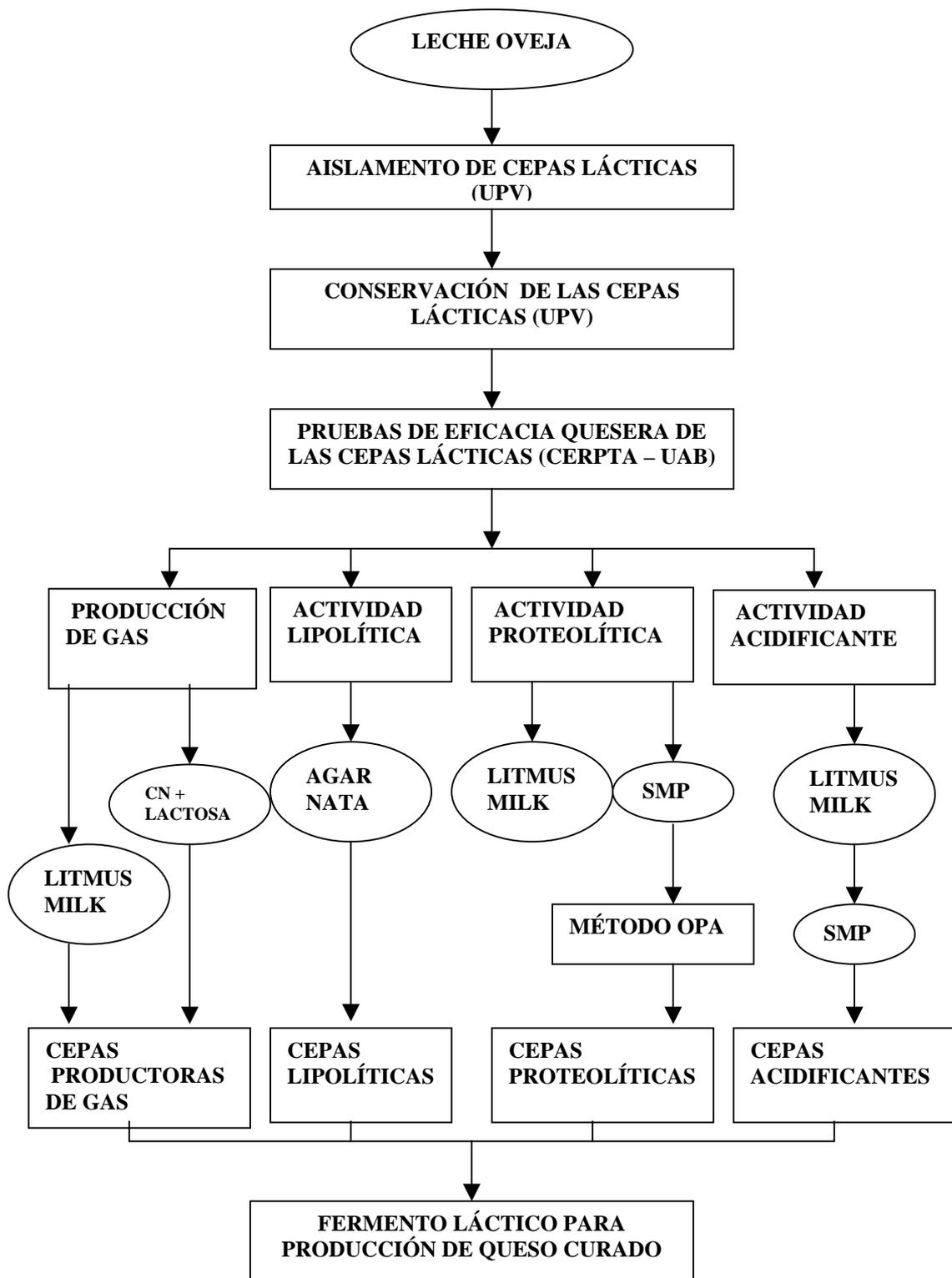


Figura 1- Plan de trabajo (parte I) seguido durante la caracterización tecnológica de las cepas.

CN = Caldo Nutritivo; SMP = Skim Milk Powder.

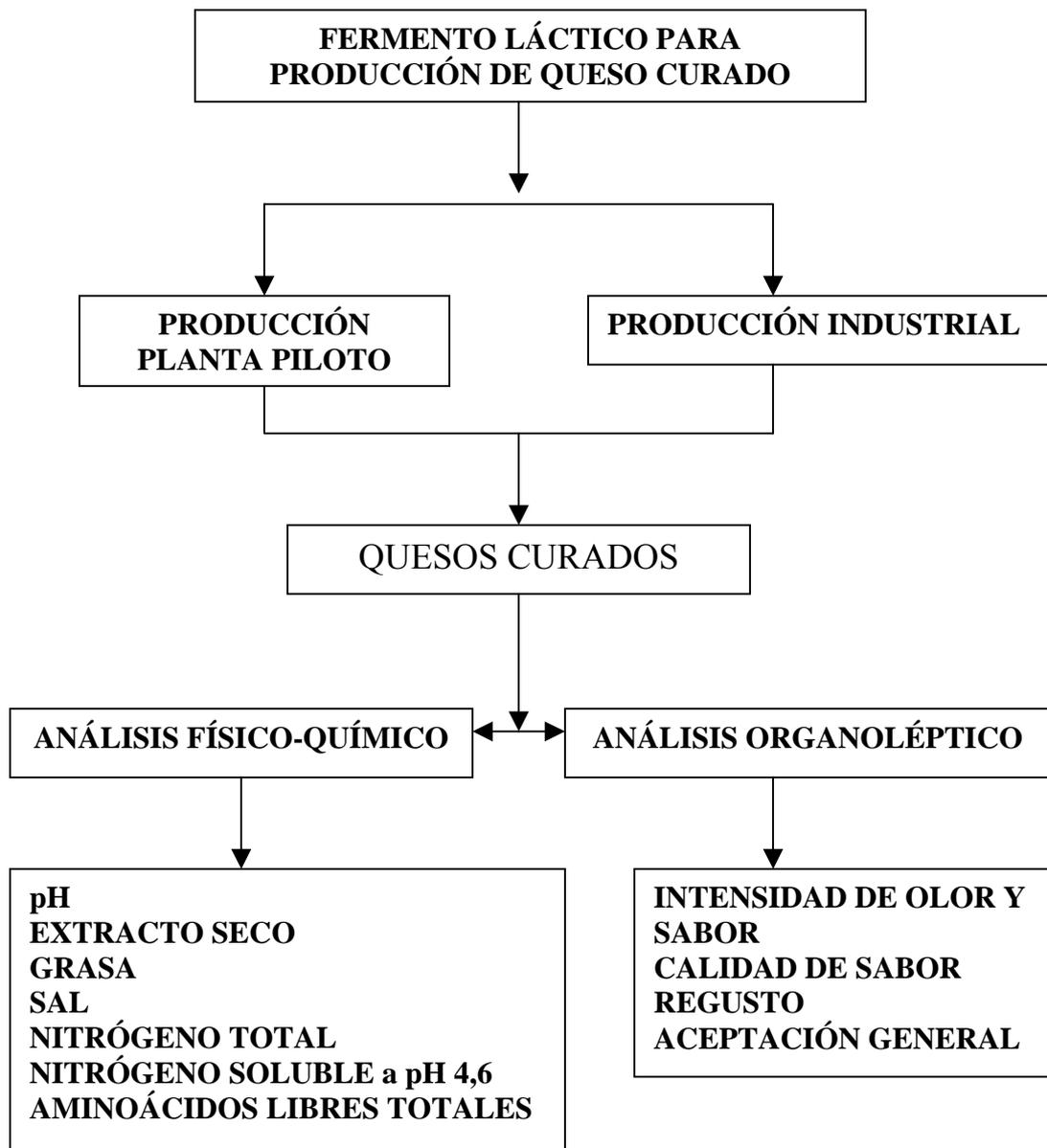


Figura 2- Plan de trabajo (parte II) seguido en los estudios de la eficacia quesera de las cepas lácticas autóctonas.

3- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1- CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE CEPAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS AISLADAS DE LECHE CRUDA DE OVEJA GUIRRA

En el presente estudio se utilizaron inicialmente métodos cualitativos para determinar la actividad lipolítica, proteolítica, acidificante y la capacidad de producción de gas de las cepas. El empleo de métodos cualitativos nos permitió descartar aquellas cepas que no presentaban las características tecnológicas deseadas. Posteriormente se utilizaron estudios cuantitativos en un número más reducido de cepas, para así determinar la capacidad de acidificación (curvas de acidificación) y de proteólisis.

3.1.1- CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS LÁCTICAS

Las cepas recibidas (anexo I) fueron conservadas en congelación en viales de criocongelación (Laboratorios Microkit, S.L, Madrid, España). Los viales de criocongelación son medios para el mantenimiento de cepas que contienen varias bolitas de vidrio poroso y líquido criogénico. Las bolitas están químicamente tratadas para mejorar la adherencia microbiana, mientras que el líquido esta especialmente formulado para asegurar la supervivencia del mayor número posible de cepas durante largo tiempo y una recuperación cuantitativa optimizada. Los viales de criocongelación fueron diseñados para facilitar la inoculación, manipulación y conservación de cepas microbianas. Sus ventajas más marcadas son que ahorran resiembras y evitan contaminaciones y mutaciones al tratarse siempre de la primera generación inoculada.

En la cabina de flujo laminar se introdujo asépticamente una suspensión espesa del cultivo o colonia de la cepa en el vial de criocongelación, después se eliminó asépticamente todo el líquido posible con la micropipeta para que luego no sea necesario descongelar la totalidad del vial para coger una bolita. Los crioviales fueron congelados a -20°C , y cada vez que se necesitó una cepa pura se extrajo el vial del congelador y se tomó asépticamente una bolita con una asa recta esterilizada a la llama. Todas las cepas fueron conservadas por duplicado.

3.1.2- PRUEBA DE LA ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Para evaluar la capacidad lipolítica de las cepas lácticas desarrollamos en nuestros laboratorios el medio de cultivo Agar Nata. El método consiste en sembrar la cepa en estudio en Agar Nutritivo con un 1% de nata añadida (38% de materia grasa) e incubar durante 72 h a 30°C . La presencia de un halo alrededor de la colonia se interpreta como lipólisis positiva. La ventaja de este método consiste en utilizar la grasa de la leche, que es el mismo sustrato que los microorganismos encontrarán en el queso. Este método fue comparado con el método Agar Tributirina encontrándose que los halos alrededor de las colonias fueron más visibles en Agar Nata tras 72 h de incubación. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

3.1.3- PRUEBA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y ACIDIFICANTE

La determinación de la actividad proteolítica y acidificante para cada una de las 169 cepas lácticas autóctonas fue determinada en tubos de ensayo con 10 mL del medio líquido “Bacto Litmus Milk” (Becton Dickinson France S.A., Le Pont de Claix, Francia). Éste es un medio para la diferenciación de microorganismos utilizado desde hace muchos años para evaluar las actividades metabólicas de microorganismos y para identificar especies bacterianas. La diferenciación se basa en la producción de ácidos y en la coagulación y/o proteólisis de caseína. La adición del “Litmus”, un indicador de pH y oxido-reducción, a la leche extiende su utilidad como un medio diferencial.

Con este medio se pueden observar varias reacciones: **Reacción Ácida** cuando el medio vira a rosado-rojo debido a la fermentación de los hidratos de carbono lactosa y

glucosa, y **Reacción Alcalina** que ocurre cuando no hay ninguna fermentación de hidratos de carbono (medio permanece de color azul) debido a que el microorganismo ataca las sustancias nitrogenadas presentes en el medio formando amoníaco o aminas básicas. También se pueden observar reacciones de: **Reducción** cuando el oxígeno es eliminado del “Litmus” por la enzima reductasa produciendo un descolorado con apariencia blanca láctea (la reducción normalmente empieza al fondo del tubo); formación de **Grumo o Cuajada** cuando ocurre la coagulación de la proteína de la leche debido a la precipitación de caseína por acción del ácido; y finalmente **Digestión** de la proteína de la leche, observable por una aclaración del medio y la disolución de los grumos por digestión de caseína.

La incubación del Litmus Milk se efectuó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días, realizando una lectura diaria de los tubos. Todos los análisis fueron realizados por duplicado.

3.1.4- PRUEBA DE PRODUCCIÓN DE GAS

La capacidad de producción de gas de las cepas fue realizada en tubos de ensayo con 10 mL de Caldo Nutritivo más 5% de lactosa y campana de Durhan. El inóculo añadido fue 0,1 mL de Caldo Nutritivo con la cepa en cuestión (previamente incubado 24 h a 30°C). Los tubos de caldo nutritivo lactosado se incubaron durante 4 días a 30 o 15°C . Los análisis se realizaron por duplicado.

3.1.5- DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ACIDIFICANTE

Esta determinación fue realizada con todos los microorganismos que coagularon el Litmus Milk el primer día de incubación. Las curvas de acidificación se realizaron de acuerdo con el protocolo para la determinación de la actividad acidificante de cultivos lácticos propuesta por la Federación Internacional de Lechería (IDF 306, 1995). La determinación consistió en inocular el microorganismo a evaluar (2%) en 10 mL de leche, que posteriormente se incubó a una temperatura de 30°C . La producción de ácido láctico fue monitorizada periódicamente mediante la determinación del pH del medio. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

3.1.6- DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

La cuantificación de la actividad proteolítica de las cepas lácticas fue realizada por el método espectrofotométrico descrito por Church et al. (1983) basado en el reactivo o-phthaldialdehído (OPA), ampliamente utilizado por diferentes autores (Oberger et al., 1991; Ibrahim, 1998; Wallace y Fox, 1998).

Según Church et al. (1983) el método espectrofotométrico OPA es un procedimiento rápido, conveniente y sensible para la determinación de proteólisis en leche. Las características específicas que hacen del método de ensayo OPA deseable para supervisar la proteólisis son: a) el reactivo OPA es soluble y estable en soluciones acuosas; b) la reacción con aminos primarias es completa en segundos a temperatura ambiente, y c) una sola alícuota de reactivo sirve tanto para inhibir la actividad proteolítica como para desarrollar el color de la reacción (Chen et al., 1979; Trepman et al., 1980).

La determinación consistió en inocular el microorganismo a evaluar (2%) en 10 mL de leche, que posteriormente se incubó a una temperatura de 30°C durante 24 h. Para la preparación de la muestra se tomaron 5 mL de leche con la cepa en crecimiento, se añadió 1 mL de agua, 10 mL de ácido tricloroacético 0,75 N, y después de mezclar se dejó reposar 10 min y se filtró con papel Whatman N° 1. Se recogieron 50 µL del filtrado y se añadió 1 mL de reactivo OPA. Finalmente, se leyó la absorbancia de la muestra a 340 nm en un espectrofotómetro de doble haz (Cecil 9000 SERIES, CECIL Instruments Limited, Cambridge, Reino Unido). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.2- FERMENTOS LÁCTICOS AUTÓCTONOS

3.2.1- FORMULACIÓN DE LOS FERMENTOS

Después de la caracterización de las 169 cepas lácticas autóctonas aisladas a partir de leche cruda de oveja Guirra, se seleccionaron 10 cepas de acuerdo a sus aptitudes tecnológicas (Tabla 7).

Tabla 7- Microorganismos usados como fermentos en este estudio

Cepa	Número
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	29, 30, 83, 94 y 95
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	18 y 148
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4
<i>Lactobacillus pentosus</i>	65
<i>Lactobacillus curvatus</i>	39

Estas cepas fueron combinadas en varias proporciones (Tabla 8) para proveer los fermentos que se utilizaron en la elaboración de quesos curados. De forma general, se puede observar que los fermentos lácticos se constituyeron con una bacteria acidificante más una bacteria lipolítica y una bacteria proteolítica. Además se realizaron dos elaboraciones con fermento comercial, que consistió en *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (AM Larbus S.A., Barcelona, España), como producciones control.

Tabla 8- Composición de los fermentos utilizados en la elaboración de queso curado

Producción	Fermento	Proporción de las cepas
P1.A	30 + 39 + 4	1:1:1
P1.B	30 + 39 + 18	1:1:1
P1.C	30 + 39 + 65	1:1:1
P1.D	30 + 39	1:1
P2.E	95 + 39 + 18	1:1:1
P2.F	29 + 39 + 4	1:1:1
P2.G	94 + 39 + 18	1:1:1
P2.H	83 + 148	1:1
P2.I	Comercial	
P3.J	94 + 39 + 18	1,5:1:1,5
P3.L	83 + 39 + 18	1,5:1:1,5
P3.M	Comercial	

La preparación de todos los fermentos lácticos fue realizada de manera aséptica en cabina de flujo laminar como se observa en la Figura 3. Se cogió un bolita del criovial con la cepa seleccionada y se introdujo en 10 o 20 mL de leche desnatada en polvo reconstituida a 20% y esterilizada a 90°C durante 30 min. Tras incubar 24 h a 30°C, se obtuvo el cultivo madre. Posteriormente para ampliar la biomasa se inoculó la totalidad del cultivo madre en 400 o 1000 mL de leche esterilizada que fue incubada 18-24 h a 30°C (fermento industrial).

Finalmente el día de elaboración del queso se mezclaron los fermentos industriales según las proporciones de la fórmula del fermento (Tabla 8), obteniendo de esta manera el volumen de fermento industrial necesario para la elaboración de quesos.

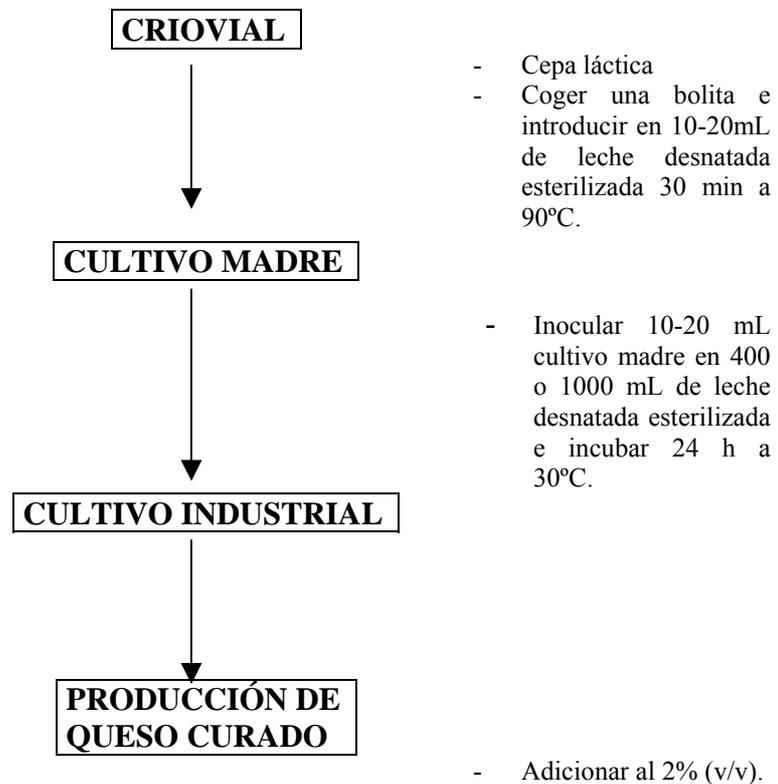


Figura 3. Protocolo utilizado en la preparación del fermento con cepas lácticas.

3.3- ELABORACIÓN DE QUESOS

El procedimiento de trabajo seguido en las producciones se puede observar en la Figura 4. Se partió de 25 L de leche pasteurizada (72°C, 15 s), la cual fue atemperada posteriormente a 32°C. Se añadió un 2% (v/v) de fermentos lácticos autóctonos y en las producciones control un 2% (v/v) de fermento comercial (compuesto por *Lc. lactis* subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris*). El fermento añadido se homogeneizó por agitación en toda la leche y se dejó reposar 18 min. Se agregaron luego 0,025% (v/v) de CaCl₂ al 35% (p/v) y un extracto de cuajo de ternero (Laboratorios Arroyos, Santander, España) al 0,02% (v/v) con actividad coagulante 1:10.000. Se dejó reposar la leche con el coagulante añadido aproximadamente 38-40 min a 32°C hasta que el gel formado adquirió la consistencia adecuada.

Seguidamente se procedió el corte del gel hasta tamaño de grano de arroz en dos etapas separadas por un tiempo de reposo de 2 minutos. Se recalentó la cuajada hasta 36°C y posteriormente se desueró. La cuajada fue colocada en moldes (13,6 x 13,2 cm) tipo Manchego provistos de gasa de algodón, y se prensaron durante 1 h a 0,5 kPa y 12 h a 2,5 kPa.

Finalmente, se salaron por inmersión en salmuera (19% de NaCl) a 12°C durante 4 h y se maduraron en cámara a 14°C y 85% de humedad relativa, volteándolos periódicamente, durante 60 o 90 días.

Las producciones industriales se realizaron en Formatgeria Granja Rinya empleando 40 L de leche cruda de oveja Guirra y con un protocolo de fabricación idéntico al utilizado en las producciones de Planta Piloto. Todas las producciones fueron realizadas por duplicado.

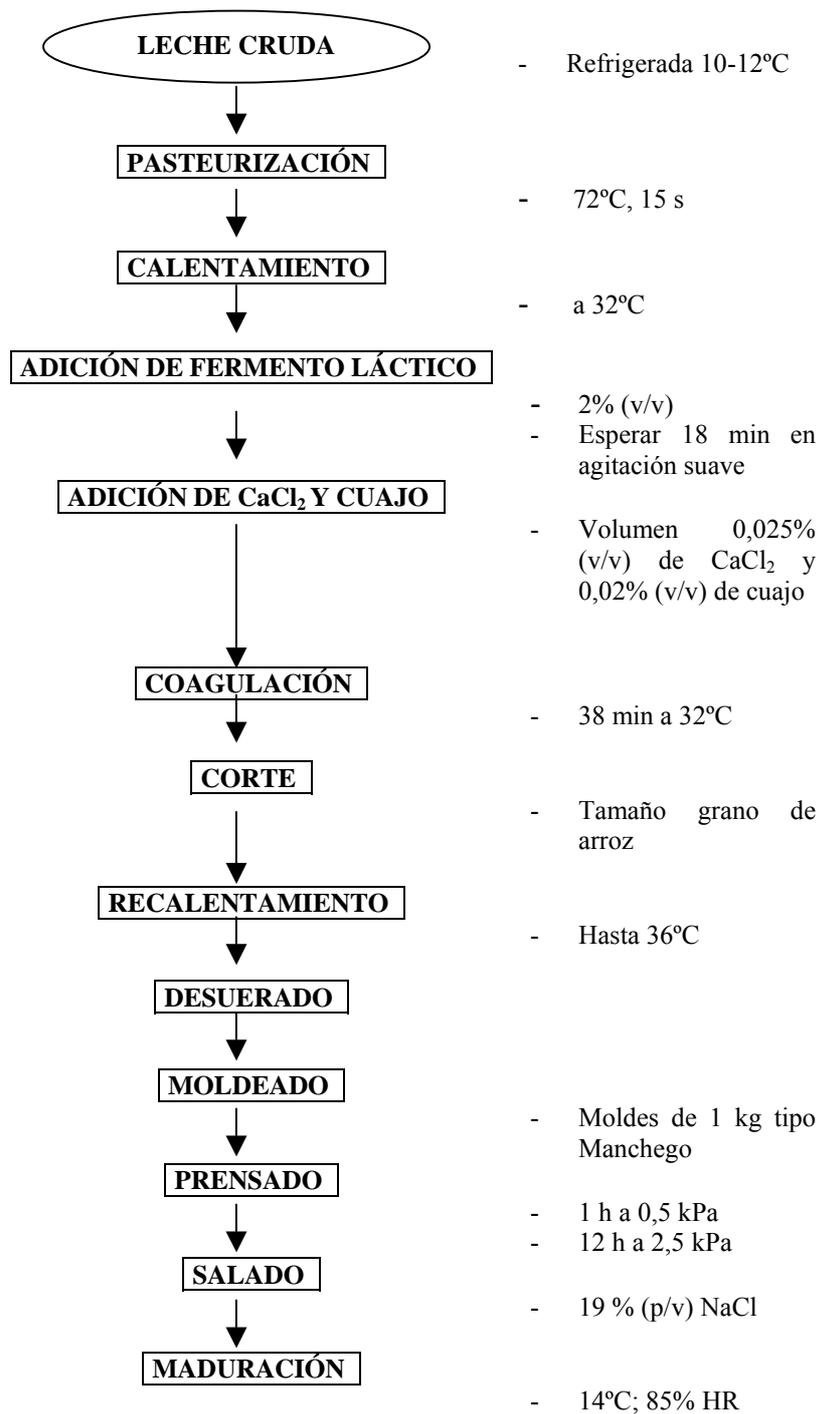


Figura 4: Protocolo utilizado en la elaboración de los quesos.

3.4- ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LOS QUESOS

Se realizaron las siguientes determinaciones a los días 1, 15, 30, 60 o 90 de maduración: extracto seco, materia grasa, nitrógeno total, nitrógeno soluble, aminoácidos libres y cloruros. El pH se midió a los días 1, 5, 15, 30 y 60 o 90 de maduración.

3.4.1- DETERMINACIÓN DEL pH

La determinación del pH de los quesos realizada en los días 1 y 5 se efectuó directamente por punción del queso, mientras que los restantes días fue hecha por homogenización de queso en agua destilada en proporciones de 1:1 (Ardö y Polychroniadou, 1998). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.4.2- DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO

El extracto seco (ES) de los quesos fue determinado utilizando un método de desecación en estufa (FIL-IDF 4A:1982). Esta determinación se basa en la evaporación de agua de la muestra en presencia de arena a una temperatura de $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.4.3- DETERMINACIÓN DE LA MATERIA GRASA

La determinación de la materia grasa de los quesos fue realizada utilizando el método butirométrico de van Gulik (ISO, 1975) por triplicado. El contenido en materia grasa (MG) se expresó en gramos por 100 gramos de extracto seco.

3.4.4- DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO TOTAL

La determinación del Nitrógeno Total (NT) de los quesos fue realizada utilizando el método propuesto por la FIL (FIL-IDF 20B, 1993). El análisis se basa en la digestión de una porción de muestra con una mezcla de ácido sulfúrico concentrado, y de sulfato de potasio y sulfato de sodio, utilizando sulfato de cobre (II) y óxido de titanio (IV) como catalizadores (Panreac Química SA, Barcelona, España). Posteriormente, se adiciona hidróxido de sodio en exceso para liberar el amoníaco, el cual es seguidamente destilado sobre una solución de ácido bórico y determinado utilizando una solución de ácido clorhídrico. El contenido en proteínas expresado en gramos por 100 gramos de producto se obtiene multiplicando el contenido en nitrógeno por el coeficiente 6,38.

5.4.5- DETERMINACIÓN DEL NITRÓGENO SOLUBLE

El Nitrógeno Soluble a pH 4,6 (NS), comprende las proteínas (excluyendo todas las caseínas), todos los péptidos, aminoácidos libres y pequeños compuestos nitrogenados tales como aminas, urea y amoníaco (Ardö, 1999).

La extracción de nitrógeno soluble en agua se realizó según el método de Kuchroo y Fox (1982). Se pesaron 30 g de queso finamente rallado y seguidamente se añadieron 60 mL de agua destilada. Después se homogenizó con ayuda de un homogenizador electromecánico (Heidolph Diax 900, Schwabach, Alemania), a 5000 rpm durante 5 minutos. La suspensión obtenida se calentó en baño maría a 40°C durante 1 h, para seguidamente centrifugarse a 7000 rpm durante 30 min a 10°C. El sobrenadante obtenido por centrifugación se filtró a través de lana de vidrio, y se guardó una parte para la determinación de aminoácidos libres. Al resto del filtrado (aproximadamente 30 g) se le añadieron 4 mL de ácido acético al 10% (v/v), 3,5 mL de acetato de sodio 1 M y agua destilada hasta un peso aforado de 50 g. Se dejó en reposo 12 h a 4°C. Seguidamente se filtró la solución con filtro Whatman N° 1, tomando aproximadamente 5 g del filtrado para cada tubo de digestión de Kjeldahl. A partir de este momento se siguieron los mismos pasos que en la determinación de nitrógeno

total. Los resultados se expresaron como % NT. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.4.6- DETERMINACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS LIBRES

La determinación de los aminoácidos libres de los quesos fue llevada a cabo utilizando el método Cadmio-Ninhidrina para la determinación de aminoácidos libres en queso descrito por Folkertsma y Fox (1992).

Se descongeló la fracción soluble en agua del queso que se había guardado en una de las etapas de la determinación del NS, y se tomaron entre 20-100 μL , se llevaron a 1 mL con agua destilada y se añadió 2 mL del reactivo Cd-Ninhidrina (compuesta por la mezcla de 0,8 g de ninhidrina en 80 mL de etanol a 99,5%, 10 mL de ácido acético y 1 g de CdCl_2 en 10 mL de agua). Seguidamente se llevó la solución al baño maría a 84°C durante 5 min y se enfrió rápidamente. Se transfirió la solución a una cubeta de espectrofotómetro de 4,5 mL y se realizó la lectura a 507 nm. Los valores obtenidos fueron procesados en función de una curva de calibración que se construyó con leucina, uno de los aminoácidos más abundantes en el queso. Los resultados fueron expresados como mg de leucina g^{-1} de queso. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.4.7- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CLORUROS

La determinación de cloruros de los quesos fue hecha con el Autoanalizador de Cloruros (Chloride Analyser Corning 926, Shawood Scientific Ltd., Cambridge, UK).

Se pesó en un vaso de precipitados 1 o 2 g de queso rallado (1 g para quesos con más de 1 mes de maduración y 2 g para quesos con menos de 1 mes), y se añadieron 50 mL de agua ultra pura “milli-Q”. Se homogenizó el queso y el agua con un homogenizador electromecánico (Heidolph Diax 900, Schwabach, Alemania), a 5000 rpm durante 4 o 5 min. Seguidamente se filtró con papel Whatman N° 1, y se diluyó el filtrado hasta 100 mL en matraz aforado y se hicieron las mediciones con el Autoanalizador de cloruros. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.5- EVALUACIÓN SENSORIAL

Los quesos fueron evaluados organolépticamente por 9 catadores, al día 60 o 90 de maduración. Se evaluaron la intensidad de olor y sabor, calidad de sabor, regusto y aceptación general. Se anotaron los resultados en una escala de 0 a 9, donde se consideró el valor 9 como excelente, 7-8 bueno, 5-6 aceptable, 3-4 ligero defecto, 1-2 gran defecto y 0 eliminado.

3.6- PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Los datos obtenidos de los diferentes experimentos fueron procesados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el procedimiento general lineal (GLM) del programa estadístico SAS (8ª versión). El test utilizado para la comparación de los datos fue el de Student-Newman-Keuls (SNK) con un nivel de significancia del 5% ($P < 0,05$).

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1- CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE LAS CEPAS LÁCTICAS AISLADAS DE LA LECHE DE OVEJA GUIRRA

Los quesos artesanos que se elaboran normalmente con leche cruda, se destacan por sus características específicas de sabor y aroma. Sin embargo, estos quesos, y según la normativa vigente (Real Decreto 1679/1994, de 22 de Julio), solamente pueden ser consumidos después de 60 días de maduración, tiempo suficiente para la destrucción de los microorganismos patógenos que eventualmente pueden estar presentes en la leche.

La pasteurización de la leche permite obtener productos lácteos con mejores características higiénicas, pues con este proceso se destruyen los microorganismos patógenos y la mayoría de los alterantes de la leche. Varios autores han sugerido que la utilización de fermentos lácticos autóctonos con leche pasteurizada ayuda a obtener productos con características similares a aquellos elaborados con leche cruda (Centeno et al., 1996; Medina et al., 2001; González et al., 2003,). Como consecuencia existe un gran interés en el estudio de los fermentos lácticos autóctonos para ser utilizado a gran escala en la elaboración industrial de quesos tradicionales que conserven las propiedades típicas del producto (Centeno et al., 1996; Menéndez et al., 1998, 1999; Estepar et al., 1999; Medina et al., 2001; Alonso-Calleja et al., 2002; Caridi, 2003; González et al., 2003; Herreros et al., 2003; Pérez et al., 2003).

Con el objetivo de seleccionar las cepas con características tecnológicas óptimas para la formulación de los fermentos iniciadores, evaluamos las capacidades acidificantes, proteolíticas, lipolíticas y de producción de gas de cepas lácticas aisladas en leche cruda de oveja Guirra. Este criterio de selección está de acuerdo con los

métodos normalmente utilizados en la selección de cepas lácticas para los cultivos lácticos iniciadores (Núñez et al. 1981; Requena et al. 1991; Menéndez et al. 1998).

4.1.1- DISTRIBUCIÓN DE LAS CEPAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS

La Tabla 9 muestra la distribución de cepas lácticas autóctonas aisladas en la leche cruda de oveja Guirra. El género presente en mayor proporción fue el de *Lactobacillus* (~56%), seguido por *Lactococcus* (~40%) y *Leuconostoc* (~4%). Podemos observar también que los *Lc. lactis* subsp. *lactis* fueron los microorganismos más abundantes, seguidas de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* y *Lb. plantarum*, grupo que en conjunto representa aproximadamente el 80% de la totalidad de las cepas.

Todos los lactococos fueron identificados como *Lc. lactis* subsp. *lactis*, de forma similar a lo observado por Centeno et al. (1996) y Medina et al. (2001) en leche de vaca y oveja, respectivamente. El número de cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* aislados en leche cruda de oveja Guirra con respecto al total de microorganismos (~40%) fue similar al observado por Centeno et al. (1996) en leche cruda de vaca.

En lo que respecta a los lactobacilos, la especie presente en mayor proporción en leche de oveja Guirra fue *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* seguido muy de cerca por *Lb. plantarum* (Tabla 9). Este elevado porcentaje de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* no había sido observado con anterioridad en leche. Centeno et al. (1996) describieron a *Lb. casei* subsp. *pseudopantarum* y *Lb. plantarum* como los microorganismos presentes en mayor proporción en leche de vaca dentro del género *Lactobacillus*, mientras que Medina et al. (2001) observaron que el 92% de los lactobacilos aislados de leche de oveja correspondieron a *Lb. plantarum* y el 8% restante a *Lb. acidophilus*.

Las bacterias lácticas del género *Leuconostoc* estuvieron presentes en menor proporción (~4% del total de cepas) en la leche de oveja Guirra. Medina et al. (2001) observaron que los microorganismos de este género fueron los menos abundantes en leche de oveja (~8%). Esto podría deberse a que las bacterias del género *Leuconostoc* requieren nutrientes complejos que no están disponibles en la leche (Vedamuthu, 1994; Hassan y Frank, 2001). La especie de *Leuconostoc* presente en mayor proporción en la leche de oveja Guirra fue *Leuconostoc lactis*. Por otro lado, Centeno et al. (1996) y Medina et al. (2001) observaron que *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* fue la especie más aislada dentro de este género en leches de vaca y oveja.

Tabla 9– Distribución (%) de las cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja Guirra

ESPECIE	SUBTOTAL	%
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	67	39,64
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	35	20,71
<i>Lactobacillus plantarum</i>	31	18,34
<i>Lactobacillus brevis</i>	8	4,73
<i>Lactobacillus pentosus</i>	6	3,55
<i>Lactobacillus salivarius</i>	4	2,37
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3	1,78
<i>Leuconostoc lactis</i>	3	1,78
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	2	1,18
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	1,18
<i>Lactobacillus crispatus</i>	2	1,18
<i>Lactobacillus curvatus</i>	1	0,59
<i>Leuconostoc lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1	0,59
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	1	0,59
<i>Leuconostoc m.</i> subsp. <i>mesenteroides/dextranicum</i>	1	0,59
<i>Lactobacillus coprophilus</i>	1	0,59
Género <i>Lactobacillus</i>	1	0,59
Total cepas	169	100,00

4.1.2- ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

El aumento en la concentración de ácidos grasos libres durante la maduración del queso tiene una gran influencia en el sabor (Farkye y Fox, 1990). Una concentración determinada de ácidos grasos libres es necesaria para un sabor óptimo, particularmente cuando están correctamente equilibrados con los productos de proteólisis u otras reacciones (McSweeney y Sousa, 2000). Sin embargo, un exceso de ácidos grasos o un perfil incorrecto de éstos es considerado indeseable para muchas variedades de quesos, como Cheddar, Gouda y tipo Suizo (McSweeney y Sousa, 2000).

La capacidad lipolítica de la totalidad de las cepas recibidas (169) fue evaluada utilizando el medio de cultivo Agar Nata. Solamente una cepa de *Lb. curvatus*, nº 39, presentó el halo de lipólisis característico.

Aunque generalmente es aceptado que las bacterias lácticas son poco lipolíticas, algunos autores han mostrado que ciertas cepas de *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. lactis* y *Lactococcus* spp. poseen lipasas y/o esterases capaces de hidrolizar la grasa de la leche (Gobbetti et al., 1996; Holland et al., 1996; Chick et al., 1997; Fox et al., 1997a; Freitas et al., 1999; Katz et al., 2002).

Freitas et al. (1999) y Katz et al. (2002) observaron que cepas de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* presentaron actividad lipolítica en agar tributirina. Otros autores utilizando métodos semicuantitativos (API-ZYM), observaron que las actividades lipasa, estearasa y estearasa-lipasa de la mayoría de los lactococos aislados de ciertos quesos artesanos fue negativa o extremadamente baja (Requena et al., 1991; Menéndez et al., 2001; Herreros et al., 2003). Según estos autores, las actividades lipasa y estearasa tampoco fueron importantes en las cepas de leuconostoc aisladas. Por otro lado, Menéndez et al. (1999, 2001) y Herreros et al. (2003) detectaron actividades lipásica y estearásica en algunas cepas de lactobacilos aisladas, principalmente en *Lb. plantarum*, *Lb. casei* subsp. *casei* y *Lb. casei* subsp. *pseudopantarum*.

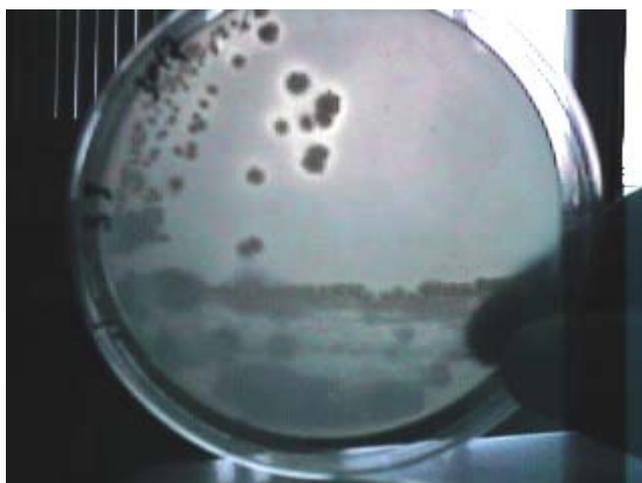


Figura 5: Colonias de *Lb. Curvatus* (nº 39) en Agar Nata, observándose los halos de lipólisis alrededor de las colonias

4.1.3- ACTIVIDAD ACIDIFICANTE

El paso inicial en un estudio de estas características fue el de clasificar de manera general a los microorganismos aislados en la leche de oveja Guirra. Desde el punto de vista tecnológico nos interesó conocer las capacidades acidificantes, proteolíticas y de producción de gas de las cepas de una manera rápida y sencilla.

Para realizar estas primeras clasificaciones utilizamos el medio de cultivo Litmus Milk. Este medio es utilizado hace muchos años para evaluar las actividades metabólicas de microorganismos en leche y ayudar en la identificación de especies bacterianas. El Litmus incorporado en la leche es a la vez indicador del pH y de oxidoreducción (Difco Laboratorios, 1998). Con este medio, además de evaluar las características acidificantes y proteolíticas de las diferentes cepas, se pudo verificar la presencia o no de gas. El empleo del Litmus Milk permitió orientar las investigaciones en un grupo más reducido de cepas para posteriormente realizar técnicas cuantitativas.

La Tabla 10 muestra las actividades acidificantes de las 169 cepas aisladas de la leche de oveja Guirra. Aproximadamente un 30% de cepas cuajaron totalmente el medio de cultivo en el primer día de incubación, mientras que tras 7 días, este porcentaje alcanzó valores cercanos al 85%.

Según Casalta et al. (1995) las cepas de lactococos que producen ácido rápidamente son incluidas frecuentemente en los fermentos de quesería. La disminución rápida del pH de la cuajada es de gran importancia en la tecnología quesera porque inhibe el desarrollo de los microorganismos indeseables (Cogan et al., 1987, 1997; Oliver et al., 1988; Fox et al., 1990; Kandarakis et al., 1998) y facilita a la vez el desuerado (Núñez et al., 1981; Requena et al., 1991).

Alonso-Calleja et al. (2002) compararon las actividades acidificantes de varios *Lc. lactis* subsp. *lactis* aislados a partir de leche de cabra. Estos autores dividieron las cepas en dos grupos dependiendo de la velocidad de producción de ácido; las cepas rápidas coagularon el medio Litmus Milk en 12-18 h, mientras que las lentas necesitaron 36 h para formar un coágulo. Aproximadamente un ~52% de los *Lc. lactis* subsp. *lactis* presentes en la leche cruda de oveja Guirra coagularon el Litmus Milk el primer día de incubación (Tabla 11), resultado similar (~57%) al observado por Alonso-Calleja et al. (2002).

Tabla 10- Actividad acidificante de las cepas lácticas aisladas de leche cruda de oveja Guirra

ESPECIE (n° de cepas)		DÍAS DE INCUBACIÓN						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>Lc. lactis lactis</i> (67)	CT	35	43	53	55	56	59	59
	CM	1	5	3	5	7	4	4
	CD	3	2	5	3	0	0	0
	SC	28	17	6	4	4	4	4
<i>Lb. paracasei paracasei</i> (35)	CT	7	30	35	35	35	35	35
	CM	6	3	0	0	0	0	0
	CD	5	1	0	0	0	0	0
	SC	17	1	0	0	0	0	0
<i>Lb. plantarum</i> (31)	CT	2	21	26	28	29	29	29
	CM	2	7	3	1	0	0	0
	CD	7	1	0	0	0	0	0
	SC	20	2	2	2	2	2	2
<i>Lb. brevis</i> (8)	CT	0	1	2	2	2	2	2
	CD	0	1	0	0	0	0	0
	SC	8	6	6	6	6	6	6
<i>Lb. pentosus</i> (6)	CT	3	5	5	5	5	6	6
	CM	2	1	1	1	1	0	0
	CD	0	0	0	0	0	0	0
	SC	1	0	0	0	0	0	0
<i>Lb. salivarius</i> (4)	CT	0	0	0	0	0	0	1g
	SC	4	4	4	4	4	4	3
<i>Lb. rhamnosus</i> (3)	CT	0	1	1	1	1	2	2
	CD	0	0	1	1	1	0	0
	SC	3	2	1	1	1	1	1
<i>Leuconostoc lactis</i> (3)	CT	2	2	2	2	2	2	2
	SC	1	1	1	1	1	1	1
<i>Lb. delbrueckii lactis</i> (2)	CT	1	1	1	1	1	1	1
	SC	1	1	1	1	1	1	1
<i>Lb. acidophilus</i> (2)	SC	2	2	2	2	2	2	2
<i>Lb. crispatus</i> (2)	CT	1	1	1	1	1	1	1
	SC	1	1	1	1	1	1	1
<i>Lb. curvatus</i> (1)	CT	0	0	0	1	1	1	1
	CD	0	0	1	0	0	0	0
	SC	1	1	0	0	0	0	0
<i>Leuconostoc lactis lactis</i> (1)	CT	1	1	1	1	1	1	1
<i>Leuc.mesen. mesenteroides</i> (1)	SC	1	1	1	1	1	1	1
<i>Leuc.mesen. mesenteroides/dextr</i> (1)	SC	1	1	1	1	1	1	1
<i>Lb. coprophilus</i> (1)	SC	1	1	1	1	1	1	1
Género <i>Lactobacillus</i> (1)	CT	0	0	1	1	1	1	1
	SC	1	1	0	0	0	0	0

Medio de cultivo Litmus Milk incubado a 35°C. g = gas; SC = sin coagulación; CD = coagulación débil; CM = coagulación moderada, CT = coagulación total.

La distribución porcentual de las cepas que cuajaron totalmente el Litmus Milk el primer día de incubación puede observarse en la Tabla 11. Como era de esperar los *Lc. lactis* subsp. *lactis* lideraron el grupo de cepas con mayor capacidad acidificante, seguido de las cepas de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* y en menor proporción *Lb. pentosus*.

Esta tabla sirvió de orientación para los estudios cuantitativos de la capacidad acidificante de cada cepa para posteriormente construir las curvas de acidificación. Con este método pudimos observar también que la cepa 46, correspondiente a un *Lb. salivarius*, produjo gas.

Tabla 11 – Distribución (%) de las cepas lácticas autóctonas que coagularon totalmente el medio Litmus Milk el primer día de incubación.

ESPECIE	SUBTOTAL	%
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	35	67,31
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	7	13,46
<i>Lactobacillus pentosus</i>	3	5,77
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	3,85
<i>Leuconostoc lactis</i>	2	3,85
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	1	1,92
<i>Lactobacillus crispatus</i>	1	1,92
<i>Leuconostoc lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1	1,92
Total cepas	52	100,00

4.1.4- DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ACIDIFICANTE

De acuerdo a lo observado en Litmus Milk aproximadamente un 30% de las 169 cepas lácticas cuajaron totalmente el medio al primer día de incubación. Con el objetivo de identificar las cepas que tienen mayor capacidad acidificante realizamos las curvas de acidificación de todas aquellas que cuajaron totalmente el Litmus Milk el primer día de incubación (Tablas 12 y 13).

En general, las cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* mostraron las mayores capacidades acidificantes en leche, mientras que la mayoría de los lactobacilos y leuconostoc fueron débiles productoras de ácido. Sin embargo, debemos hacer constar que existe una gran variación en la capacidad de producción de ácido entre los lactobacilos, indicando que esta habilidad depende de cada cepa, lo que coincide con observaciones previas (Gaya et al., 1990; Centeno et al., 1996; Pérez et al., 2003).

Los 35 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* estudiados exhibieron gran capacidad acidificante (Tabla 12). La mayoría de las diferencias en las capacidades acidificantes de los lactococos fueron encontradas en las primeras horas de incubación de la leche, coincidiendo con las observaciones realizadas por otros autores (Alonso-Calleja et al. 2002; Herreros et al., 2003). Todas las cepas exhibieron un comportamiento similar al cabo de 24 h; las diferencias en los valores de pH entre la cepa más y la menos acidificante fue de ~0,11 unidades de pH. Este hecho coincide con lo observado por Herreros et al. (2003) durante la caracterización tecnológica de cepas lácticas aisladas de queso de cabra.

Núñez et al. (1981) y Requena et al. (1991) consideraron adecuadas para su inclusión en cultivos iniciadores aquellas cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* que produjeron ácido láctico en leche hasta 25°D después de 6 h de incubación a 30°C, ya que el empleo de estos microorganismos aseguraba una correcta acidificación de la cuajada favoreciendo el desuerado y evitando la proliferación de la microbiota indeseable. Por otro lado, Caridi (2003) consideró adecuadas para su inclusión en cultivos iniciadores aquellas cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* que disminuyeron el pH a valores inferiores a 5 después de 24 h de incubación a 30°C. En el presente trabajo se observó que las 35 cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* estudiadas bajaron el pH a valores inferiores a 5 después de 24 h de incubación a 30°C.

Según estos dos criterios de selección, la mayoría de los lactococos evaluados podrían jugar un papel importante durante la elaboración y maduración del queso de oveja Guirra, contribuyendo a la acidificación del mismo.

En la Tabla 13 se puede observar que 3 de las 14 cepas del género *Lactobacillus* spp. que cuajaron el medio Litmus Milk en el primer día de incubación exhibieron valores de pH similares a las cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* a las 10 y 24 h de incubación. Estas cepas fueron *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (nº 6 y 153) y *Lb. pentosus* (nº 97).

Tabla 12 – Valores medios (n = 2) de la capacidad acidificante¹ de las cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* que coagularon el medio Litmus Milk después de 24 h de incubación

CEPA Nº	TIEMPO DE INCUBACIÓN (h)					
	2	4	6	8	10	24
95	0,11	0,25	0,64	0,98	1,40	2,05
13	0,06	0,16	0,46	0,98	1,54	2,12
156	0,01	0,19	0,68	1,28	1,59	2,12
56		0,17		1,13	1,56	2,12
155	0,07	0,44	0,92	1,33	1,59	2,09
24	0,07	0,18	0,59	1,33	1,62	2,10
25	0,07	0,15	0,65	1,25	1,62	2,10
53	0,03	0,13	0,57	0,97	1,63	2,06
116	0,09	0,39	0,82	1,44	1,63	2,09
125	0,02	0,32	0,77	1,40	1,65	2,12
29	0,11	0,36	0,90	1,42	1,66	2,12
77	0,15	0,37	0,83	1,49	1,67	2,10
96	0,07	0,27	0,77	1,42	1,67	2,10
89	0,17	0,48	0,96	1,52	1,68	2,12
26	0,09	0,27	0,82	1,44	1,68	2,11
23	0,04	0,39	0,81	1,48	1,70	2,10
90	0,06	0,23	0,83	1,34	1,70	2,05
83	0,09	0,31	0,92	1,49	1,71	2,09
114	0,11	0,27	0,86	1,45	1,71	2,11
130	0,00	0,35	0,76	1,29	1,71	2,14
10	0,03	0,31	0,74	1,45	1,72	2,13
14	0,04	0,33	0,78	1,30	1,72	2,08
20	0,04	0,45	0,93	1,50	1,73	2,11
30	0,15	0,37	0,98	1,49	1,73	2,11
48	0,18	0,44	0,97	1,49	1,73	2,16
50	0,17	0,42	0,83	1,44	1,73	2,11
42	0,17	0,43	0,90	1,46	1,73	2,15
38	0,16	0,45	1,03	1,53	1,74	2,15
19	0,05	0,41	0,93	1,54	1,74	2,10
7	0,04	0,39	0,97	1,47	1,75	2,14
15	0,04	0,39	0,90	1,51	1,75	2,12
92	0,06	0,25	0,91	1,39	1,76	2,06
93	0,09	0,26	0,83	1,37	1,76	2,07
134	0,04	0,45	0,95	1,51	1,77	2,15
94	0,11	0,27	0,80	1,38	1,77	2,13

Medio cultivo SMP, inoculados al 2% e incubados a 30° C.

¹ Capacidad Acidificante: $pH = pH_0 - pH_t$

Sin embargo, después de 24 h de incubación, aproximadamente 79% de los lactobacilos estudiados (Tabla 13) mostraron valores de pH inferiores a 5 según el criterio sugerido por Caridi (2003) la mayoría de los lactobacilos tendrían buenas capacidades acidificantes para ser incluidos en los fermentos iniciadores. De acuerdo con Herreros et al. (2003) los lactobacilos metabolizan la lactosa más lentamente, pero la producción final de ácido puede ser similar o a veces mayor que la de los lactococos.

Tabla 13 – Valores medios (n = 2) de la capacidad acidificante¹ de las cepas de *Lactobacillus* spp y *Leuconostoc* spp.

CEPA Nº	TIEMPO DE INCUBACIÓN (h)			
	4	8	10	24
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>				
81	0,13	0,44	0,65	1,33
18	0,09	0,49	0,77	1,85
148	0,20	0,59	0,82	1,86
67	0,11	0,58	0,86	1,90
40	0,16	0,67	1,00	1,82
6	0,18	0,98	1,30	2,08
153	0,32	1,18	1,67	2,22
<i>Lactobacillus plantarum</i>				
154	0,18	0,42	0,68	1,62
4	0,19	0,57	0,89	1,96
<i>Lactobacillus pentosus</i>				
91	0,21	0,70	0,91	1,50
65	0,20	0,65	1,03	1,86
97	0,21	1,10	1,46	2,15
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>				
57	0,13	0,56	0,92	2,03
<i>Lactobacillus crispatus</i>				
142	0,11	0,32	0,44	1,42
<i>Leuconostoc</i> spp.				
120	0,15	0,22	0,28	
165	0,15	1,12	1,46	
166	0,18	1,16	1,49	
104	0,33	1,48	1,75	
<i>Lactobacillus curvatus</i>				
39	0,01	0,01	0,02	

Medio cultivo SMP, inoculados al 2% e incubación a 30° C.

¹ Capacidad Acidificante: $pH = pH_0 - pH_t$

Contrariamente a lo observado con las cepas de lactococos, las capacidades acidificantes de los *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* mostraron grandes diferencias entre ellas, aproximadamente 1 unidad de pH entre la más y la menos acidificante (Tabla 13). Aunque la mayoría de los lactobacilos evaluados mostraron una moderada capacidad de acidificación en comparación a los lactococos, la inclusión de estas cepas en el fermento es importante debido al efecto positivo que ejercen en el flavor del queso (McSweeney et al., 1993; Lynch et al., 1997).

Se decidió incluir en la determinación de la capacidad acidificante todas las cepas del género *Leuconostoc* ssp. (presumiblemente productoras de gas) y la cepa n° 39 (lipolítica) para conocer su influencia en la capacidad acidificante de los fermentos mixtos (Tabla 13). Todas las cepas del género *Leuconostoc* ssp. que coagularon el medio

de cultivo Litmus Milk en el primer día de incubación exhibieron valores de pH similares a los de *Lc. lactis* subsp. *lactis* después de 10 h de incubación. La cepa nº 104 presentó una capacidad acidificante similar a las cepas más acidificantes de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, mientras que las cepas nº 120 y 39 mostraron muy poca capacidad de acidificación. Este resultado de las actividades acidificantes de las cepas nº 120 y 39 concuerda con las observaciones previas realizadas en Litmus Milk.

4.1.5- ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

La capacidad proteolítica de las cepas lácticas aisladas de la leche cruda de oveja Guirra fue evaluada en primer término con el medio Litmus Milk. La actividad metabólica de algunas cepas puede originar la digestión de las proteínas de la leche, fenómeno fácilmente observable en este medio de cultivo.

Ninguna de las 169 cepas lácticas aisladas de la leche de oveja Guirra mostró una digestión importante de la cuajada. Sin embargo, algunos microorganismos presentaron indicios de actividad proteolítica, que se manifestó como un precipitado blanco en el fondo del tubo de ensayo (Tabla 14). Este precipitado sólo fue visible en algunas cepas que no coagularon el Litmus Milk hasta el séptimo día de incubación. De las 24 cepas lácticas que no coagularon el medio de cultivo, aproximadamente un 40% de ellas presentaron indicios de actividad proteolítica.

Tabla 14 – Identificación de las cepas lácticas autóctonas con indicios de actividad proteolítica en medio Litmus Milk.

CEPA Nº	ESPECIE	OBSERVACIÓN
103	<i>Lb. plantarum</i>	+
117	<i>Lb. acidophilus</i>	+
137	<i>Lb. acidophilus</i>	+
120	<i>Leuconostoc lactis</i>	+
98	<i>Lb. plantarum</i>	++
118	<i>Lb. rhamnosus</i>	++
100	<i>Lb. salivarius</i>	++
157	<i>Lc. Lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++
157	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	++

Precipitación intensa (+++), moderada (++) y leve (+).

4.1.6- DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Para la determinación cuantitativa de la actividad proteolítica de las cepas lácticas aisladas en la leche cruda de oveja Guirra utilizamos un método espectrofotométrico con “O-phthaldialdehído” (OPA) desarrollado por Church et al. (1983).

Sorprendentemente, ninguna de las nueve cepas que presentaron indicios de proteólisis en Litmus Milk, manifestado como un precipitado en el fondo de los tubos, mostraron indicios de capacidad proteolítica cuantificables por OPA. Es posible que estos falsos positivos, observados en Litmus Milk, pudieran ocasionarse por deposición de la biomasa bacteriana en el fondo del tubo de ensayo tras 7 días de incubación.

Después de estas observaciones decidimos realizar el ensayo de OPA con la totalidad de las cepas lácticas recibidas (Tabla 15). Según el test, la mayoría de los microorganismos mostraron poca o nula capacidad proteolítica. Sin embargo, seis cepas (4 de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, 1 de *Lactobacillus plantarum* y 1 de *Lactobacillus pentosus*) exhibieron gran capacidad proteolítica. Las cepas con mayores actividades fueron una de *Lb. plantarum* (cepa nº 4) y una de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (nº 18) que incrementaron la absorbancia hasta 0,928 y 0,925, respectivamente, seguido por las tres cepas de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* que aumentaron la absorbancia en un intervalo comprendido entre ~0,7 y 0,872 y una cepa de *Lb. pentosus* con absorbancia de 0,897. También se observó una leve actividad proteolítica en ocho cepas de *Lactobacillus* ssp. y una cepa de *Leuconostoc mesenteriodes* subsp. *mesenteriodes/dextranicum* (Tabla 15). La cepa nº 39, que mostró actividad lipolítica en agar nata, manifestó también actividad proteolítica.

Requena et al. (1991) y Centeno et al. (1996) y Pérez et al. (2003) encontraron que entre todos los géneros de microorganismos evaluados durante la caracterización tecnológica de las bacterias lácticas aisladas de queso de leche de cabra y vaca, los lactococos mostraron la mayor actividad proteolítica, aunque observaron considerables variaciones entre las cepas. Mayo et al. (1990) en un trabajo de caracterización tecnológica de cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* aisladas de queso Cabrales (elaborado con mezcla de leche de vaca, oveja y cabra), observaron que los lactococos que poseen la capacidad de coagular rápidamente la leche también fueron los más proteolíticos.

Tabla 15- Actividad proteolítica de las cepas lácticas aisladas de leche cruda de oveja Guirra

ESPECIE	SUBTOTAL	PROTEÓLISIS ($A_{340\text{ nm}}$)		
		<0,01	0,01 a 0,1	>0,1
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	67	39	28	
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	35	7	24	4 { (0,925) cepa n° 18 (0,872) cepa n° 40 (0,795) cepa n° 67 (0,700) cepa n° 148
<i>Lb. plantarum</i>	31	6	24	1 (0,928) cepa n° 4
<i>Lb. brevis</i>	8	2	5	1 (0,112) cepa n° 170
<i>Lb. pentosus</i>	6	2	3	1 (0,897) cepa n° 65
<i>Lb. salivarius</i>	4		2	2 (0,105 y 0,113) cepas n° 37 y 46
<i>Lb. rhamnosus</i>	3	1	2	
<i>Ln. lactis</i>	3	2	1	
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	2		2	
<i>Lb. acidophilus</i>	2	2		
<i>Lb. crispatus</i>	2		1	1 (0,139) cepa n° 140
<i>Lb. curvatus</i>	1			1 (0,212) cepa n° 39
<i>Ln. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1		1	
<i>Ln. mes.</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	1		1	
<i>Ln. mes.</i> subsp. <i>mesent./dextr</i>	1			1 (0,111) cepa n° 133
<i>Lb. coprophilus</i>	1			1 (0,106) cepa n° 150
Género <i>Lactobacillus</i>	1		1	
Total cepas	169	61	95	13

Medio de cultivo leche desnatada. Incubación 24 h, 30°C.

Por el contrario, e independientemente de su capacidad de acidificación, ninguna de las cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* aisladas de la leche de oveja Guirra mostraron signos de gran capacidad proteolítica (Tabla 15).

La importancia de los lactobacilos en quesería radica principalmente en sus actividades proteolíticas y peptidolíticas (Menéndez et al., 1999a). El empleo de cepas de lactobacilos junto con lactococos en el fermento iniciador produce mejoras en el aroma y sabor de los quesos, además de una reducción en el amargor (Menéndez et al., 1999a). Desde el punto de vista higiénico-sanitario, los lactobacilos mesófilos son considerados microorganismos beneficiosos, capaces de inhibir el desarrollo de ciertas bacterias patógenas (Caridi, 2003). Sin embargo, el sistema proteolítico de los lactobacilos, en contraste con el de los lactococos, no ha sido estudiado con detenimiento (Sasaki, 1995).

Los datos sobre capacidad proteolítica obtenidos en este trabajo sugieren que no existe una relación estrecha entre las actividades acidificantes y proteolíticas para las cepas de lactobacilos, como fue también observado por Fortina et al. (1998) y Durlu-Ozkaya et al. (2001). Las cepas que mostraron mayor capacidad acidificante (Tabla 14) no son las que presentan los mayores valores de proteólisis con el método OPA. Así, cepas con baja capacidad acidificante (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* n° 18 o *Lb. plantarum* n° 4) exhibieron una gran capacidad proteolítica.

Sin embargo, es muy importante destacar que todos los lactobacilos con buena capacidad proteolítica encontradas en este estudio están incluidas en el grupo de las cepas que coagularon totalmente el Litmus Milk el primer día de incubación (Tablas 10 y 11). Por tanto, el interés tecnológico de estas cepas es doble, ya que presentan características acidificantes y proteolíticas.

4.1.7- PRODUCCIÓN DE GAS

Diferentes autores han confirmado que las bacterias ácido lácticas que suelen producir CO₂ son principalmente *Leuconostoc* spp. (Fox et al., 2000; McSweeney y Sousa, 2000; Hassan y Frank, 2001). Basándonos en estos estudios, investigamos la capacidad de producción de gas en cultivo puro y mixto de todas las cepas de este género más la cepa n° 46 (*Lb. salivarius*) que fue la única que produjo gas en Litmus Milk (Tabla 10).

Lamentablemente, recibimos sólo 6 cepas de *Leuconostoc* spp. y ninguna de ellas produjo gas en cultivo puro o mixto con otras cepas lácticas. Por otro lado la cepa de *Lb. salivarius* produjo gas en ambos cultivos, confirmando el resultado obtenido en Litmus Milk.

Tabla 16 – Producción de gas de las cepas de *Leuconostoc* ssp. y *Lactobacillus salivarius* (n° 46), aisladas de leche cruda de oveja Guirra

CEPA N°	ESPECIE	OBSERVACIÓN
46	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Positivo
104	<i>Leuconostc lactis</i> subsp. <i>lactis</i> .	Negativo
105	<i>Leuconostc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Negativo
120	<i>Leuconostc lactis</i>	Negativo
133	<i>Leuconostc mesenteroides</i> subsp. <i>Mesenteroides/dextr.</i>	Negativo
165	<i>Leuconostc lactis</i>	Negativo
166	<i>Leuconostc lactis</i>	Negativo

Medio de cultivo Caldo Nutritivo + 5% de lactosa con campana de Durhan, incubados a 15 o 30° C durante 3 días.

4.2- EVALUACIÓN DE LA EFICACIA QUESERA DE LAS CEPAS LÁCTICAS AISLADAS DE LA LECHE CRUDA DE OVEJA GUIRRA

Para comprobar la eficacia quesera de las cepas lácticas autóctonas, seleccionadas por los métodos anteriormente descritos, se procedió la elaboración de quesos en el CERPTA-UAB y a escala industrial en Formatgeria Rinya.

Inicialmente se evaluó la aptitud de las cepas para la elaboración de queso a pequeña escala (Planta Piloto), donde se realizaron 9 producciones experimentales. Las 4 primeras producciones (identificadas como P1) fueron realizadas con leche pasteurizada de oveja (72°C, 15 s) utilizando como fermentos las combinaciones de cepas que se muestran en la Tabla 8.

También en la Planta Piloto se elaboraron una segunda serie de producciones con leche pasteurizada de vaca (identificadas como P2), utilizando mezclas de nuevas cepas con aquéllas que utilizadas anteriormente habían mostrado propiedades tecnológicas adecuadas (Tabla 8). Las últimas producciones de quesos (identificadas como P3) fueron realizadas a escala industrial con leche cruda de oveja Guirra. La

selección de los microorganismos utilizados como fermentos se basó en los resultados obtenidos en todas las producciones efectuadas en la Planta Piloto del CERPTA.

4.2.1.- PRODUCCIONES DE QUESOS EN LA PLANTA PILOTO

4.2.1.1- PRIMER EXPERIMENTO: SERIE P1

4.2.1.1.1- Composición

Esta primera serie de experimentos (P1) se llevó a cabo en la Planta Piloto del CERPTA con leche pasteurizada de oveja. Los fermentos lácticos utilizados se constituyeron en general por una cepa acidificante más una lipolítica más una proteolítica.

P1.A = Acidificante (30) + Lipolítica (39) + Proteolítica 1 (4)

P1.B = Acidificante (30) + Lipolítica (39) + Proteolítica 2 (18)

P1.C = Acidificante (30) + Lipolítica (39) + Proteolítica 3 (65)

P1.D = Acidificante (30) + Lipolítica (39) (Control)

Los fermentos A, B y C mostraron una gran capacidad de acidificación, disminuyendo notablemente el pH de los quesos hasta valores próximos a cinco (Figura 6). Por otro lado, el descenso de pH fue menor en los quesos elaborados con el fermento D, hecho posiblemente debido a que este fermento estaba compuesto sólo por dos cepas (Acidificante + Lipolítica), destacando la importancia del efecto sinérgico entre los microorganismos del fermento en acidificar el medio (Lee et al. 1990; Lynch et al., 1997; Hynes et al., 2003).

Lynch et al. (1997) estudiaron la contribución del fermento y de diferentes cepas de lactobacilos añadidos como fermento adjunto (*Lb. casei*, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum*, *Lb. plantarum*, y *Lb. curvatus* mezclados en igual volumen) en la maduración de queso Cheddar elaborado en condiciones asépticas. Estos autores encontraron menores valores de pH (0,2-0,3 unidades) en los quesos que contenían los lactobacilos adjuntos, explicándolo por el metabolismo de la lactosa residual (con la consiguiente producción de ácido láctico) por los lactobacilos. De la misma forma, Lee et al. (1990) elaboraron queso Cheddar utilizando un fermento comercial (*Lc. lactis*

subsp. *lactis* y *Lc. lactis* subsp. *cremoris*) más una cepa de lactobacilo añadido. Estos autores observaron que ciertas combinaciones microbianas causaban un mayor descenso de pH, que era mayor cuando se utilizaba como fermento adjunto *Lb. casei* subsp. *ramnosus*, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* y *Lb. plantarum*, en este orden. Así, el efecto sinérgico entre las diferentes cepas que componen el fermento, así como el consumo de la lactosa residual por los lactobacilos, podría explicar las diferencias en los valores de pH encontrados en el presente estudio.

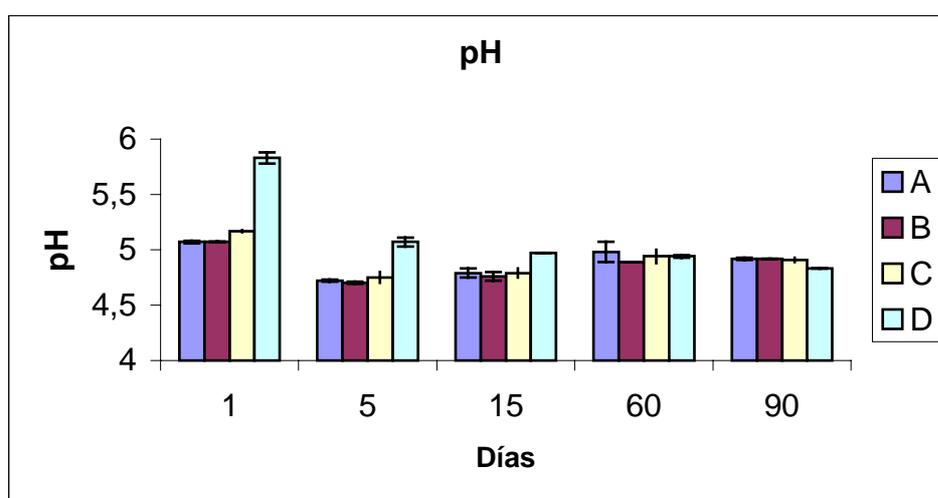


Figura 6 – Evolución del pH de los quesos de leche de oveja elaborados (serie P1) con fermentos lácticos autóctonos.

Al inicio de la maduración los quesos elaborados con los fermentos A y B exhibieron valores de pH similares ($P < 0,05$), mientras que aquellos elaborados con los fermentos C y D fueron mayores (Figura 6). A los 5 días de maduración se observó que los valores de pH disminuyeron en todos los quesos, aunque esta vez no se observaron diferencias entre las producciones A, B y C. Tras 15 días de maduración se observó una pequeña neutralización de los valores de pH que pudo deberse a la formación de compuestos nitrogenados alcalinos por fenómenos de proteólisis del queso y/o al catabolismo del ácido láctico. La producción D no mostró recuperación del pH debido posiblemente a las diferencias en el fermento iniciador. Probablemente la ausencia de una cepa proteolítica influyó negativamente en la liberación de compuestos alcalinos que neutralizasen parcialmente el pH de los quesos.

Nuestros resultados de pH fueron similares a los obtenidos por Gómez et al. (1999), quienes al elaborar queso Manchego utilizando una cepa autóctona de *Lc. lactis* subsp. *lactis* encontraron que el pH disminuyó hasta 4,85 a los 15 días, aumentando posteriormente hasta 4,94 al final de la maduración. Sin embargo, la evolución de pH

obtenida en este trabajo difiere de la observada en muchos otros quesos de oveja de características y proceso de elaboración similares, en los que la caída de pH no fue tan pronunciada (Marcos et al., 1985; Núñez et al., 1989; Pavia et al., 1999). Núñez et al. (1989) observaron que el pH del queso Manchego elaborado con leche pasteurizada de oveja disminuyó hasta 5,1-5,3 en la primera semana, aumentando hasta 5,3-5,5 al día 90 de maduración. De igual forma, en un estudio sobre la evolución de la composición y textura de un queso tipo Manchego durante la maduración, Pavia et al. (1999) observaron que el pH de los quesos disminuyó hasta ~5,3-5,4 en el primer día de maduración.

Estos bajos valores de pH pueden haber influido, como expondremos a continuación, en el normal desarrollo de la proteólisis y/o del flavor de los quesos estudiados.

La Tabla 17 muestra la composición de los quesos elaborados con fermentos autóctonos A, B, C y D durante la maduración. De forma general, la composición de estos quesos se adecua a las encontradas normalmente en quesos de leche de oveja de características similares (Manchego, Roncal, Idiazábal, etc.).

Los quesos de la producción D mostraron los mayores ($P < 0,05$) valores de humedad durante toda la maduración. Es bien conocida que una menor acidificación retarda el desuerado (Eck, 1990; Stanley, 1998). Como hemos comentado anteriormente, los quesos de la producción D exhibieron los mayores valores de pH, hecho que posiblemente haya favorecido una mayor retención de humedad.

Los quesos elaborados con el fermento D exhibieron los menores porcentajes de materia grasa ($54,08\% \pm 0,89$), mientras que en los demás quesos estos valores fueron similares ($56,94\% \pm 0,77$). Estas diferencias se mantuvieron durante la maduración. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los valores de proteínas de los quesos, que estuvieron comprendidos entre 32,3–33,1% al día 90 de maduración, y en los valores de sal en humedad (S/H) al inicio ($2,32 \pm 0,08$) o al final ($6,17 \pm 0,24$) de la maduración. Estos valores de S/H concuerdan con los encontrados habitualmente en quesos curados. De acuerdo con Fox et al. (2000), los quesos curados poseen normalmente un 4-6% de S/H, mientras que un queso Manchego con 90 días de maduración presenta aproximadamente un 5-7% de S/H (Núñez et al., 1989).

Tabla 17 – Valores medios (n = 2) de composición de los quesos elaborados con leche pasteurizada de oveja (serie P1).

	DÍA	PRODUCCIONES Y FERMENTO			
		A	B	C	D
ES (%)	15	56,64 ^a ± 0,14	57,14 ^a ± 0,19	56,64 ^a ± 1,30	49,47 ^b ± 0,16
	60	67,58 ^b ± 0,27	69,13 ^a ± 0,40	68,52 ^{ab} ± 2,08	58,11 ^c ± 0,25
	90	73,34 ^b ± 0,26	74,34 ^a ± 0,98	73,74 ^{ab} ± 1,91	63,05 ^c ± 0,09
S/H (%)	15	2,31 ^a ± 0,06	2,43 ^a ± 0,24	2,34 ^a ± 0,02	2,23 ^a ± 0,16
	60	4,61 ^a ± 0,07	4,97 ^a ± 0,18	5,24 ^a ± 0,50	4,13 ^a ± 0,21
	90	6,11 ^a ± 0,06	6,26 ^a ± 0,27	6,43 ^a ± 0,39	5,87 ^a ± 0,17

Fermentos: A = 30+39+4; B = 30+39+18; C = 30+39+65; D = 30+39

ES = extracto seco; MG = materia grasa; S/H: sal en humedad

^{a,b,c} Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas (P<0,05)

4.2.1.1.2- Fracciones Nitrogenadas

La Figura 7 muestra la evolución del nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS) de los quesos elaborados con los cuatro tipos de fermentos autóctonos A, B, C y D. Los valores de NS aumentaron a lo largo de la maduración de todos los quesos alcanzando al cabo de 90 días valores de aproximadamente 30-32% del nitrógeno total (NT). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Núñez et al. (1976) y Marcos et al. (1976) en queso Manchego curado (26,4-31,4%).

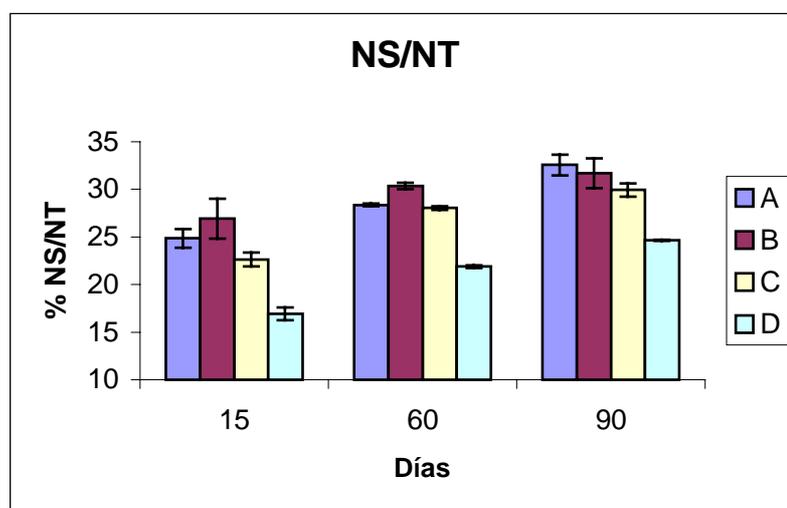


Figura 7 – Evolución de NS/NT de los quesos de leche de oveja (serie P1) elaborados con fermentos lácticos autóctonos.

Inicialmente los quesos elaborados con fermento B mostraron mayores ($P < 0,05$) valores de NS en relación con los elaborados con los fermentos A y C, aunque al final de la maduración no se observaron diferencias significativas entre estos quesos. Por otro lado, en la producción D los valores de NS fueron inferiores ($P < 0,05$) a los obtenidos en el resto de producciones durante toda la maduración.

Lane y Fox (1996) encontraron diferencias en los valores de NS entre los quesos elaborados con y sin lactobacilos añadidos y utilizando glucono- δ -lactona (GDL) para acidificar el medio. El contenido de NS en los quesos con lactobacilos añadidos fue ligeramente mayor que en los correspondientes quesos control durante toda la maduración, reflejando quizás la actividad proteásica de los lactobacilos o una mayor actividad de las enzimas coagulantes residuales causada por el menor pH de los quesos experimentales. Es bien conocido que un pH bajo en las fases iniciales de elaboración del queso favorece la retención de las enzimas coagulantes, y que además estas enzimas poseen mayor actividad a pH bajos (Eck, 1990; Creamer et al., 1985). De la misma forma Requena et al. (1992) observaron mayores valores de NS en quesos de cabra elaborados con un fermento autóctono en comparación con los quesos control (sin fermento). Así, los microorganismos del fermento podrían ser parcialmente responsables de las diferencias en NS encontradas. Sin embargo, estos microorganismos no son el principal factor responsable de la hidrólisis inicial de la caseína en el queso, ya que su función esencial es aumentar los valores de aminoácidos libres y nitrógeno no proteico a partir de los polipéptidos y péptidos generados por acción de las enzimas coagulantes, plasmina y tal vez catepsina D sobre las caseínas (Visser 1977).

Hynes et al. (2003 a,b) elaboraron queso utilizando un fermento compuesto por *Lc lactis* subsp. *lactis* o *Lc lactis* subsp. *cremoris* y diferentes cepas de lactobacilos añadidas como fermento adjunto. Estos autores no encontraron diferencias en los valores de NS entre los quesos experimental y control (sin fermento adjunto), evidenciando que los lactobacilos no participan en la ruptura de las caseínas *in situ* y confirmando la dependencia de la actividad de las enzimas coagulantes. Así, los mayores valores de NS observados en las producciones de queso con fermentos A, B y C podrían explicarse por una mayor actividad de las enzimas coagulantes, debido al menor pH, en las primeras etapas de maduración de estos quesos (Figura 6).

En lo que respecta al contenido de aminoácidos libres totales (AA), al inicio de la maduración las cuatro producciones de queso mostraron similares ($P > 0,05$) contenidos. La concentración de AA en el queso está relacionada con la actividad

aminopeptidasa bacteriana (Astron et al., 1983), y se considera como un indicador del desarrollo del aroma y sabor (Farkye, y Fox, 1990). Según Bartels et al. (1987), las cepas de lactobacilos que exhiban una alta actividad aminopeptidasa podrían acelerar la maduración del queso sin desarrollo excesivo de amargor.

Al final de la maduración los quesos que contuvieron una cepa proteolítica de lactobacilos (fermento A: *Lb. plantarum*; fermento B: *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* y fermento C: *Lb. pentosus*) mostraron niveles mucho mayores de AA en comparación a aquellos elaborados con fermento D (sin lactobacilo proteolítico añadido). Varios autores han informado que, de igual forma a lo observado en el presente trabajo, los cultivos adjuntos de lactobacilos aumentaron la concentración de AA en quesos Cheddar (Lane y Fox, 1996; Lynch, 1997, 1999), Tetilla (Menéndez, 2004), Arzúa-Ulloa (Menéndez et al. 1999a), etc.

Lane y Fox (1996) observaron que la concentración de AA fue considerablemente mayor en los quesos Cheddar elaborados con fermento (~3 mg leucina g⁻¹ queso) en comparación con la observada en los quesos acidificados con GDL (~0,5-1 mg leucina g⁻¹ queso). Estos autores comprobaron que al añadir un fermento adjunto compuesto por seis cepas de lactobacilos, tanto los quesos acidificados con GDL como los que habían sido fabricados con fermento, aumentaron la concentración AA. Estos resultados fueron posteriormente confirmados por Lynch et al. (1997) quienes elaboraron queso Cheddar controlando estrictamente las condiciones microbiológicas para evitar las contaminaciones con bacterias lácticas que no pertenecen al fermento (NSLAB).

Al final de la maduración de los quesos, la mayor (P<0,05) concentración de AA fue observada en la producción que llevó el fermento B, (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei*), mientras que en las producciones A (*Lb. plantarum*) y C (*Lb. pentosus*) los niveles de aminoácidos libres totales fueron similares. De igual forma que lo sucedido con los valores de NS, los quesos elaborados con el fermento D mostraron la menor (P<0,05) concentración.

Lynch et al. (1999) estudiaron la influencia de cultivos adjuntos (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* o *Lb. plantarum*) en la proteólisis y características sensoriales de queso Cheddar. De forma similar a los resultados obtenidos en nuestro trabajo (Figura 8), y a pesar de las variaciones entre cepas, los quesos Cheddar elaborados con *Lb. paracasei* presentaron mayores concentraciones de aminoácidos que aquellos fabricados con *Lb. plantarum*.

La determinación de la actividad proteolítica (sección 4.1.6) en leche, mostró que las cepas de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* n° 18 y de *Lb. plantarum* n° 4 poseían actividades proteolíticas similares ($P > 0,05$), mientras que la cepa de *Lb. pentosus* n° 65 fue inferior. Sin embargo, en el queso y tal vez por el efecto de la asociación entre cepas o la disminución de la humedad y/o adición de sal, la actividad proteolítica de la cepa n° 18 fue mayor que la observada en los quesos elaborados con las cepas n° 65 y 4 al final de la maduración. Este hecho destaca también la importancia de la asociación e interacción de las diferentes cepas del fermento en el resultado final global.

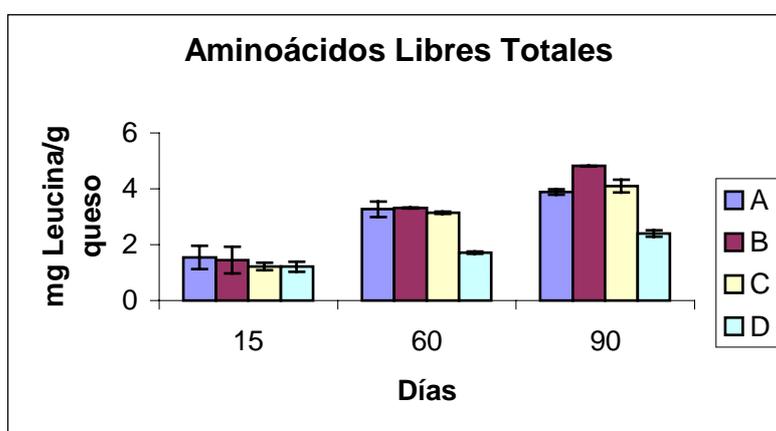


Figura 8 – Evolución del contenido de los aminoácidos libres totales de los quesos de leche de oveja elaborados (serie P1) con fermentos lácticos autóctonos.

4.2.1.1.3- Análisis sensorial

Los quesos de todas las producciones tuvieron gran intensidad de olor y una aceptable intensidad de sabor (Tabla 18). Lamentablemente, se encontraron una serie de defectos en todos los quesos, como ausencia de sabor típico, amargor y sabor ácido. Este último atributo recibió las máximas puntuaciones para los quesos elaborados con los fermentos A, B y C.

Requena et al. (1992) y González-Crespo (1993) evaluaron diferentes combinaciones de microorganismos autóctonos (*Lc. lactis*, *E. faecalis*, *Lb. casei*, *Ln. mesenteroides*, etc) para utilizarlos como fermento en queso de cabra. El análisis sensorial de los quesos obtenidos mostró que ciertas combinaciones de microorganismos provocaron defectos tales como ausencia de sabores típicos, sabores amargos, ácidos y una textura de pasta reseca/ciega y poco madurada. Los autores asociaron la aparición de estos defectos a la elevada capacidad acidificante de los

fermentos utilizados. De la misma forma, Lee et al. (1990) observaron que ciertas combinaciones microbianas causaron un mayor descenso de pH en queso Cheddar, y que esta rápida producción de ácido afectaba negativamente el sabor de los quesos, provocando amargor, “off flavors”, acidez y cambios en la textura (friabilidad).

Las puntuaciones máximas para la valoración global correspondieron a los quesos elaborados con los fermentos C y B, mientras que las mínimas fueron para aquellos fabricados con el fermento A (Tabla 18). Según el panel de catadores las producciones A y D presentaron regusto rancio, lo que podría explicar sus bajas valoraciones globales. El fermento A estaba compuesto por una cepa acidificante de *Lb. lactis* subsp. *lactis* más una cepa lipolítica de *Lb. curvatus* y como característica diferenciadora una cepa de *Lb. plantarum*. Peterson y Marshall (1990) mostraron que el *Lb. plantarum* es la principal bacteria dentro del grupo de NSLAB en ciertos quesos Cheddar. Sin embargo, cuando este microorganismo ha sido utilizado como fermento adjunto en la elaboración de queso, se ha descrito la aparición de sabores poco típicos, exceso de acidez y amargor, así como también defectos en la textura del producto (Lee et al., 1990; Antonsson et al., 2002). Por otro lado, la rancidez descrita por el panel de catadores en los quesos de la producción D podría explicarse por la mayor proporción de la cepa lipolítica (*Lb. curvatus*) en el fermento.

Tabla 18 – Análisis sensorial de los quesos de leche de oveja (serie P1) elaborados con fermentos lácticos autóctonos.

TIPO FERMENTO	OLOR	SABOR			VALORACIÓN GLOBAL
		Intensidad	Calidad	Regusto	
A	6,4	6,8	3,2	1,8	2,8
B	6,4	6,4	5,2	3,4	5,2
C	6,4	6,8	4,8	3,4	5,6
D	7,2	7,2	4,4	2	4,4

Panel de 9 catadores al final de la maduración

Las características sensoriales de los quesos de la primera serie de producciones (P1) fueron determinantes en las siguientes producciones. El sabor ácido descrito en los quesos elaborados con los fermentos A, B y C podría estar relacionado con la rápida producción de ácido láctico por los microorganismos del fermento (Figura 6). La acidificación obtenida en nuestros quesos resultó excesiva, lo que posiblemente afectó el normal desarrollo de la proteólisis o de un flavor equilibrado. En consecuencia, la

acción correctora que se adaptó fue la sustitución de la cepa de *Lc. lactis* subsp. *lactis* n° 30 por otros microorganismos de menor capacidad acidificante.

4.2.1.2- PRIMER EXPERIMENTO: SERIE P2

4.2.1.2.1- Composición

Para ampliar los estudios de caracterización tecnológica de cepas lácticas autóctonas utilizadas en el experimento anterior y determinar la influencia de otras cepas acidificantes y proteolíticas en la maduración, elaboramos cinco producciones de queso con leche pasteurizada de vaca (P2). Todas las producciones de queso fueron elaboradas por duplicado.

En general, los fermentos autóctonos experimentales utilizados en este experimento estaban constituidos de la siguiente forma: una cepa acidificante, una lipolítica y una proteolítica. Las producciones P2.H estaban compuestas sólo por una cepa acidificante y una proteolítica con la finalidad de comparar sensorialmente el efecto de la cepa lipolítica sobre la maduración del queso.

P2.E = Acidificante (95) + Lipolítica (39) + Proteolítica 2 (18)

P2.F = Acidificante (29) + Lipolítica (39) + Proteolítica 1 (4)

P2.G = Acidificante (94) + Lipolítica (39) + Proteolítica 2 (18)

P2.H = Acidificante (83) + Proteolítica 6 (148)

P2.I = Fermento Comercial (Control)

La Figura 9 presenta los resultados de la evolución de pH durante la maduración de los quesos. Los quesos elaborados con los fermentos E y F presentaron los mayores ($P < 0,05$) valores de pH al inicio de la maduración, mientras que en aquellos quesos elaborados con los demás fermentos fueron similares. Este hecho puede ser explicado porque las cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* n° 95 y 29 utilizadas en las producciones E y F presentaron menor capacidad acidificante (Tabla 12), y como era de esperar originaron un descenso de pH menor que las demás. Hay que destacar, sin embargo, que los pH de los quesos de las producciones G, H e I fueron semejantes a los

encontrados en la mayoría de quesos con características y proceso de elaboración similares a los de este trabajo (Marcos et al. 1985; Núñez et al., 1989; Pavia et al., 1999).

El pH disminuyó ($P < 0,05$) hasta el día 5 de maduración en las producciones E, G e I, y hasta el día 15 en la producción F, para luego estabilizarse o aumentar levemente. Al cabo de 60 días las producciones E e I exhibieron los mayores valores de pH, mientras que las demás producciones no mostraron diferencias.

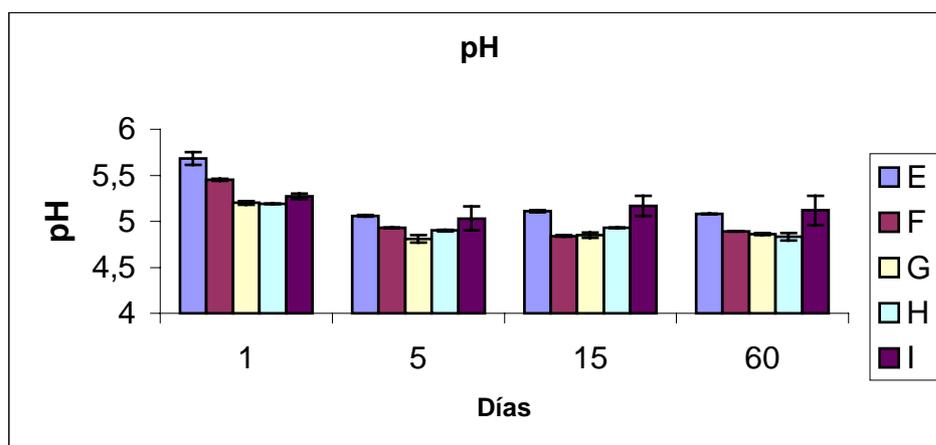


Figura 9 – Evolución del pH de los quesos de leche de vaca elaborados (serie P2) con fermentos lácticos autóctonos.

El extracto seco (ES) de los quesos aumentó considerablemente a lo largo de la maduración desde aproximadamente $53,9\% \pm 0,84$ hasta $64,2\% \pm 3,78$, debido a la evaporación del agua de la superficie de los quesos. No se observaron diferencias significativas entre los ES de los diferentes quesos ni al principio ni al final de la maduración. Tampoco se observaron diferencias en la concentración de S/H de los quesos, que estuvo comprendida entre $2,65\% \pm 0,46$ al inicio y $4,65 \pm 0,95$ tras 60 días de maduración.

El contenido en grasa de los quesos se situó en un valor medio de $51\% \pm 1,2$ en ES, y el de proteínas en un $37\% \pm 1,94$ en ES. Como era de esperar estos parámetros se mantuvieron constantes durante los 60 días de maduración en todos los quesos. Todos estos valores están dentro de los intervalos normales de composición para un queso madurado.

4.2.1.2.2- Fracciones Nitrogenadas

En lo que respecta a los índices de proteólisis, observamos que todos los valores de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS) aumentaron a lo largo de la maduración de los quesos (Figura 10). Los quesos de las producciones E y F mostraron mayores ($P < 0,05$) valores de NS con relación al observado en las producciones G, H e I, que fueron similares.

La hidrólisis de las caseínas origina péptidos grandes (insolubles en agua) y medianos (solubles en agua) que son posteriormente degradados a pequeños péptidos y aminoácidos libres por las proteasas y peptidasas microbianas (McSweeney y Sousa, 2000). Las enzimas coagulantes residuales, y en mayor medida la plasmina, son los principales agentes proteolíticos responsables de la hidrólisis inicial de la caseína en la mayoría de las variedades de queso, dando lugar a los péptidos que se encuentran formando el NS (Fox et al., 1993).

La plasmina es la principal enzima proteolítica de la leche y muestra sobre las caseínas una actividad óptima a pH alcalino ($\sim 7,5$) (Fox et al., 1993). Como se ha mencionado anteriormente, los quesos elaborados con los fermentos E y F mostraron los mayores valores de pH al inicio de la maduración (Figura 9). Este pH más elevado pudo haber ocasionado una mayor actividad de la plasmina, que sería responsable de las mayores concentraciones de NS obtenida en estos quesos.

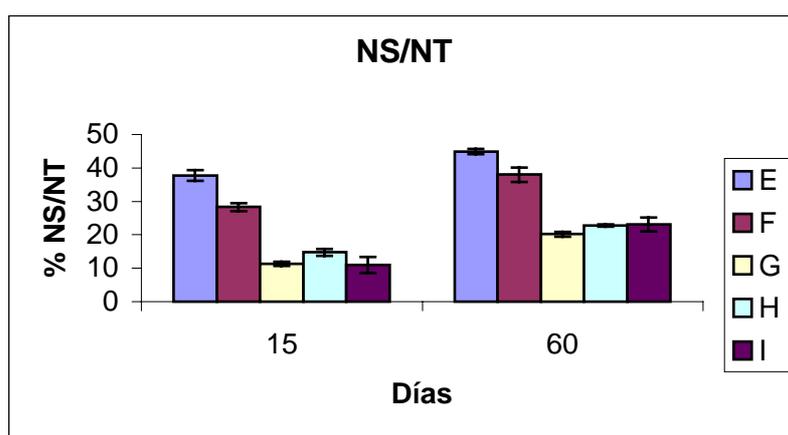


Figura 10 – Evolución del NS/NT de los quesos de leche de vaca (serie P2) elaborados con fermentos lácticos autóctonos.

La Figura 11 muestra la concentración de AA de los quesos elaborados con fermentos lácticos autóctonos en Planta Piloto. De igual forma a lo observado en la

concentración de NS, las producciones E y F presentaron los mayores ($P < 0,05$) contenidos de AA durante la maduración.

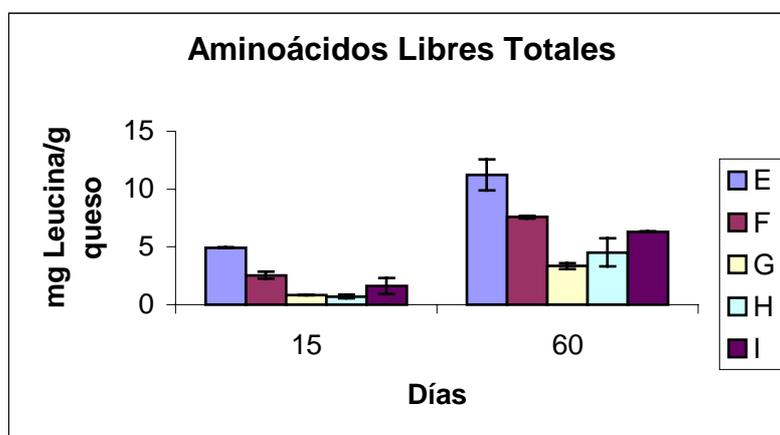


Figura 11– Evolución del contenido de los aminoácidos libres totales de los quesos de leche de vaca (serie P2) elaborados con fermentos lácticos autóctonos.

Los fermentos E y G incluyeron la misma cepa proteolítica (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* n° 18) y lipolítica (*Lb. curvatus* n° 39), diferenciándose solamente en la cepa acidificante (*Lc. lactis* subsp. *lactis* n° 95 y 94, respectivamente). Sin embargo, los niveles de AA de los quesos elaborados con el fermento E fueron mucho mayores ($P < 0,05$) a los encontrados en los quesos manufacturados con el fermento G. Esta diferencia puede atribuirse a algún tipo de asociación entre el *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* n° 95 y la cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* spp. n° 18 que posiblemente haya potenciado la actividad proteolítica de este lactobacilo.

Hynes et al. (2003 a,b) observaron que la producción de AA en queso tipo Saint-Paulin estaba influida por la combinación entre las cepas del fermento iniciador (*Lc. Lactis* subsp. *lactis* o *Lc lactis* subsp. *cremoris*) y las cepas de lactobacilos adjuntos utilizados. Así, varias cepas de *Lb. casei* y *Lb. plantarum* incrementaron fuertemente la concentración de AA cuando fueron utilizadas en combinación con una cepa de *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, en comparación a la combinación con una cepa de *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Según los autores estos resultados podrían ser explicados por la mayor actividad peptidasa de los *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, que podría proveer de más sustratos (péptidos) a las enzimas de los lactobacilos. De esta forma, la mayor concentración de NS mostrado por los quesos elaborados con fermento E y F (Figura 10), que evidencia una mayor concentración de sustratos (péptidos) para los lactobacilos, podría haber provocado el incremento de los valores de AA, durante la maduración.

Por otra parte, algunos autores (Litopoulou-Tzanetaki et al. 1993; Menéndez et al. 2001) han sugerido que valores bajos de pH podrían inhibir las actividades aminopeptidasa de algunos microorganismos y, por consiguiente la hidrólisis de los péptidos durante la maduración de los quesos. Es posible pues, que el menor pH de los quesos de las producciones G, H e I, haya reprimido en cierta forma la acción de las peptidasas y aminopeptidasas microbianas, en comparación a los quesos de las producciones E y F.

Es por tanto difícil obtener una conclusión general sobre las diferencias en los valores de AA encontrados, puesto que pudo deberse al efecto del pH sobre las enzimas microbianas o a las diferencias en la concentración de péptidos disponibles para la hidrólisis microbiana. Sin embargo, estos resultados resaltan la importancia de la asociación entre cepas, fenómeno que posiblemente haya potenciado la actividad proteolítica del fermento.

4.2.1.2.3- Análisis sensorial

La evaluación sensorial de los quesos experimentales P2 elaborados con los diferentes fermentos lácticos autóctonos se muestra en la Tabla 19. Durante el análisis sensorial los quesos elaborados con fermento E y F presentaron mayores puntuaciones en los atributos de intensidad de olor y sabor. Lamentablemente, estos quesos mostraron también una serie de defectos, tales como regustos amargos y sabores extraños, que influyeron negativamente en su valoración global (Tabla 19).

En ciertas ocasiones se ha observado un aumento en la intensidad del aroma y sabor en diferentes variedades de queso elaborados con cepas de lactobacilos como fermento adjunto (Lee et al., 1990; Requena et al., 1992; Lynch et al., 1997, 1999). Algunos autores (González del Llano et al., 1991; McSweeney et al., 1993; McSweeney y Sousa, 2000) han relacionado estas modificaciones con la acumulación de aminoácidos libres en el queso, como consecuencia de la actividad de las peptidasas de los lactobacilos. Presumiblemente, un aumento general en los aminoácidos libres actuaría como potenciadores y/o precursores del flavor. Sin embargo, los aromas y sabores detectados durante el análisis sensorial no son en ocasiones típicos de la variedad de queso estudiado (Lee et al., 1990; McSweeney et al., 1993; Lynch et al., 1997).

Como se puede observar en las Figuras 10 y 11, los quesos elaborados con los fermentos E y F fueron los más proteolizados. Así, la excesiva proteólisis de los quesos elaborados con los fermentos E y F pudo haber incrementado la intensidad del olor y aroma, generando a la vez una serie de sabores anormales y excesivo amargor, que disminuyeron su aceptación por el panel de catadores.

Tabla 19 – Análisis sensorial de los quesos de leche de vaca (serie P2) elaborados con fermentos lácticos autóctonos.

TIPO FERMENTO	OLOR	SABOR			VALORACIÓN GLOBAL
		Intensidad	Calidad	Regusto	
E	8	9	1,2	5,2	0,8
F	6	9	1	7,5	1,5
G	6,29	7,43	5,71	4,43	5,43
H	6,29	5,43	5,14	2,57	5,14
I	6,29	7,14	5,43	5,14	6,29

Panel de 7 catadores al final de la maduración

En general, no se observaron diferencias significativas en los atributos sensoriales de olor, sabor y valoración global entre los quesos elaborados con los fermentos G, H e I. Sin embargo, la intensidad del sabor de los quesos fabricados con el fermento H (sin cepa lipolítica de lactobacilo) fue menor que los quesos manufacturados con los fermentos G y I, por lo que consideramos necesario su empleo en las siguientes producciones.

4.2.2- PRODUCCIONES DE QUESOS EN FORMATGERIA GRANJA RINYA

4.2.2.1- Composición

Basándonos en las dos series de producciones de queso (P1 y P2) realizados en el experimento anterior, se escogieron las cepas acidificantes (*Lc. lactis* subsp. *lactis*) n° 94 y 83, proteolítica (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei*) n° 18 y la lipolítica (*Lb. curvatus*) n° 39 para el tercer experimento (P3). La combinación acidificante (94) + lipolítica (39) + proteolítica (18) fue utilizada en la producción P2.G del experimento anterior, mientras que la cepa 83 fue utilizada como acidificante en la producción P2.H.

De esta forma se realizaron dos producciones de quesos experimentales (P3) más una producción con fermento comercial como control en Formatgeria Granja

Rinya (Valencia). Todas las producciones fueron elaboradas por duplicado con leche cruda de oveja Guirra. Teniendo en cuenta la fragilidad de los *Lactococcus* spp. al ataque de los bacteriófagos seleccionamos para este experimento dos cepas de este género. Los fermentos lácticos autóctonos utilizados tuvieron la siguiente composición:

P3.J = Acidificante (94) + Lipolítica (39) + Proteolítica 2 (18)

P3.L = Acidificante (83) + Lipolítica (39) + Proteolítica 2 (18)

P3.M = Fermento Comercial (Control).

La Figura 12 muestra la evolución del pH de los quesos de leche de oveja Guirra elaborados con fermentos lácticos autóctonos. Los fermentos J y L mostraron similar capacidad de acidificación con relación al fermento comercial (M), descendiendo el pH de los quesos hasta valores próximos a 5. Estos resultados de pH concuerdan con los observados en muchos otros quesos de oveja de características similares (Marcos et al., 1985; Núñez et al., 1989; Pavia et al., 1999).

Tras 15-30 días de maduración los valores de pH de todos los quesos descendieron a valores mínimos y similares en todas las producciones. Al final de maduración el pH de los quesos se recuperó, alcanzando mayores valores en la producción M (control).

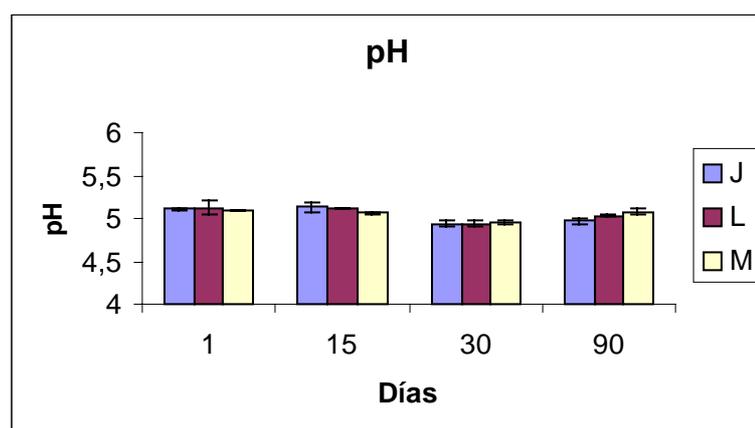


Figura 12 – Evolución del pH de los quesos de leche de oveja Guirra elaborados con fermentos lácticos autóctonos

La Tabla 20 muestra la composición de los quesos de leche de oveja Guirra elaborados con fermentos lácticos autóctonos en Formatgeria Granja Rinya. Los valores de ES fueron similares en las tres producciones de quesos ($P > 0,05$), no observándose diferencias significativas entre ellos durante la maduración. Tampoco se observaron

diferencias significativas entre los valores de proteínas en ES de los quesos ($34,3\% \pm 0,6$) y grasa en ES ($55,71\% \pm 0,84$) durante la maduración. La concentración de S/H fue similar ($P > 0,05$) en todos los quesos (Tabla 20) durante toda la maduración. Todos los valores de composición pueden considerarse normales para un queso de oveja madurado (Marcos et al., 1985; Núñez et al., 1989).

Tabla 20 – Valores medios ($n = 2$) de composición de los quesos de leche de oveja Guirra

DETERMINACIONES	DÍA	PRODUCCIONES Y FERMENTO		
		J	L	M
ES (%)	1	$56,37^a \pm 0,75$	$57,13^a \pm 0,78$	$56,73^a \pm 0,09$
	15	$60,92^a \pm 1,70$	$60,08^a \pm 2,37$	$58,86^a \pm 0,05$
	30	$64,71^a \pm 0,99$	$63,52^a \pm 0,16$	$62,98^a \pm 0,16$
	90	$73,92^a \pm 0,64$	$73,21^a \pm 0,68$	$72,81^a \pm 0,12$
S/H (%)	1	$1,28^a \pm 0,43$	$1,34^a \pm 0,40$	$1,41^a \pm 0,02$
	15	$2,26^b \pm 0,24$	$1,94^b \pm 0,10$	$2,94^a \pm 0,02$
	30	$2,92^a \pm 0,37$	$2,45^a \pm 0,01$	$3,33^a \pm 0,04$
	90	$5,62^a \pm 0,20$	$5,08^a \pm 0,13$	$5,55^a \pm 0,03$

Fermentos: J = 94+39+18; L = 83+39+18; M = Comercial

ES = extracto seco; S/H: sal en humedad

^{a,b,c} Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

4.2.2.- Fracciones Nitrogenadas

La Figura 13 muestra la evolución de NS a pH 4,6 de los quesos de leche de oveja Guirra elaborados con fermentos lácticos autóctonos J y L y el queso control (M) elaborado con fermento comercial. Estos valores aumentaron continuamente desde aproximadamente $11,5\% \pm 0,96$ hasta $27,4\% \pm 0,45$ de NT tras 90 días de maduración, no encontrándose diferencias entre los quesos. Nuestros resultados concuerdan con los encontrados por Núñez et al. (1976) y Marcos et al. (1976) en queso Manchego curado elaborados con leche cruda, aproximadamente 26,4-31,4% tras 90 días de maduración.

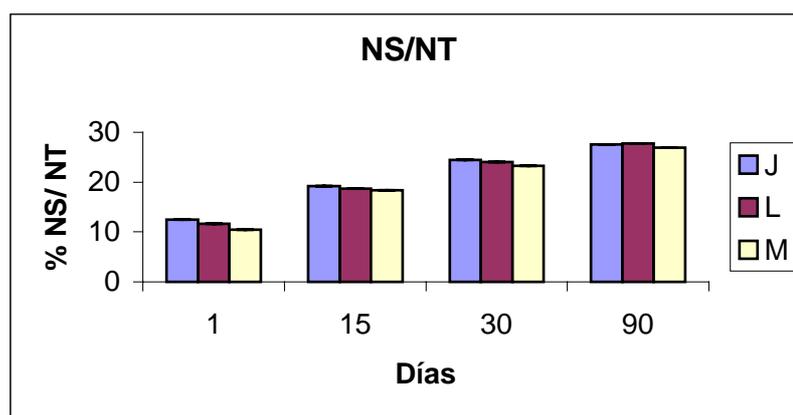


Figura 13 – Evolución de NS/NT de los quesos de leche de oveja Guirra elaborados con fermentos lácticos autóctonos.

Al inicio de la maduración no se encontraron diferencias entre las concentraciones de AA de los quesos (Figura 14), que aumentaron con la maduración. Al cabo de 90 días los quesos que contuvieron una cepa proteolítica de lactobacilo (fermentos J y L: *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*) mostraron niveles mucho mayores de AA en comparación a aquellos elaborados con fermento comercial (sin lactobacilo proteolítico añadido).

Varios autores han mostrado que, de igual forma a lo observado en el presente trabajo, los cultivos adjuntos de lactobacilos tienen la capacidad de aumentar la concentración de aminoácidos libres en quesos Cheddar (Lane y Fox, 1996; Lynch et al., 1997, 1999), Tetilla (Menéndez et al., 2004), Arzúa-Ulloa (Menéndez et al. 1999), Sant-Paulin (Hynes et al., 2003), etc, resaltando la importante contribución de las peptidasas de los lactobacilos en la liberación de AA.

La concentración de AA de los quesos elaborados con los fermentos J y L mostró una evolución similar durante toda la maduración, no encontrándose diferencias significativas en las concentraciones de AA de ambos quesos. Estos resultados indican que la capacidad proteolítica del fermento no fue afectada por las diferentes cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* utilizadas.

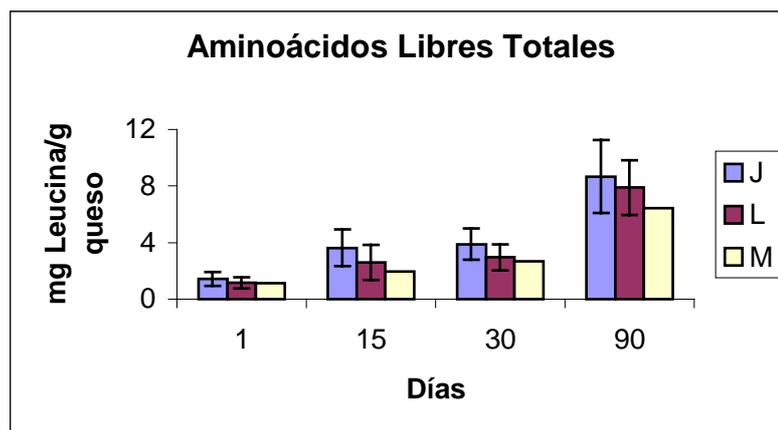


Figura 14 – Evolución del contenido de los aminoácidos libres totales de los quesos de leche de oveja Guirra elaborados con fermentos lácticos autóctonos.

4.2.2.3- Análisis Sensorial

El análisis sensorial realizado mostró que los catadores no percibieron diferencias significativas entre los quesos. Los sabores fueron intensos y de buena calidad y no presentaron regustos amargos ni picantes. Todos los quesos elaborados recibieron una valoración global buena.

Por tanto las combinaciones de las cepas lácticas seleccionadas, J = Acidificante (94) + Lipolítica (39) + Proteolítica 2 (18) y L = Acidificante (83) + Lipolítica (39) + Proteolítica 2 (18), demostraron poseer buenas características tecnológicas y sensoriales para la elaboración de quesos curado de oveja.

5- CONCLUSIONES

- 1- Aproximadamente el 30% de las cepas lácticas aisladas a partir de leche de oveja Guirra coagulan totalmente el medio de cultivo Litmus Milk en el primer día de incubación. En general las cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* muestran las mayores capacidades acidificantes, mientras que la mayoría de los lactobacilos y leuconostoc son débiles productores de ácido. Sin embargo, existe una gran variación en la capacidad de producción de ácido entre los microorganismos lácticos, indicando que esta habilidad depende de cada cepa.

- 2- En las primeras horas de incubación de la leche se observan diferencias en la capacidad de acidificación de los *Lc. lactis* subsp. *lactis* seleccionados, pero al cabo de 24 h todas las cepas exhiben un comportamiento similar, disminuyendo el pH a valores menores de 5. Esta gran capacidad de acidificación posibilitaría el uso de estas cepas como fermentos lácticos. Contrariamente a lo observado con las cepas de lactococos, los lactobacilos muestran mayores diferencias en sus capacidades acidificantes, aunque la mayoría de las cepas también acidificaron la leche hasta valores de pH menores de 5 tras 24 h de incubación.

- 3- Ninguna de las cepas lácticas testadas provocan una digestión importante del medio Litmus Milk, aunque en algunos casos se observan indicios de caseólisis. La determinación cuantitativa de la actividad proteolítica muestra que la mayoría de las cepas testadas presentan poca o nula capacidad de degradación proteica. Sólo cuatro cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, una de *Lb. plantarum* y una de *Lb. pentosus* exhiben gran capacidad caseolítica. Todos los lactobacilos con buena capacidad proteolítica encontrados en este estudio se pueden incluir en el grupo de cepas que coagulan totalmente el Litmus Milk el primer día de incubación. Por tanto,

el interés tecnológico de estas cepas es doble, ya que presentan características acidificantes y proteolíticas.

- 4- Las cepas lácticas autóctonas aisladas a partir de leche cruda de oveja Guirra muestran muy baja actividad lipolítica; solamente la cepa nº 39 (*Lb. curvatus*) presenta el halo de lipólisis característico en Agar Nata. De forma similar, la capacidad de producción de gas de las cepas es muy limitada, ya que sólo la cepa nº 46 (*Lb. salivarius*) produjo gas.
- 5- Respecto a la composición general de la primera serie de quesos (P1), los fermentos A, B y C, elaborados con una cepa de lactobacilo añadida, muestran una gran capacidad de acidificación, mientras que los quesos elaborados con el fermento D, compuesto sólo por una cepa acidificante y otra lipolítica, el descenso de pH es menor. Este hecho destaca el efecto sinérgico existente entre los microorganismos del fermento en la capacidad de acidificación. Los quesos elaborados con el fermento D presentan también una mayor humedad, hecho posiblemente relacionado con su mayor pH.
- 6- En cuanto a la proteólisis secundaria de la primera serie de quesos, se observan mayores contenidos de NS y AA en aquellos quesos elaborados con los fermentos A, B y C. Las diferencias en NS podrían explicarse por la mayor actividad de enzimas coagulantes, debido al menor pH en las primeras etapas de maduración. Aunque las cepas nº 18 (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei*) y nº 4 (*Lb. plantarum*) presentan similar actividad proteolítica en leche, tal vez por efecto de asociación entre cepas, la disminución de la humedad y/o la adición de sal, la concentración de AA en los quesos elaborados con la cepa nº 18 es mayor que la observada en aquellos quesos que contuvieron las cepas nº 65 y 4. Este hecho destaca también la importancia de la asociación e interacción de las diferentes cepas del fermento en el resultado final global.
- 7- La evaluación sensorial de los quesos elaborados con los fermentos A, B y C dio a conocer la presencia de sabores ácidos, amargos y ausencia de sabor típico, lo que podría estar relacionado con la rápida producción de ácido láctico por los microorganismos del fermento. La rápida acidificación obtenida en estos quesos pudo

ser excesiva, afectando el normal desarrollo de la proteólisis o de un flavor equilibrado. Por otro lado, los quesos elaborados con el fermento D presentan sabores rancios, debido posiblemente a la alta concentración de la cepa lipolítica.

8- Respecto a la composición general de la segunda serie de quesos (P2E, F, G, H e I), se observa que los valores de pH de los quesos concuerda con la capacidad acidificante del lactococo utilizado en el fermento (E y $F < G, H$ e I), no encontrándose otras diferencias en los valores de composición.

9- Los quesos elaborados con los fermentos E y F presentan los índices más elevados de proteólisis (NS y AA). El mayor pH de estos quesos pudo causar un incremento en la actividad de las enzimas nativas (P. e. plasmina), explicando los mayores valores de NS. Las diferencias en los valores de AA pudieron deberse al efecto del pH sobre las enzimas microbianas o al mayor contenido de péptidos. Hay que destacar también que aunque los fermentos E y G poseen la misma cepa proteolítica, presentan diferentes concentraciones de AA. Este resultado puede explicarse por la existencia de algún tipo de asociación entre el lactococo acidificante y el lactobacilo proteolítico, potenciando la actividad proteolítica del fermento.

10- En general, no se observan diferencias en los atributos sensoriales de olor, sabor y valoración global entre los quesos elaborados con los fermentos G, H e I. Sin embargo, la intensidad del sabor de los quesos fabricados sin cepa lipolítica es menor, por lo que se consideró necesario su empleo en las siguientes producciones. La excesiva proteólisis en los quesos E y F pudo incrementar la intensidad del olor y sabor, generando a la vez una serie de sabores anormales y excesivo amargor, que hizo disminuir su aceptación por el panel de catadores.

11- Respecto a la tercera serie de quesos (P3J, L y M), no se observan diferencias en la composición general y en el NS, siendo todos éstos valores normales para un queso de oveja madurado. Sin embargo, los quesos J y L, que contienen una cepa proteolítica de *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, exhiben al cabo de 90 días mayores niveles de AA en comparación a aquellos elaborados con el fermento comercial.

12- El análisis sensorial no muestra diferencias significativas entre los quesos del tercer experimento. Los sabores fueron intensos y de buena calidad, sin regustos amargos ni picantes. Todos los quesos presentan una valoración global buena. Por tanto las combinaciones de las cepas lácticas seleccionadas, J = Acidificante (94) + Lipolítica (39) + Proteolítica 2 (18) y L = Acidificante (83) + Lipolítica (39) + Proteolítica 2 (18), poseen buenas características tecnológicas y sensoriales para elaboración de quesos curado de oveja.

13- La selección de cepas lácticas autóctonas y su utilización para la elaboración de quesos permiten la obtención de productos al menos similares, en cuanto a características organolépticas, a los obtenidos con fermento industrial; por lo que se abre una vía para futuros estudios que nos permitan avanzar en la línea de la obtención de quesos más personalizados.

6- BIBLIOGRAFÍA

- 1- ALAIS, CH. (1985). Ciencias de la leche. Ed. Reverté, Barcelona, España.
- 2- ALICHANIDIS, E. y POLYCHRONIADOU, A. (1996). Special features of dairy products from ewe and goat milk, physicochemical and organoleptic point of view. En: IDF; Production and utilization of ewe and goat milk. Ed. International Dairy Federation (IDF), Bruselas, Bélgica, 21-43.
- 3- ALONSO-CALLEJA, C., CARBALLO, J., CAPITA, R., BERNARDO, A. y GARCÍA-LÓPEZ, M.L. (2002). Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from goat's milk and Valdeteja cheese. Letters in Applied Microbiology, 34, 134-138.
- 4- AMARIGLIO, S. (1986). Contrôle de la qualité des produits laitiers: Analyses physiques et chimiques, méthode II-3. AFNOR-ITSV, France, 123-124.
- 5- ANIFANTAKIS, E.M. (1986). Comparison of the physico-chemical properties of ewes' and cows' milk. International Dairy Federation, Boletín N° 202, 42-53, Bruselas, Bélgica.
- 6- ANTONSSON, BY M., ARDÖ, Y., NILSSON, B.F. y MOLIN, G. (2002). Screening and selection of *Lactobacillus* strains for use as adjunct cultures in production of semi-hard cheese. Journal of Dairy Research, 69, 457-472.
- 7- ARDÖ, Y. y POLYCHRONIADOU, A. (1998). Laboratory Manual for Chemical Analysis of Cheese. Ed. European Comisión, Bruselas, Bélgica.
- 8- ARDÖ, Y. (1999). Evaluating proteolysis by analysing the N content of cheese fractions. En: IDF; Chemical Methods for Evaluating Proteolysis in Cheese Maturation. Parte 2. Ed. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica, 4-9.
- 9- ARIZCUN, C., BARCINA, Y. y TORRE, P. (1997). Identification of lactic acid bacteria isolated from Roncal and Idiazábal cheeses. Lait, 77, 729-736.

- 10- ASSENAT, L. (1991). La leche de oveja. En: F.M. Luquet; Leche y Productos Lácteos. Ed. Acirbia S. A., Zaragoza, España, Vol.1, 277-311.
- 11- ASTON, J.W., DURWARD, J.G. y DULLEY, J.R. (1983). Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. The Australian Journal of Dairy Technology, 38, 55-59.
- 12- ATANASSOVA, M.R., CHIPEVA, V., IVANOVA, I. y HAERTLE, T. (2001). Determination of the growth stages of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* M3 from Bulgarian yellow cheese by electroconductivity. Journal of Microbiological Methods, 46, 227-233.
- 13- AXELSSON, L.T. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Salminen, S., von Wright A; Lactic acid bacteria. Ed. Marcel Dekker, New York, EEUU.
- 14- BACHMANN, H.P., BANKS, J., BERESFORD, T., BÜTIKOFER, U., GRAPPIN, R., LAVANCHY, P., LINDBLAD, O., McNULTY, D., McSWEENEY, P.L.H., y SKEIE, S. (1998). Interlaboratory comparison of cheese making trials: Model cheeses made from raw, pasteurised and microfiltered milks. Lebensmittel Wissenschaft and Technologie, 31, 585-593.
- 15- BARRETO, M., MELO, E., ALMEIDA, J., XAVIER, A. y CARRONDO, M. (1991). A kinetic method for calculating the viability of lactic starter cultures. Applied Microbiology Biotechnology, 34, 648.
- 16- BARTELS, H.J., JOHNSON, M.E. y OLSON, N.F. (1987). Accelerated ripening of Gouda cheese. 1. Effect of heat-shocked thermophilic lactobacilli and streptococci on proteolysis and flavour development. Milchwissenschaft, 42, 83-88.
- 17- BENKERROUM, N, MISBAH, M., SANDINE, W. y ELARAKI, A. (1993). Development and use of selective medium for isolation of *Leuconostoc* sp. from vegetables and dairy products. Applied Environmental Microbiology, 59, 607.
- 18- BEUVIER, E., BERTHAUD, K., CEGARRA, S., DASEN, A., POCHET, S., BUCHIN, S., y DUBOZ, G. (1997). Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. International Dairy Journal, 7, 311-323.
- 19- BOSSET, J.O., y GAUCH, R. (1993). Comparison of the volatile flavour compounds of six European 'AOC' cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method. International Dairy Journal, 3, 359-377.

- 20-BROCK, T.D. (1961). Milestones in Microbiology. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.
- 21-BUCHENHÜSKES, H. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. FEMS Microbiology Rev.i FWS, 12, 253.
- 22-BUFFA, M. (2003). Aplicación de las altas presiones hidrostáticas en la elaboración de queso de cabra. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España.
- 23-BUXADÉ-CARBÓ, C. (1997). Ovino de leche: aspectos claves. Ed. Mundi-Prensa, Barcelona, España.
- 24-CANDIOTI, M.C., HENES, E., QUIBERONI, A., PALMA, S.B., SABBAG, N., y ZALAZAR, C.A. (2002). Reggianito Argentino cheese: influence of *Lactobacillus helveticus* strains from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. Internnational Dairy Journal, 12, 923-931.
- 25-CANUT, E. y NAVARRO, F. (1980). Els formatges a Catalunya. Ed. Alta Fulla, Barcelona, España.
- 26-CANUT, E. y NAVARO F. (1990). Catálogo de Quesos de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ed. Técnicos Editoriales y Consultores, Barcelona, España.
- 27-CANUT, E., NAVARRO, F., SANZ, M., GALLARDO, J.A., GARCÍA NIETO, J.C. y ARENILLAS, A. (1992). Quesos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ed. El País, S.A. y Aguilar, S.A. Madrid, España.
- 28-CARIDI, A. (2003). Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. International Journal of Dairy Technology, 56, 1, 1-6
- 29-CARRASCO, F.L. (1991). El Queso Manchego: Ed. Conserjería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, España.
- 30-CASALTA, E., VASSAL, Y., DESMAZEAUD, M.J. y CASABIANCA, F. (1995). Comparación de l'activité acidificante de souches de *Lactococcus lactis* isolées de lait et de fromage de Corsica. Lebensmittel-Wissenschaft un Technologie 28, 291-299.
- 31-CASLA, D., REQUENA, T., y GÓMEZ, R. (1996). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses:

- characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105, Journal of Applied Bacteriology, 81, 35-41.
- 32- CENTENO, J.A., CEPEDA, A. y RODRÍGUEZ-OTERO, J.L. (1996). Lactic acid bacteria isolated from Arzúa cows' milk cheese. International Dairy Journal, 6, 65-78.
- 33- CHEN, R.F., SCOTT, C. y TREPMAN, E. (1979). Fluorescence properties of o-phthaldialdehyde derivatives of amino acids. Biochemistry Biophysics Acta 576, 440.
- 34- CHICK, J.F., MARCHESSEAU, K. y GRIPON, J.C. (1997). Intracellular esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763: purification and characterization, International Dairy Journal, 169-174.
- 35- CHURCH, F.C., SWAISGOOD, H.E., PORTER, D.H. y CATIGNANI, G.L. (1983). Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. Journal Dairy Science, 66, 1219-1227.
- 36- CHOISY, C. (1990a). Los fermentos lácticos y las bacterias lácticas. En: A. Eck; El queso. Ed. Omega, S.A., Barcelona, España.
- 37- CHOISY, C., DESMAZEAUD, M., GRIPON, J.C., LAMBERET, G., LENOIR, J. y TOURNEUR, C. (1990). Los fenómenos microbiológicos y enzimáticos y la bioquímica del afinado. En: A. Eck; El queso. Ed. Omega, S.A., Barcelona.
- 38- COGAN, T.M. y DALY, C. (1987). Cheese starter culturas. En: P.F Fox; Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. 1. Ed. Elsevier Applied Science, London, Reino Unido, pp. 179-249.
- 39- COGAN, T.M. (1996). History and taxonomy of starter cultures. En: T.M Cogan, J.P. Acholas; Dairy starter cultures. Ed. VCH, New York, EEUU, p 1.
- 40- COGAN, T.M., BARBOSA, M., BEUVIER, E., BIANCHI-SALVADORI, B., COCCONCELLI, P.S., FERNANDEZ, I., GÓMEZ, R., KALANTZOPOULOS, G., LEDDA, A., MEDINA, M., REA, M.C. y RODRÍGUEZ, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. Journal of Dairy Research, 64 (3), 409-421.
- 41- CONN, H.W. (1895). Dairy Bacteriology. Buletin N° 25. Washintgon, DC. US. Department of Agriculture Office of experiment Stations.
- 42- COMPAIRE, F. C. (1976). Queso, tecnología y control de calidad. Ed. Publicaciones de Extensión Agraria, MAP, Madrid, España.

- 43- COPPOLA, S., PARENTE, E., DUMONTET, S., y LA PECCERELLA, A. (1988). The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Lait*, 68, 295-310.
- 44- COTTIER, H. (1991). Producción de leche de oveja. En: F.M. Luquet; *Leche y Productos Lácteos*, Vol.1. Ed. Acribia S. A., Zaragoza, España.
- 45- CREAMER, L.K., LAWRENCE, R.C. y GILLES, J. (1985). Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 20, 185-203.
- 46- DAVE, R.I. y SHAH, N.P. (1996). Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science*, 79, 1529.
- 47- DeMAN, J., ROGOSA, M. y ELIZABETH, M. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130.
- 48- DEMIRCI, Y. y HEMME, D. (1995). Acidification test based on the use of biomass for screening of *Leuconostoc*. Applications to *Leuconostoc mesenteroides* strain isolated from french raw milk cheeses. *Journal of Dairy Research*, 62, 521.
- 49- DESMAZEAUD, M.J. y GRIPON, J.C. (1977). General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 32, 731-734.
- 50- DIFCO LABORATORIOS. (1998). *The Difco Manual*. Ed. Eleventh, Maryland, EEUU.
- 51- DORY, M.A.G., VICENTE, S.M. y PIÑÁN, F.O. (1990). *Guía de campo de las razas autóctonas de España*. Ed. Alianza, Madrid, España.
- 52- DRIESSEN, F.M. (1985). Inactivation of lipases and proteinases (undigenous and bacterial). *Boletín de la IDF* N° 238, 71-93.
- 53- DURLU-OZKAYA, F., XANTHOPOULOS, V., TINAIL, N. y LITOPOULOU-TZANETAKI, E. (2001). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewe's milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 861-870.
- 54- EARLY, R. (1998). *Tecnología de los productos lácteos*. 2ª Edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- 55- ECK, A. (1990). *El queso*. Ed. Omega, Barcelona, España.

- 56- ELLIKER, P. ANDERSON, A. y HANNESSON, G. (1956). An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *Journal of Dairy Science*, 39, 1611.
- 57- EL-SODA, M., EL-WAHAB, H.A., EZZAT, N., DESMAZEAUD, M.J., e ISMAIL, A. (1986). The esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli. II. Detection of esterase system of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus acidophilus*, *Lait*, 66, 431-443.
- 58- ELORTONDO, F.J.P., ECHOBARRIA, P.A., ALBISU, M. y BARCINA, Y. (1998). Indigenous lactic acid bacteria in Idiazábal ewe's milk cheese. *International Dairy Journal*, 8, 725-732.
- 59- ESTEPAR, J., Del MAR SÁNCHEZ, M., ALONSO, L. y MAYO, B. (1999). Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Peñamellera' cheese: análisis of its indigenous lactic bacteria. *International Dairy Journal* 9, 737-746.
- 60- FARKYE, N.Y. y FOX, P.F. (1990). Objective indices of cheese ripening. Review. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 37-40.
- 61- FERNÁNDEZ, N., REQUENA, R., BELTRÁN, M.C., PERIS, C., RODRÍGUEZ, M., MOLINA, P. y TORRES, A. (1997). Comparison of different machine clusters on dairy ewes with large size teats. *Annual. Zootechnical*. 46, 207-218.
- 62- FERNÁNDEZ,-GARCÍA, E., CARBONELL, M., y NÚÑEZ, M. (2002). Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese. 1. Comparison raw and pasteurised milk cheese. *Journal of Dairy Research*, 69, 579-593.
- 63- FERNÁNDEZ DEL POZO, BY B., GAYA, P., MEDINA, M., RODRÍGUEZ-MARÍN y NUÑEZ, M. (1988). Changes in the microflora of La Serena ewe's milk cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 55, 449-455.
- 64- FLEICHMANN, W. (1924). *Tratado de Lechería*. Ed. Gustavo Gili, S.A, Madrid, España.
- 65- FOLKERTSMA, BY B. y FOX, P.F. (1992). Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 59, 217-224.

- 66-FORTINA, M.G., NICASTRO, G., CARMINATI, D., NEVIANI, E. y MANACHINI, P.L. (1998). *Lactobacillus helveticus* in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 72-80.
- 67-FOX, P.F. (1988). Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 10, 522-535.
- 68-FOX, P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72, 1379-1400.
- 69-FOX, P.F. (1989a). Primary proteolysis of cheese proteins during. A review. *Journal of Dairy Science*, 68, 531-540.
- 70-FOX, P.F., LUCEY, J.A. y COGAN, T.M. (1990). Glicolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Food Science and Nutrition*, 29 (4), 237-253.
- 71-FOX, P.F. y LAW, J. (1991). Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnology*, 5, 239-262.
- 72-FOX, P.F., LAW, J., MCSWEENEY, P.L.H. and WALLACE, J.M. (1993). Biochemistry of cheese ripening. En P.F. Fox; *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Ed. Chapman & Hall, London, Reino Unido.
- 73-FOX, P.F. (1993). Cheese: an overview. En P.F. Fox; *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1. Ed. Chapman & Hall, London, Reino Unido.
- 74-FOX, P.F. y STEPANIAK, L. (1993). Enzymes in cheese technology. *International Dairy Journal*, 4, 509-530.
- 75-FOX, P.F., WALLACE, J.M. (1997a). Formation of flavour compounds. *Applied Microbiology*, 45, 17-85.
- 76-FOX, P.F., GUINEE, T.P., COGAN, T.M. y MCSWEENEY, P.L.H. (2000). *Fundamentals of cheese science*, An Aspen Publication, USA
- 77-FREITAS, A.C., PINTADO, A.E., PINTADO, M.E. y MALCATA, F.X. (1999). Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and lipolysis. *International Dairy Journal*, 9, 593-603.
- 78-FUERTE, J.A., GONZALO, C., CARREIDO, J.A. y SAN PRIMITIVO, F. (1998). Parameters of test day milk yield and milk components for dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 81, 1300-1307.

- 79- GABIÑA, D., ARRESE, F., ARRANZ, J. y BELTRÁN DE HEREDIA, I. (1993). Average milk yields and enviromental effcts on Latxa sheep. *Journal of Dairy Science*, 76, 1191-1198.
- 80- GARCÍA, F.C.F., SÁNCHEZ, J.M.S. y ABASCAL, C.G. (2000). *Manual de etnología animal: Razas de rumiantes*. Ed. Librero, Murcia, España.
- 81- GARVIE, E.I. (1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *Methods in Microbiology*, 16, 148-177.
- 82- GAYA, P., MEDINA, M., RODRÍGUEZ-MARTÍN, M.A., y NÚÑEZ, M. (1990). Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: The effect of elevated ripening temperatures. *Journal of Dairy Science*, 73, 26-32.
- 83- GENERALITAT VALENCIANA, CONSELLERIA D'AGRICULTURA I MIG AMBIENT, (1997). *Formatges tradicionals. Promoción a la calidad*, 2ª Edición.
- 84- GERVILLA, R. (2001). *Estudio de los tratamientos por alta presión hidrostática en la leche de oveja*. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España.
- 85- GILLES, J. (1976). Control of salt in moisture levels in Cheddar cheese. *New Zealand Journal Dairy Science Technology*, 11, 219-221.
- 86- GINZINGER, W., JAROS, D., MAYER, H.K, ROHM, H., y TSCHAGER, E. (1999a). Raw milk flora affects composition and quality of Bergkäse. II. Physical and sensory properties, and conclusions. *Lait*, 79, 397-410.
- 87- GINZINGER, W., JAROS, D., LAVANCHY, P. y ROHM, H. (1999). Raw milk flora affects composition and quality of Bergkäse. III. Physical and sensory properties, and conclusions. *Lait*, 79, 411-421.
- 88- GOBBETTI, M., FOX, P.F., y STEPANIAK, L. (1996). Esterolytic and lipolytic activities of mesophilic and thermophilic lactobacilli. *Italian Journal of Food Science*, 8, 127-135.
- 89- GÓMEZ-RUÍZ, J.A., BALLESTEROS, C., GONZÁLEZ-VIÑAS, M.A., CABEZAS, L., y MARTÍNEZ-CASTRO, I. (2002). Relationships between volatile compounds and odour in Manchego cheese: comparison between artisanal and industrial cheeses at different ripening times. *Lait*, 82, 613-628.
- 90- GÓMEZ, M.J., RODRÍGUEZ, E., GAYA, P., NUÑEZ, M. y MEDINA, M. (1999). Characteristics of Manchego cheese manufactured from raw and

- pasteurized ovine milk and with defined-strain or commercial mixed-strain starter cultures. *Journal Dairy Science*, 82, 2300-2307.
- 91- GONZÁLEZ-CRESPO y MAS M. (1993). Estudio del empleo de fermentos iniciadores autóctonos en la elaboración de queso de cabra de pasta prensada, con leche pasterizada. *Alimentaria*, 6, 51-53.
- 92- GONZÁLEZ, J., MAS, M., TABLA, R., MORICHE, J., ROA, I., REBOLLO, J.E. y CÁCERES, P. (2003). Autochthonous starter effect on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of Ibores goat's milk cheeses. *Lait*, 83, 193–202.
- 93- GONZÁLEZ DEL LLANO, D., POLO, MC., y RAMOS, M. (1995). Study of proteolysis in artisanal cheeses. High performance liquid chromatography of peptides. *Journal of Dairy Science*, 78, 1018-1024.
- 94- GRAPPIN, R.; RANK, T.C.; OLSON, N.F. (1985). Primary proteolysis of cheese proteins during ripening: a review. *Journal Dairy Science*, 68, 531-540.
- 95- GRIPON, J. C. (1993). Mould-ripening cheeses. En: P.F. Fox; *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Ed. Chapman and Hall Publishers; London, Reino Unido.
- 96- HAENLEIN, G.F.W. (1996). Nutritional value of dairy products of ewe and goat milk. En: IDF; *Production and utilization of ewe and goat milk*. Ed. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.
- 97- HARRIGAN, W.F. y McCANCE, M.E. (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Ed. Academic Press, London, Reino Unido.
- 98- HASSAN, A.N. y FRANK, J.F. (2001). Starter cultures and their use. En H.E. Marth y L. Steele; *Applied dairy microbiology*. Second edition. Revised and expanded. Ed. Marcel Dekker, INC, New York, EEUU.
- 99- HERREROS, M.A., FRESNO, J.M., GONZÁLEZ PRIETO, M.J. y TORNADIJO, M.E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *International Dairy Journal*, 13, 469-479.
- 100- HOLLAND, R., COOLBEAR, T. (1996). Purification of tributyrin esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* E8. *Journal Dairy Research*, 63, 131-140.
- 101- HUGGINS, A.R. y SANDINE, W.E. (1984). Differentiation of fast and slow milk coagulating isolates in strains of lactic streptococci. *Journal Dairy Science*, 67, 1674-1679.

- 102- HULL, R. y ROBERTS, A. (1984). Differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. *Australian Journal Dairy Technology*, 3, 160.
- 103- HYNES, E., BACH, C., LAMBERET, G., OGIER, J.C., SON, O. y DELACROIX-BUCHET, A. (2003a). Contribution of starter lactococci and adjunct lactobacilli to proteolysis, volatile profiles and sensory characteristics of washed-curd cheese. *Lait*, 83, 31-43.
- 104- HYNES, E., OGIER, J.C., SON, O. y DELACROIX-BUCHET, A. (2003b). Influence of starter and adjunct lactobacilli culture on ripening of miniature washed-curd cheeses. *Lait*, 83, 17-29.
- 105- IBRAHIM, SALAM A. (1998). Agglutination Behavior of Mesophilic Starter Cultures as a Function of Proteolysis. *Journal of Food Protection*, 61, 855-858.
- 106- IDF (International Dairy Federation), (1980). Starters in the manufacture of cheese. Document of the International Dairy Federation, Boletín N° 120, Bruselas, Bélgica.
- 107- IDF, (1982). Cheese and processed cheese products. Determination of the total solids content. Ed. International Dairy Federation, Standard 4 A, Bruselas, Bélgica.
- 108- IDF, (1988). Cheese and processed cheese products. Determination of chloride content. Potentiometric titration method. Ed. International Dairy Federation, Standard 88 A, Bruselas, Bélgica.
- 109- IDF, (1991). Chemical methods for evaluation of proteolysis in cheese maduración. Ed. International Dairy Federation, Boletín N° 261, Bruselas, Bélgica.
- 110- IDF, (1991a). Significance of the indigenous antimicrobial agents of milk to the dairy industry. Ed. International Dairy Federation, Boletín N° 264, Bruselas, Bélgica.
- 111- IDF, (1993). Leche, suero y queso: Ed. International Dairy Federation, Standard 20B, Bruselas, Bélgica.
- 112- IDF, (1994). Cheese yield and factors affecting its control. Proceedings of the IDF seminar held in Cork, April 1993. Ed. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.
- 113- IDF, (1995). Guideline determination of acidifying activity of dairy cultures. Ed. International Dairy Federation, Boletín N° 306, 34–36. Bruselas, Bélgica.

- 114- IDF, (1997). Tyrosine method. Ed. International Dairy Federation, Standard 149A, 1997; Bruselas, Bélgica.
- 115- ISO (International Organization for Standardization), (1975). Cheese-Determination of fat content – van Gulic method. Ed. ISO. Standard 3433, ISO, Leusden, Netherlands.
- 116- JARRETT, W.D., ASTON, J.W. y DULLEY, J.R. (1983). A simple method for estimating free amino acids in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 37, 55-58.
- 117- JOHNSON, E.A., NELSON, J.H. y JOHNSON, M. (1990a). Microbial safety of cheese made from heat-treated milk, part I. Executive summary, introduction and history. *Journal of Food Protection*, 53, 441–452.
- 118- JOHNSON, E.A., NELSON, J.H. y JOHNSON, M. (1990b). Microbial safety of cheese made from heat-treated milk, part II. Microbiology. *Journal of Food Protection*, 53, 519–540.
- 119- JOHNSON, E.A., NELSON, J.H. y JOHNSON, M. (1990c). Microbial safety of cheese made from heat-treated milk, part III. Technology, discussion, recommendations, bibliography. *Journal of Food Protection*, 53, 610–623.
- 120- JORDAN, K.N. y COGAN, T.M. (1993). Identification and growth of non-starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 32, 47-55.
- 121- KAABI, M., ÁLVAREZ, M., BOIXO, J.C., ANEL, E., DE LA FUENTE, L.F., DE PAZ, P. y ANEL, L. (2000). Influencia del número de corderos nacidos sobre el nivel de producción lechera en la raza Churra. XXV Jornadas Científicas de la SEOC. pp. 469-471. Teruel, España.
- 122- KAMALY, K.M., TAKAYAMA, K. y MARTH, E.H. (1990). Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, and their mutants. *Journal Dairy Science*, 73, 280-290.
- 123- KANDARAKIS, I.G., MOSCHOPOULOU, E.E., MOATSOU, G.A. y ANIFANTAKIS, E.M. (1998). Effect of starter on gross and microbiological composition and organoleptic characteristics of Graviera Kritis cheese. *Lait*, 78, 557-568.
- 124- KATZ, M., MEDINA, R., GONZÁLEZ, S. y OLIVER, G. (2002). Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk and cheese. *Journal of Food Protection*, 65, 1997-2001.

- 125- KHALID, N.M. y MARTH, E.H. (1990). Lactobacilli – their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese. *Journal of Dairy Science*, 73, 2669–2684.
- 126- KNUDSON, S. (1931). Starters. *Journal Dairy Research*, 2, 137.
- 127- KUCHROO, N.C. y FOX, P.F. (1982). Soluble nitrogen in cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*, 37, 331-334.
- 128- LANA, M.P. y LASARTE, J.M. (1998). Influencia de la raza en la producción y calidad de la leche. XXV Jornadas Científicas de la SEOC. pp. 167-170. Vitoria, España.
- 129- LANE, C.N. y FOX, P.F. (1996). Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 6, 715-728.
- 130- LANZANOVA, M., MUCCHETTI, G. y NEVIANI, E. (1993). Analysis of conductance changes as a growth index of lactic acid bacteria in milk. *Journal Dairy Science*, 76, 20.
- 131- LAW, B.A. y SHARPE, M.E. (1978). Streptococci in the dairy industry. En: F.A. Skinner y L.B. Quesnel; *Streptococci*. Ed. Academic Press, London, Reino Unido.
- 132- LAW, B.A. (1981). Accelerated ripening of Cheddar cheese with microbial proteinases. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 34, 313-317.
- 133- LAW, B.A. (1984). Flavour development in cheese. En: L. Davies y B.A. Law; *Advence in the microbiology and biochemisty of cheese and fermented milk*. Ed. Elsevier Applied Science Publushers, London, Reino Unido.
- 134- LAWERENCE, R.C., GILLES, J. y CREAMER, L.K. (1983). The relationship between cheese texture and flavour. *New Zealand Journal Dairy Science Technology*, 18, 175-190.
- 135- LEE, B.H., LALEYE, L.C., SIMARD, R.E., HOLLEY R.A., EMMONS, D.B. y GIROUX, R.N. (1990a). Influence of homofermentative lactobacilli on physicochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Jounal of Food Science*, 55, 386-390.
- 136- LEE, B.H., LALEYE, L.C., SIMARD, R.E., MUNSCH, M.H. y HOLLEY R.A. (1990b) Influence of homofermentative lactobacilli on the microflora and soluble nitrogen components in Cheddar cheese. *Jounal of Food Science*, 55, 391-397.

- 137- LIM, K., HUH, C., BAEK, Y. y KIM, H. (1995). A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal Dairy Science*, 78, 2108.
- 138- LITOPOULOU-TZANETAKI, E. y TZANETAKIS, N. (1992). Microbiology study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiology*, 9, 13-19.
- 139- LITOPOULOU-TZANETAKI, E., TZANETAKIS, N y VAFPOULOU-MASTROJIANNAKI, A. (1993). Effect of the type of lactic starter on microbiological chemical and sensory characteristics of Feta cheese. *Food Microbiology*, 10, 31-41.
- 140- LUQUET, F.M. (1991). *Leche y productos lácteos. Vaca-Oveja-Cabra Vol. I y II*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- 141- LYNCH, C.M., MCSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F., CONGAN, T.M. y DRINAN, F.D. (1997). Contribution of starter lactococi non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait*, 77, 441-459.
- 142- LYNCH, C.M., MUIR, D.D., BANKS, J.M., MCSWEENEY, P.L.H. y FOX, P.F. (1999). Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar cheese ripening. *Journal Dairy Science*, 82, 1618-1628.
- 143- MAPA (MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN), (2001). *Anuario de estadística agroalimentaria*. Ed. MAPA, Madrid, España.
- 144- MARCOS, A., ESTEBAN, M.A., SALGUERO, J.F.; MORA, M.T. y MILLÁN, R. (1976). *Anales de Bromatología*, 28, 57-68.
- 145- MARCOS, A., SALGUERO, J.F., ESTEBAN, M.A., LEÓN, F., ALCALÁ, M. y HEREDIA, F.H.B. (1985). *Quesos de españoles: Tablas de composición, valor nutritivo y estabilidad*. Ed. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba, España.
- 146- MAS, M. y GONZÁLEZ-CRESPO, J. (1992). Bacterias lácticas en el queso de los Ibores. *Alimentaria*, 28, 41-43.
- 147- MARTH, H.E. y STEELE, L. (2001). *Applied dairy microbiology*. Second edition. Ed. Marcel Dekker, INC. New York, EEUU.
- 148- MATALAN, M. y SADINE, W. (1986). Improved media for differentiation of rods and cocci in yogurt. *Journal Dairy Science*, 69, 2569.

- 149- MAYEUX, J.V., SANDINE, W.E. y ELLIKER, P.R. (1962). A selective medium for detecting leuconostoc organisms in mixed strain starter cultures. *Jouenal Dairy Science*, 45, 655-656.
- 150- MAYO, B., HARDISSON, C., y BRAÑA, A.F. (1990). Characterization of wild strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Cabrales cheese. *Journal of Dairy Research*, 57, 125-134.
- 151- MÄYRÄ-MÄKINEN, A. y BIGRET, M. (1993). Industrial use and production of lactic bacteria. En: S. Salminen y A. von Wright; *Lactic acid bacteria*. Ed. Marcel Dekker, New York, EEUU.
- 152- McDONALD, L., MC FEETERS, R., DAESCHEL, M. y FLEMING, H. (1987). A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 53, 1382.
- 153- MCSWEENEY, P.L.H. & FOX, P.F., LUCEY, J.A., JORDAN, K.N., y COGAN, T.M. (1993). Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 3, 613-634.
- 154- MCSWEENEY, P.L.H. y SOUSA, M.J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 80, 293-324.
- 155- MENÉNDEZ, S., CENTENO, J.A., GODÍNEZ, R. y RODRÍGUEZ OTERO, J.L. (1998). Propiedades tecnológicas y actividades enzimáticas de cepas de *Lactococcus lactis* aisladas del queso Arzúa-Ulloa. *Alimentaria*, 296, 59-64.
- 156- MENÉNDEZ, S., CENTENO, J.A., GODINEZ, R. y RODRÍGUEZ OTERO, J.L. (1999a). Caracterización de cepas de lactobacilos aisladas del queso Arzúa-Ulloa. *Alimentaria*, 1, 51-56.
- 157- MENÉNDEZ, S., GODÍNEZ, R., CENTENO, J.A., y RODRÍGUEZ OTERO, J.L. (1999). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Tetilla cows' milk cheese. *Alimentaria*, 77-83.
- 158- MENÉNDEZ, S., GODINEZ, R., RODRÍGUEZ OTERO, J.L.; CENTENO, J.A. y HERMIDA, M. (2001). Efectos de la inclusión de cepas autóctonas de *Lactobacillus casei* en cultivos iniciadores para queso Arzúa-Ulloa. *Alimentaria*, 11, 89-97.
- 159- MENÉNDEZ, S., GODÍNEZ, R., HERMIDA, M., CENTENO, J.A., y RODRÍGUEZ OTERO, J.L. (2004). Characteristics of "Tetilla" pasteurized

- milk cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. *Food Microbiology*, 21, 97-104.
- 160- MEDINA, BY M., FERNANDEZ DEL POZO, B., RODRÍGUEZ-MARIN, M.A., GAYA, P. y NUÑEZ M. (1991). Effect of lactic starter inoculation on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *Journal of Dairy Science*, 58, 355-361.
- 161- MEDINA, R., KATZ, M., GONZÁLEZ, S. y OLIVER, G. (2001). Characterization of lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from northwest Argentina. *Journal of Food Protection*, 64, 559-563.
- 162- MORGAN, S.M., GALVIN, M., ROSS R.P. y HILL, C. (2001). Evaluation of a spray-dried lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 387-391.
- 163- MORICHI, T., SHARPE, M.E. y REITER, B. (1968). Esterase and other soluble proteins of some lactic acid bacteria, *Journal Genetic by Microbiology*, 53, 405.
- 164- MOSCHETTI, G., BLAIOTTA, G., VILLANI, F. y COPPOLA, S. (2001). Nisin-producing organisms during traditional 'Fior di latte' cheese making monitored by multiplex-PCR and PPGE analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 109-116.
- 165- MUÑOZ, A.A., MUÑOZ, C.E. y TEJON, D.T. (1986). *Catálogo de razas autóctonas Españolas. I- Especies ovinas y caprinas*. Ed. Secretaria General Técnica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España.
- 166- MUÑOZ, M. Y y YOLDI, G. (2000). Leche y derivados. En: I. Astiasarán y J.A. Martínez; *Alimentos: Composición y Propiedades*. Ed. McGraw-Hill Interamericana de España S.A.U., Madrid, España.
- 167- NÚÑEZ, M. y MARTÍNEZ-MORENO, J.L. (1976). Flora microbiana del queso Manchego. I. Evolución de la flora microbiana de quesos Manchegos artesanos. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias*, 4, 11-31, Madrid, España.
- 168- NÚÑEZ, M. (1978). Microflora of Cabrales cheese: changes during maturation. *Journal Dairy Research*, 45, 501-508.
- 169- NÚÑEZ, M., MARTÍNEZ MORENO, J.L. y MEDINA, M. (1981). Testing of *Streptococcus lactis* as starter for manufacture of Manchego-type cheese.

- Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Serie ganadera, 12, 65-72, Madrid, España.
- 170- NUÑEZ, BY M., MEDINA, M y GAYA, P. (1989). Ewes' milk cheese: technology, microbiology and chemistry. Review article. Journal Dairy Research, 56, 303-321.
- 171- OBERG, C.J., WEIMER, B.C., MOYES, L.V., BROWN, R.J. y RICHARDSON, G.H. (1991). Proteolytic Characterization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Strains by the o-Phthaldialdehyde Tes and Amino Acid Analysis. Journal Dairy Science, 74:398-403.
- 172- O'KEEFFE, R.B., FOX, P.F. y DALY, C. (1975). Proteolysis in Cheddar cheese influence of the rate of acid production during manufacture. Journal Dairy Research, 42, 111-122.
- 173- OLASUPO, N.A., SECHILLINGER, U., NARBAD, A., DODDI, H. y HOLZAPFEL, W.H. (1999). Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from wara, a traditional Nigerian product. International Journal of Food Microbiology, 53, 141-152.
- 174- OLIVER, G., SAVOY de GLORI, G. y FONT de VALDEZ, G.M. (1988). Cheese industry development and research in Argentina. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 26, 225-241.
- 175- OLIVARES, J., RUA, B., SUSAETA, I. y ALDAMIZ-ECHEVARRIA, P. (1993). Growth kinetics of several lactic acid bacteria useful as starter for ewe's cheese production. Biotechnology Lett, 15:1071.
- 176- OUMER, B.A., GAYA, P., FERNANDEZ-GARCIA, E., MARCIACA, R., GARDE, S., MEDINA, M. y NUÑEZ, M. (2001). Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. Journal of Dairy Research, 68, 117-129.
- 177- OUMER, A., GARDE, S., GAYA, P., MEDINA, M. y NUÑEZ, M. (2001a). The effects of cultivating lactic starter cultures with bacteriocin-producing lactic acid bacteria. Journal of Food Protection, 64, 81-86.
- 178- ORD'ZEZ, G. y JEON, I. (1995). Evaluation of β -galactosidase activities associated with probiotic lactic acid bacteria by high performance liquid chromatography. Culture Dairy Production Journal, 30, 29.

- 179- ORDÓÑEZ, J.A. y BURGOS, J. (1977). Étude de la variété de fromage 'Ulloa'. I. Evolution de flore microbienne et des composants au cours de la maturation. *Lait*, 57, 150-163.
- 180- ORDÓÑEZ, J.A., BARNETO, R. y MARMOL, M.P. (1978). Identificación de la flora que participa en la maduración del queso Manchego. *Anales de Bromatología*, 30, 361-373.
- 181- ORTIGOSA, M., BÁRCENAS, P., ARIZCUN, C., PÉREZ-ELORTONDO, F., ALBISU, M. y TORRE, P. (1999). Influence of the starter culture on the microbiological and sensory characteristics of ewe's cheese. *Food Microbiology*, 16, 237-247.
- 182- OTERHOLM, A.Z., ORDAL, J. y WITTER, L.D. (1968). Glicerol ester hydrolase activity of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology*, 16, 524-527.
- 183- PACHER, B. y KNIEFEL, W. (1996). Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *International Dairy Journal*, 6, 43.
- 184- PAVIA, M., TRUJILLO, A.J., GUAMIS, B. y FERRAGUT V. (1999). Evolución de la composición y textura de un queso de oveja en la maduración. *Alimentaria*, 306, 43-47.
- 185- PÉREZ, G., CARDELL, E., y ZÁRATE, V. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 537-546.
- 186- PETERSON, S.D. y MARSHALL, R.T. (1990). Non-starter lactobacilli in Cheddar: a review. *Journal Dairy Science*, 73, 1395-1410.
- 187- PETERSON, L.W. (1997). *Cultures for the manufacture of dairy products*. Ed. Chr. Hansen Inc, Milwaukee, Reino Unido.
- 188- POULLET, BY BLANCA, HUERTAS, M., SÁNCHEZ, A., CÁCERES, P. y LARRIBA, G. (1991). Microbial study of Casar de Cáceres cheese throughout ripening. *Journal of Dairy Research*, 58, 231-238.
- 189- POULLET, BY BLANCA, HUERTAS, M., SÁNCHEZ, A., CÁCERES, P. y LARRIBA, G. (1993). Main lactic acid bacteria isolated during ripening of Casar de Cáceres cheese. *Journal of Dairy Research*, 60, 123-127.
- 190- REAL DECRETO 1679/1994, de 22 de Julio, por el que se establece las condiciones sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche

- cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos. Boletín del Estado (BOE), Art. 8.
- 191- REDDY, M., VEDAMUTHU, E., WASHAN, C. y REINBOLD, G. (1972). Agar medium for differential enumeration of lactic streptococci. *Applied Environmental Microbiology*, 24, 947.
- 192- REHMAN, S.-U., McSWEENEY, P.L.H., BANKS, J.M., BRECHANY, E.Y., MUIR, D.D., y FOX, P.F. (2000). Ripening of Cheddar cheese made from blends of raw and pasteurised milk. *International Dairy Journal*, 10, 33-44.
- 193- REINBOLD, G., SWERN, M. y HUSSONG, R. (1953). A plating medium for the isolation and enumeration of enterococci. *Journal Dairy Science*, 36, 1.
- 194- REQUENA, T., PELÁEZ, C. y DESMAZEAUD, M.J. (1991). Characterization of lactococci and lactobacilli isolated from semi-hard goats' cheese. *Journal of Dairy Research*, 58, 137-145.
- 195- REQUENA, T., DE LA FUENTE, M.A., FERNÁNDEZ DE PALENCIA, P., JUÁREZ, M. y PELÁEZ, C. (1992). Evaluation of a specific starter for the production of semi-hard goat's milk cheese. *Lait*, 72, 437-448.
- 196- RODRÍGUEZ, E., ARQUES, J.L., GAYA, P., NUÑEZ, M. y MEDINA, M. (2001). Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. *Journal of Dairy Research*, 68, 131-137.
- 197- RODRÍGUEZ, M., HIDALGO, M.Y., ALTHAUS, R.L., MOLINA, P., PERIS, C. y FERNÁNDEZ, N. (2002). Primeros resultados de producción y composición de la leche de oveja Guirra. XXVII Jornadas Científicas de la SEOC, Valencia, España, 913-917.
- 198- RODRÍGUEZ, M., ESCOLAR, E., PAOLINI, S., BELTRÁN, M.C., PERIS, C., MOLINA, P. y FERNÁNDEZ, N. (2003). Producción y composición de la leche de oveja Guirra: Parto de primavera. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Ciencia Animal, Valencia, España.
- 199- RYCHLIK, M., WARMKE, R. y GROSCH, W. (1997). Ripening of Emmental cheese wrapped in foil with and without addition of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. III. Analysis of character impact flavour compounds. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 30, 471-478.

- 200- SAVAT-BRUNAUD, D., THIERRY, A. y MANUBOIS, J. (1997). Development of a medium simulating Emmental juice for propionibacteria growth. *Journal Dairy Research*, 64, 573.
- 201- SASAKI, By M., BOSMAN, B.W. and TAN, P.S.T. (1995). Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. *Journal of Dairy Research*, 62, 601-610.
- 202- SCOTT, R. (1991). *Fabricación de queso*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- 203- SKEIE, S. y ARDÖ, Y. (2000). Influence from raw milk flora on cheese ripening studied by different treatments of milk to model cheese. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 33, 499-505.
- 204- SPINNLER, H. y CORRIU, G. (1989). Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *Journal Dairy Research*, 56, 755.
- 205- SPRERR, E. (1991). *Lactología Industrial*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- 206- STANLEY, G. (1998). *Microbiología de los productos lácteos fermentados*. En: R. Early; *Tecnología de los productos lácteos*. 2ª Edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- 207- STILES, M. y HOLZAPFEL, W. (1997). Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *International Journal Food Microbiology*, 36, 1.
- 208- SUAREZ, J.A., BARRETO, R. y IÑIGO, B. (1983). Contribution to study of Mahón cheese. III. Lactic acid bacteria and Enterococcus. *Chemistry Mikrobiology Technology Lebensmittel*, 8:52-56.
- 209- TERZAGHI, E. y SANDINE W. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29, 807.
- 210- TREPMAN, E. y CHEN, R.F. (1980). Fluorescence stopped-flow study of the o-phthaldialdehyde reaction. *Archive Biochemistry Biophysics*, 2002, 524.
- 211- TORNADIJO, M.E., FRESNO, J.M., BERNARDO, A., MARTÍN-SARMIENTO, R. y CARBALLO, J. (1995). Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). *Lait*, 75, 551-570.
- 212- TRUJILLO, A.J. (1996). *Procesos de proteólisis primaria que intervienen en la maduración del queso*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España.

- 213- TSAI, K. y LUEDECKE, L. (1989). Impedance measurement of changes in activity of lactic cheese starter cultures after storage at 4°C. *Journal Dairy Science*, 72, 2239.
- 214- TZANETAKIS, N. y LITOPPOULOU-TZANETAKI, E. (1989). Lactic acid bacteria in raw goat milk and some of their biochemical properties. *Microbiology Aliments Nutrition*, 7, 73-80.
- 215- TZANETAKIS, N., VAFOPPOULOU-MASTROJIANNAKI y LITOPPOULOU-TZANETAKI, E. (1995). The quality of white-brined cheese from goat's milk made with different starters. *Food Microbiology*, 12, 55-63.
- 216- VEDAMUTHU, E.R. (1994). The dairy leuconostocs: use in dairy products. *Journal Dairy Science*, 77, 2725.
- 217- VEDAMUTHU, E. y REINBOLD, G. (1967). The use of candle oats jars incubation for the enumeration, characterization, and taxonomic study of propionibacteria. *Milchwissenschaft*, 22, 428.
- 218- VEISSEYRE, R. (1988). *Lactología técnica*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- 219- VISSER, F.M.W. (1977). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavor development in Gouda cheese. 3. Protein breakdown: analysis of the soluble nitrogen fractions. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 31, 210-239.
- 220- WALLACE, J.M. y FOX, P.F. (1998). Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: a review. *Food Chemistry*, 62, (2), 217-224.
- 221- WALSTRA, P., GEURTS, T.J., NOOMEN, A., JELLEMA, A., y van BOEKEL, M.A.J.S. (1999). *Dairy technology: Principles of milk properties and processes*. Ed. Marcel Dekker, Inc, New York, EEUU.
- 222- WALSTRA, P., GEURTS, T.J., NOOMEN, A., JELLEMA, A. y van BOEKEL, M.A.J.S. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Ed. Acribia S.A., Zaragoza, España.
- 223- ZÁRATE, V., BELDA, F., PÉREZ, C. y CARDELL, E. (1997). Changes in the microbial flora of Tenerife goat's milk cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 7, 635-641.
- 224- YU, J.H. (1986). Studies on the extracellular and intracellular lipase of *Lactobacillus casei*. I. On the patterns of free fatty acids liberated from milk fat reacted by these lipases. *Korean Journal of Dairy Science*, 8, 167.

7- ANEXO

7.1- LISTA DE LAS CEPAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS

- 1 *Lactobacillus plantarum*
- 2 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
- 3 *Lactobacillus plantarum*
- 4 *Lactobacillus plantarum*
- 5 *Lactobacillus plantarum*
- 6 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
- 7 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 8 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
- 9 *Lactobacillus plantarum*
- 10 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 11 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
- 12 *Lactobacillus plantarum*
- 13 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 14 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 15 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 16 Género *Lactobacillus*
- 17 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
- 18 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
- 19 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 20 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 21 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 22 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
- 23 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 24 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 25 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 26 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 27 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 28 *Lactobacillus pentosus*
- 29 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 30 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 31 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
- 32 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 33 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 34 *Lactobacillus brevis*

- 35 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
36 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
37 *Lactobacillus salivarius*
38 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
39 *Lactobacillus curvatus*
40 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
41 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
42 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
43 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
44 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
45 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
46 *Lactobacillus salivarius*
47 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
48 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
49 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
50 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
51 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
52 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
53 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
54/169 *Lactobacillus salivarius*
55 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
56 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
57 *Lactobacillus delbrukei* subsp. *lactis*
58 *Lactobacillus brevis*
59 *Lactobacillus plantarum*
60/173 *Lactobacillus brevis*
61/171 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
62/172 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
63 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
64 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
65 *Lactobacillus pentosus*
66 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
67 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
68 *Lactobacillus plantarum*
69 *Lactobacillus plantarum*
70 *Lactobacillus delbrukei* subsp. *lactis*
71 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
72 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
73 *Lactobacillus plantarum*
74 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

- 75 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
76 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
77 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
78 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
79 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
80 *Lactobacillus pentosus*
81 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
82 *Lactobacillus plantarum*
83 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
84 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
85 *Lactobacillus plantarum*
86 *Lactobacillus plantarum*
87 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
88 *Lactobacillus plantarum*
89 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
90 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
91 *Lactobacillus pentosus*
92 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
93 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
94 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
95 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
96 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
97 *Lactobacillus pentosus*
98 *Lactobacillus plantarum*
99 *Lactobacillus plantarum*
100 *Lactobacillus salivarius*
101 *Lactobacillus plantarum*
102 *Lactobacillus plantarum*
103 *Lactobacillus plantarum*
104 *Leuconostoc lactis* subsp. *lactis*
105 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*
106 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
107 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
108 *Lactobacillus plantarum*
109 *Lactobacillus brevis*
110 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
111 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
112 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
113 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
114 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

- 115 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
116 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
117 *Lactobacillus acidophilus*
118 *Lactobacillus rhamnosus*
119 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
120 *Leuconostoc lactis*
121 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
122 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
123 *Lactobacillus plantarum*
124 *Lactobacillus plantarum*
125 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
126 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
127 *Lactobacillus plantarum*
128 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
129 *Lactobacillus plantarum*
130 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
131 *Lactobacillus rhamnosus*
132 *Lactobacillus plantarum*
133 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextr*
134 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
135 *Lactobacillus brevis*
136 *Lactobacillus brevis*
137 *Lactobacillus acidophilus*
138 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
139 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
140 *Lactobacillus crispatus*
141 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
142 *Lactobacillus crispatus*
143 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
144 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
145 *Lactobacillus plantarum*
146 *Lactobacillus plantarum*
147 *Lactobacillus plantarum*
148 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
149 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
150 *Lactobacillus Coprophilus*
151 *Lactobacillus rhamnosus*
152 *Lactobacillus brevis*
153 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

- 154 *Lactobacillus plantarum*
- 155 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 156 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 157 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 158 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 159 *Lactobacillus pentosus*
- 160 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 161 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 162 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 163 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 164 *Lactobacillus plantarum*
- 165 *Leuconostoc lactis*
- 166 *Leuconostoc lactis*
- 167 *Lactobacillus plantarum*
- 168 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- 170 *Lactobacillus brevis*