

Efecto de los probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* en las características físico-químicas y sensoriales de queso Cheddar Zamorano

Juan Carlos Naranjo Mora

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2008

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto de los probióticos *Lactobacillus acidophillus* y *Bifidobacterium bifidum* en las características físico-químicas y sensoriales de queso Cheddar Zamorano

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura.

Presentado Por

Juan Carlos Naranjo Mora

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2008

**Efecto de los probióticos *Lactobacillus acidophilus*
y *Bifidobacterium bifidum* en las características
físico-químicas y sensoriales
de queso Cheddar Zamorano**

Presentado Por:

Juan Carlos Naranjo Mora

Aprobado:

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Carrera Agroindustria Alimentaria

Edgar Edmundo Ugarte, M.Sc.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

RESUMEN

Naranjo, J. 2008. Efecto de los probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* en la características físico-químicas y sensoriales del queso cheddar Zamorano. Proyecto de graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 38 p.

Los probióticos son microorganismos que al ingerirse en cantidades adecuadas mejoran la salud del hospedero. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 y *Bifidobacterium bifidum* BB-12 sobre las características físico-químicas y sensoriales del queso cheddar. El diseño experimental usado fue un BCA con medidas repetidas en el tiempo a los 0, 15, 30, 45 y 60 días de maduración del queso. Se evaluaron 3 tratamientos con 3 repeticiones para un total de 9 unidades experimentales. Se preparó un cultivo madre por separado para cada microorganismo probiótico y a partir de éste se inocularon 1×10^3 UFC /ml de leche. Las características físico-químicas evaluadas fueron ATECAL, grasa, color y textura. A los 60 días de maduración se evaluó la aceptación de cada tratamiento con un panel no entrenado de 12 personas. La adición de los probióticos *L. acidophilus* y *B. bifidum* no produjo cambios significativos en las características sensoriales de apariencia, aroma, textura, acidez, sabor y aceptación general ($p > 0.05$); lo cual es positivo ya que los quesos probióticos tuvieron las mismas características que el queso control. El probiótico *Lactobacillus acidophilus* incrementó el nivel de acidez a los 45 y 60 días de maduración y disminuyó la textura de los quesos ($p < 0.05$). Al finalizar el estudio, el tratamiento inoculado con *Lactobacillus acidophilus* obtuvo mayor ATECAL e incrementos significativos de color en la escala a^* a partir de los 30 días de maduración, mientras que el tratamiento inoculado con el cultivo iniciador obtuvo mayor valor de textura ($p < 0.05$). En la escala b^* (azul-amarillo), los tratamientos inoculados con los probióticos tuvieron la misma intensidad de color a través del tiempo.

Palabras clave: Acidez, bacterias lácticas, cheddarización, proteólisis, sistema inmunológico.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	vi
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
5. CONCLUSIONES.....	30
6. RECOMENDACIONES	31
7. BIBLIOGRAFÍA.....	32
8. ANEXOS.....	34

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadro	Página
1. Diseño experimental.	10
2. Análisis sensorial de apariencia.	16
3. Análisis sensorial de aroma.	17
4. Análisis sensorial de textura.	17
5. Análisis sensorial de acidez.	18
6. Análisis sensorial de sabor.	19
7. Análisis sensorial de aceptación general.	19
8. Análisis de color valor L*	20
9. Análisis de color valor b*	21
10. Análisis de color valor a*	22
11. Análisis de textura.	23
12. Análisis de ATECAL.	25
13. Análisis de grasa.	26
14. Conteo de coliformes totales.	28
15. Costos variables queso cheddar probiótico 440 g.	29
Figura	Página
1. Flujo de proceso de queso cheddar con probióticos.	13
2. Comportamiento de Valor L* a través del tiempo.	21
3. Comportamiento de Valor b* a través del tiempo.	22
4. Comportamiento de Valor a* a través del tiempo.	23
5. Comportamiento de textura a través del tiempo.	24
6. Comportamiento de ATECAL a través del tiempo.	25
7. Comportamiento del nivel de grasa a través del tiempo.	26
8. Conteo de coliformes totales a través del tiempo.	28
Anexo	Página
1. Bacterias ácido lácticas comúnmente usadas como probióticos.	35
2. Cálculo de cantidad de probiótico utilizado en cada tratamiento.	36
3. Método utilizado para la prueba de acidez.	37
4. Hoja de evaluación sensorial de aceptación de queso cheddar.	38

1. INTRODUCCIÓN

Según el codex alimentarius (CODEX STAN 221-2001), se entiende por queso el producto blando, semiduro o duro, madurado o no madurado, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche. El queso es obtenido mediante coagulación total o parcial de la proteína de la leche por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación.

“Queso madurado es aquel que no está listo para el consumo después de elaborado, debe ser almacenado por cierto tiempo bajo ciertas condiciones que propician los cambios físico-químicos característicos del queso” (Osorio, 2007).

El queso Cheddar es un queso madurado generalmente entre 9 y 12 meses, es originario de Inglaterra, de pasta dura o semi-dura de color blanca o amarilla, prensada con leche semidescremada de vaca. La corteza puede ser igual que el interior o puede estar teñida de anaranjado. “La Cheddarización, es un proceso en la producción de queso *cheddar*, donde después del desuerado, se corta la cuajada en bloques a los que se les voltea cada 15 minutos y se amontonan sucesivamente hasta alcanzar una acidez adecuada y un desuerado óptimo” (Dinakar, 1994).

De acuerdo a la FAO y OMS (2001), en su estudio de alimentación y nutrición se reconoce a los probióticos como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades apropiadas como parte de un alimento, confieren al huésped un beneficio para la salud.

Muchas especies diferentes de bacterias actúan de forma conjunta en el intestino humano para mantener su funcionamiento normal. Sin embargo, factores como el estrés, sustancias tóxicas o un tratamiento con antibióticos pueden alterar el equilibrio bacteriano natural produciendo una disminución del número de organismos beneficiosos. Esta alteración hace que la persona sea vulnerable a las infecciones de origen alimentario como las causadas por *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria*; y puede predisponer a padecer trastornos intestinales como el cáncer de intestino y la colitis ulcerativa. Aquí es donde los probióticos pueden intervenir (Gibson, 2002).

Según Ishibashi y Shimamura, (1993; citado por Ong, 2005), los probióticos deben mantenerse viables en el alimento hasta su consumo y deben estar presentes en una cantidad significativa a niveles de por lo menos 10^7 UFC por g o ml de producto.

1.1 ANTECEDENTES

Actualmente la planta de lácteos de Zamorano produce queso cheddar con un periodo de maduración de 6 a 10 meses dependiendo el inventario del producto. La incorporación de probióticos en quesos no se ha realizado hasta el momento.

Ong *et al.* (2007), en su estudio publicado en la Revista Internacional de Productos Lácteos evaluó el efecto de la incorporación de cepas probióticas del género *Lactobacillus* y su comportamiento en queso cheddar madurado. Estas cepas fueron aisladas del tracto gastrointestinal humano por medio de una cirugía. Este estudio demostró que las cepas de *Lactobacillus paracasei* se mantuvieron viables en el queso, en tanto que las cepas de *Lactobacillus salivarius* murieron durante el periodo de maduración. Además, se realizó un estudio preliminar donde se evaluó la eficacia del queso cheddar como sistema de transporte de probióticos, para esto se alimentó a 14 lechones durante 18 días con yogur y queso cheddar (5 meses de maduración) y 10^9 UFC/g, ambos productos incorporados con las mismas cepas de *Lb. paracasei*. Al día 18 se realizó la necropsia de una muestra de lechones encontrándose a nivel del intestino delgado niveles de 10^4 - 10^5 UFC de probióticos/ml. Por lo tanto, se pudo elaborar queso cheddar probiótico con altos niveles de *Lb. paracasei* (10^8 UFC/g de queso) a un costo relativamente bajo e iguales técnicas de elaboración. El estudio concluyó que el queso cheddar es un sistema de transporte eficaz que asegura la viabilidad de estas cepas cuya incorporación no produjo un impacto negativo en la calidad del queso y en sus características sensoriales de aroma, sabor y textura.

Thomas (2005), evaluó el efecto de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* en las propiedades fisico-químicas y sensoriales del yogur quien concluyó que los tratamientos con inoculaciones de probióticos, no demostraron diferencias significativas en el análisis exploratorio con respecto al control.

Por otro lado Estrada (2007), evaluó el efecto de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* en las propiedades fisico-químicas y sensoriales del yogur de fresa demostrando que la acidez titulable aumentó significativamente con respecto al tratamiento control al adicionar *Lactobacillus acidophilus* y que no existieron diferencias significativas en los atributos de aroma, textura y acidez entre los tratamientos inoculados con probióticos comparados con el control.

1.2 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

1.2.1 Limitantes

- No hubieron los recursos necesarios de dinero y medios de cultivo selectivos para evaluar la viabilidad de los microorganismos probióticos al momento de consumir el producto.
- Generalmente el queso cheddar tiene un tiempo de maduración de seis meses, este estudio tuvo una duración de sesenta días, por lo cual no se pudieron evaluar las características físico- químicas en un mayor tiempo de maduración.
- El análisis sensorial de aceptación se realizó con un panel no entrenado por lo que no se identificaron idealmente las características sensoriales del queso cheddar.

1.2.2 Alcances

- Desarrollar un nuevo producto acorde a las tendencias de consumo del mercado actual.
- Disminuir el tiempo de maduración de queso cheddar.
- Identificar las características físico-químicas y sensoriales producto de la incorporación de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de los cultivos probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* en las propiedades físico-químicas y sensoriales de queso cheddar Zamorano.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar mediante análisis físicos y químicos el efecto de la adición de cultivos probióticos en las características de color, grasa, textura y ATECAL del queso cheddar Zamorano.
- Determinar el efecto de la adición de cultivos probióticos sobre las características sensoriales de apariencia, aroma, textura, acidez, sabor y aceptación general del queso cheddar Zamorano.
- Correlacionar los resultados de los análisis físico-químicos y sensoriales.
- Realizar un análisis de costos variables para la producción de queso cheddar con probióticos en la planta de lácteos de Zamorano.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 PROBIÓTICOS

El concepto de probiótico se inició a principios del siglo XX con los trabajos de Metchnikoff, quien observó que el consumo de leches fermentadas tenía un efecto positivo sobre la microbiota residente del tracto gastrointestinal con un impacto favorable en la salud humana. Los probióticos son organismos vivos que al ser ingeridos afectan benéficamente al huésped mejorando su balance intestinal.

Según Castro y Rovetto (2006), se han propuesto varios mecanismos de acción en la efectividad de los probióticos para mejorar la resistencia del huésped.

- Producen sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas que ejercen acción antibacteriana y contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos.
- Disminuyen el pH intestinal favoreciendo el crecimiento de organismos beneficiosos.
- Compiten por nutrientes al utilizar los nutrientes consumidos por organismos patógenos.
- Estimulan la respuesta inmune. Estos microorganismos pueden alertar al sistema inmune y favorecer el rechazo de agentes infecciosos estimulando la producción de inmunoglobulina A (IgA), activando macrófagos e incrementando interferón gamma (IFN-gamma) y citoquinas proinflamatorias.

Entre los microorganismos probióticos utilizados en el consumo humano se encuentran las bacterias ácido-lácticas (BAL) que comprenden *Lactobacilos* y *Bifidobacterias* consideradas seguras para uso humano, pero también se utilizan otras cepas bacterianas no patógenas, como *Streptococcus*, *Enterococcus* y microorganismos no bacterianos, como *Saccharomyces boulardii*, que es una levadura no patógena (Castro y Porras, 2003).

El interés en las terapias preventivas y suplementos nutricionales ha aumentado en los últimos años. La producción de alimentos probióticos actualmente se ha enfocado en bebidas lácteas fermentadas y yogur; existen ventajas al incorporar probióticos en quesos por tener un pH elevado, mayor capacidad buffer, una consistencia sólida y mayor contenido de grasa, lo cual lo hace un medio viable que protege a la bacteria probiótica durante el almacenamiento y paso a través del tracto gastrointestinal (Ong, 2005).

2.2 LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

El término *Lactobacillus* es la unión de: *Lacto* que significa leche y *bacillus* que quiere decir en forma de barra o vara. *Acidophilus* quiere decir con afinidad por los ácidos. Crece fácilmente en medios mucho más ácidos que los ideales para otros microorganismos (pH 4-5 o menores) y a unos 45 °C. De manera natural se encuentra en una gran variedad de alimentos, incluidos la leche, la carne, el pescado y los cereales. No sólo está presente en los intestinos de los animales y en el del propio hombre, sino también en la boca y la vagina. *Lactobacillus acidophilus* absorbe la lactosa y la metaboliza formando ácido láctico. Ciertas variedades genéticamente similares (conocidas como heterofermentativas) también producen etanol, dióxido de carbono y ácido acético como subproductos (Wikipedia Foundation Inc, 2008).

Lactobacillus acidophilus es considerado un microorganismo benéfico por su producción de vitamina K, y sustancias antimicrobiológicas como: Acidolina, acidophilina, lactocidina, y bacteriocinas. Durante la digestión, también ayuda en la producción de niacina, ácido fólico y vitamina B6 (piridoxina) (Mayo Foundation for Medical Education and Research, 2008).

Un estudio controlado randomizado de 367 recién nacidos de muy bajo peso, recibieron leche materna más *L. acidophilus* y *B. infantis* o sólo leche materna dos veces al día. La incidencia de enterocolitis necrotizante (ECN) fue baja en el grupo con organismos probióticos, 1.1% vs. 5.3% respectivamente ($p < 0.05$). Estos datos sugieren que la baja colonización de *L. acidophilus* y *B. infantis* en recién nacidos de muy bajo peso al nacer puede ser un factor de riesgo en la infección bacteriana y plantean la administración de probióticos como una estrategia adicional en la prevención de ECN (Young, 2003; citado por Parvez y Mali, 2006).

2.3 BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM

Bifidobacterium es un género microbiológico de bacterias Gram.- positivas, anaeróbicos, no móviles, con frecuencia ramificadas. Son uno de los mayores géneros de bacterias saprófitas de la flora intestinal y las bacterias que residen en el colon. Ayudan en la digestión, y están asociadas con una menor incidencia epidemiológica de alergias, además, previenen algunas formas de crecimiento de tumores (Guarner y Malagelada, 2000; citado por Singh y Drake, 2003).

Las cepas del género *Bifidobacterium* son integrantes mayoritarios de la microbiota intestinal de los niños alimentados con leche materna y uno de los principales grupos de probióticos. Son capaces de ejercer in vitro efectos antagónicos frente a importantes patógenos gastrointestinales pertenecientes a los géneros: *Listeria*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Escherichia* y *Candida*. Los mecanismos de acción de las bifidobacterias frente a los patógenos gastrointestinales mejor caracterizados incluyen la competición por los sitios de adhesión, la inmunomodulación y la síntesis de compuestos antimicrobianos (Sanz, 2004; citado por Taranto y Medicini, 2005).

La prueba más concluyente de los efectos beneficiosos de determinadas cepas de probióticos se ha establecido utilizando *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium bifidum* BB-12 con fines de prevención de la diarrea aguda, causada principalmente por rotavirus en niños (Saavedra, 1994; citado por Parvez y Mali, 2006).

En otros estudios clínicos con lactantes alérgicos a la leche de vaca, se alivió la dermatitis atópica mediante la ingestión de cepas probióticas *L. rhamnosus* GG y *B. bifidum* BB-12 (Majamaa e Isolauri, 1997; citado por Parvez y Mali, 2006).

2.4 REACCIONES QUÍMICAS EN LA MADURACIÓN DE QUESO CHEDDAR

Una serie de reacciones químicas y bioquímicas ocurren durante la maduración del queso, entre ellas la glicólisis, lipólisis y la más importante proteólisis. La proteólisis juega un papel crítico en la determinación de las características sensoriales típicas del queso cheddar y es un indicador significativo de su calidad. Dicha reacción es causada por enzimas de la leche como la pepsina y quimosina y enzimas microbiales liberadas por el cultivo iniciador. Estas enzimas hidrolizan las caseínas lo cual resulta en la formación de péptidos de cadena larga e intermedia los cuales a su vez serán hidrolizados por enzimas proteolíticas originadas de bacterias ácido lácticas (BAL) y cultivos probióticos en péptidos de cadena corta y aminoácidos libres importantes para el desarrollo de sabor en el queso cheddar (Fox y McSweeney, 1999; citado por Singh y Drake, 2003).

La incorporación de *Lactobacillus* en quesos ha estado asociada con un incremento en la proteólisis. Adicionalmente, se ha encontrado que las enzimas proteolíticas producidas por cultivos probióticos degradan péptidos que producen amargor. Sin embargo, el amargor es considerado un componente normal en el sabor del queso cheddar, aunque un elevado sabor amargo puede limitar la aceptación en el consumo (Broadbent *et al.* 2002; citado por Ong, 2007).

El sabor del queso cheddar se ve influenciado por la glicólisis que consiste en la conversión de lactosa a ácido láctico producida principalmente por bacterias iniciadoras que reducen el pH del queso hasta 5.1-5.4. Durante la maduración del queso, la lactosa restante es metabolizada en L-lactato que al oxidarse a partir de una mol de O₂ por cada mol de lactato genera una mol de acetato y una mol de CO₂ (Fox *et al.*, 1996). El acetato puede ser producido también por bacterias iniciadoras o prebióticas a partir de lactosa o citrato y está presente en altas concentraciones en queso cheddar (Fox y McSweeney, 1999; citado por Singh y Drake, 2003).

La hidrólisis de triglicéridos los cuales constituyen más del 98% de la porción grasa de un queso, es la principal transformación bioquímica de la grasa durante la maduración. Esta reacción ocasiona la producción de ácidos grasos libres (AGL), mono, diglicéridos y glicerol. AGL contribuyen al aroma del queso. Los ácidos grasos de cadena corta tienen sabores específicos y son los responsables de la rancidez (Hosono, 1980; citado por Ong, 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

La activación de los probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* y el conteo inicial de los mismos se realizó en el laboratorio de microbiología de Zamorano. La elaboración y evaluación de los tratamientos así como los análisis microbiológicos, químicos y evaluaciones sensoriales se realizaron en la Planta de Industrias Lácteas. Los análisis físicos se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ). Todas las instalaciones localizadas en el Departamento de Francisco Morazán, 30 km al este de Tegucigalpa, Honduras.

3.2 MATERIALES Y EQUIPO

3.2.1 Materiales y equipo para el conteo de los microorganismos probióticos (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*).

- 1.2 L de agua destilada.
- 72 g de leche descremada en polvo.
- 3 g de cultivo probiótico *Lactobacillus acidophilus*.
- 3 g de cultivo probiótico *Bifidobacterium bifidum*.
- 12 balones con capacidad mayor a 100 ml.
- Cámara de flujo laminar.
- Alcohol al 75 %.
- Agua de dilución.
- Peptona 0.1% N.
- Autoclave 121 °C X 15 min.
- Medio ACP.
- Incubadora a 40 °C.
- 6 Tubos de ensayo de 10 ml.
- Micropipetas.
- Tips.

3.2.2 Materiales e ingredientes para la elaboración de queso cheddar probiótico.

Para 18 kg de queso:

- 200 kg de leche de vaca pasteurizada y estandarizada al 2.9% de grasa.
- Cultivo para queso cheddar; *Lactococcus lactis* (RA21, Chr. Hansen) y *Lactobacillus helveticus* (LH22, Chr. Hansen).
- Cultivo probiótico: *Bifidobacterium bifidum* (BB-12) o *Lactobacillus acidophilus* (LA-5). Ambos de Chr. Hansen.
- 0.6 kg de sal (0.3 %).
- 23 ml de colorante para quesos (0.011 %).
- 40 ml de CaCl₂ (0.02 %).
- 20 ml de cuajo líquido (0.01 %).

3.2.3 Equipo para la elaboración de queso cheddar probiótico.

- Yogos.
- Pasteurizador continuo HTST (72 °C durante 15 s).
- Quesera 200 L de capacidad.
- Termómetro.
- Palas de acero inoxidable.
- Liras vertical y horizontal de 1cm.
- Balanza analítica.
- Moldes de policloruro de vinilo.
- Prensa hidráulica.
- Cuarto frío para maduración a 10 °C.
- Empacadora al vacío ultraback doble campana.

3.2.4 Materiales y equipo para los análisis microbiológicos, físicos y químicos.

- INSTRON 444 (Guillotina Acople).
- Centrifuga 244.
- Colorflex Hunter Lab.
- Potenciómetro.
- Alcohol (95%).
- Medio de cultivo Agar para Conteo de Platos (ACP).
- Medio de cultivo ARVB.
- Agua destilada.
- Agua peptonada.
- Pipetas de 1 y 10 ml.
- Bulbo.
- Tubos de ensayo.
- Probeta de 1000 ml.
- Platos petri.

- Mechero.
- Incubadora (37 °C).
- Calentador.

3.3 TRATAMIENTOS

Se evaluó el queso cheddar con tres variaciones en la inoculación de cultivos. Los tratamientos son los siguientes:

- **TRT 1:** Queso cheddar con *Lactobacillus helveticus* y *Lactococcus lactis*.
- **TRT 2:** Queso Cheddar con *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* y cultivo probiótico *Lactobacillus acidophilus*.
- **TRT 3:** Queso cheddar con *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* y cultivo probiótico *Bifidobacterium bifidum*.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron 3 repeticiones de cada uno de los 3 tratamientos para tener un total de 9 unidades experimentales. El diseño experimental que se utilizó es bloques completos al azar con medidas repetidas en el tiempo en donde las repeticiones son los bloques para tener un total de 3 bloques y cinco mediciones en el tiempo a los 0, 15, 30 ,45 y 60 días de maduración del queso.

Los resultados obtenidos fueron analizados en el programa “Statistical Analysis System” (SAS® versión 9.1) para realizar el análisis de varianza y la separación de medias usando la prueba Tukey con un alpha de 0.05.

Cuadro 1. Diseño experimental.

ESPECIFICACIONES DE TRATAMIENTOS			
BLOQUES	TRT 1 (CONTROL)	TRT 2	TRT 3
	<i>Lactococcus lactis</i> + <i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> + <i>Lactobacillus helveticus</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> + <i>Lactobacillus helveticus</i> + <i>Bifidobacterium bifidum</i>
B1	R1	R1	R1
B2	R2	R2	R2
B3	R3	R3	R3

3.4.1 Hipótesis

- **Hipótesis Nula:** No existen diferencias significativas en las variables físico-químicas o sensoriales evaluadas entre el queso cheddar control y los dos quesos cheddar con probióticos.
- **Hipótesis Alternativa:** Sí existen diferencias significativas en las variables físico-químicas o sensoriales evaluadas entre el queso cheddar control y los dos quesos cheddar con probióticos.

3.5 METODOLOGÍA

3.5.1 Método para la activación de los microorganismos probióticos (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*).

La activación de los probióticos se efectuó de acuerdo al procedimiento utilizado por Ong *et al.* (2007) durante un ensayo realizado en la Universidad Victoria ubicada en Australia.

Se utilizó 1 g de los probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* y se los mantuvo a 40 °C durante una noche en un medio estéril preparado con leche descremada reconstituida. Este procedimiento se realizó dos veces por triplicado y para cada probiótico. Para la segunda vez se tomó 1 ml del medio que contiene las bacterias por cada 100 ml del nuevo medio estéril de leche reconstituida descremada, así se obtuvo el cultivo madre del cual se determinó la concentración inicial de bacterias en el cultivo probiótico.

Para reconstituir la leche descremada se utilizó agua destilada en una concentración de 12 % p/v. La esterilización se realizó en la autoclave a 121 °C durante 15 min y posteriormente en la cámara de flujo laminar se agregó el cultivo probiótico a una concentración de 1 % p/v.

La concentración inicial de bacterias en el probiótico se estableció a partir del conteo en Agar para Conteo de Platos (ACP) del cultivo madre. Se utilizaron diluciones hasta una concentración de 10^7 y se sembraron por triplicado muestras desde una concentración de 10^5 más los controles de agua de dilución y agar esto para cada probiótico por separado. La técnica de siembra que se empleó fue vertido (pour plate) utilizando una segunda capa de APC para crear un ambiente anaerobio ideal en los probióticos.

La cantidad del cultivo probiótico que se usó en la elaboración de las unidades experimentales se lo obtuvo a partir de la concentración inicial de bacterias en el probiótico (ANEXO 2).

3.5.2 Elaboración de queso cheddar con probióticos.

Se elaboraron tres tratamientos por separado. Para cada tratamiento se utilizó 200 kg de leche con un rendimiento promedio de 9 % para obtener bloques de 18 kg de queso. Los tres tratamientos contenían *Lactobacillus helveticus* (LH B02), *Lactococcus lactis* (RA21) y dos de ellos contenían los cultivos probióticos *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) o *Bifidobacterium bifidum* (BB-12). El cultivo probiótico se inoculó al igual que los cultivos lácticos iniciadores. Se utilizaron 2.6 g de *Lactobacillus helveticus* y 4.6 g de *Lactococcus lactis*, 0.25 ml de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y 0.17 ml de cultivo con el probiótico *Bifidobacterium bifidum*, ambos probióticos tuvieron una concentración inicial de 10^3 UFC/ml de leche en la quesera.

La pasteurización y mezcla de ingredientes se realizó siguiendo el procedimiento utilizado en la planta de lácteos Zamorano (Revilla, 1995).

El proceso de cheddarización duró de 6-10 minutos, y el punto de corte y salado se empezó cuando el suero alcanzó una acidez ATECAL de 0.4. Finalmente, cada bloque se empacó al vacío y se almacenó por dos meses en la cámara de maduración a 10 °C.

3.5.3 Descripción flujo de proceso de queso cheddar probiótico.

- **Estandarización:** Se estandariza la leche a 2.9 % de grasa.
- **Pasteurización:** Pasteurizador continuo HTST (72 °C durante 15 s).
- **Adición de cultivo iniciador:** Se calienta la leche a 31 °C y se agrega el cultivo iniciador, 2.6 g de *Lactobacillus helveticus* y 4.6 g de *Lactococcus lactis*.
- **Adición del cultivo probiótico:** 0.25 ml de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y 0.17 ml de cultivo con el probiótico *Bifidobacterium bifidum*.
- **Mezcla de ingredientes y aditivos:** Se mantiene en reposo 30 min a la misma temperatura y se agrega 20 ml de colorante, 40 ml de CaCl₂ y 25 ml de cuajo líquido de doble potencia.
- **Cortado del cuajo:** La mezcla se mantiene en reposo a la misma temperatura durante 30 min y se corta.
- **Cocinado del cuajo:** La cuajada se calienta durante 30 min y al alcanzar 43 °C se agita cada 10 min durante una hr.
- **Desuerado:** Se drena el suero.
- **Cheddarización:** El queso se corta en bloques los que se dan vuelta cada 10 min hasta alcanzar una acidez ATECAL en el suero de 0.4.
- **Salado:** Se mezcla la sal 0.6 kg.
- **Moldeado y prensado:** Se coloca el queso en moldes y se prensa por 20 hr de 25 a 40 PSI.
- **Madurado:** El queso se empaca al vacío y se madura en una cámara a 10 °C.

A continuación se detalla el flujo de proceso para la elaboración de los tratamientos.

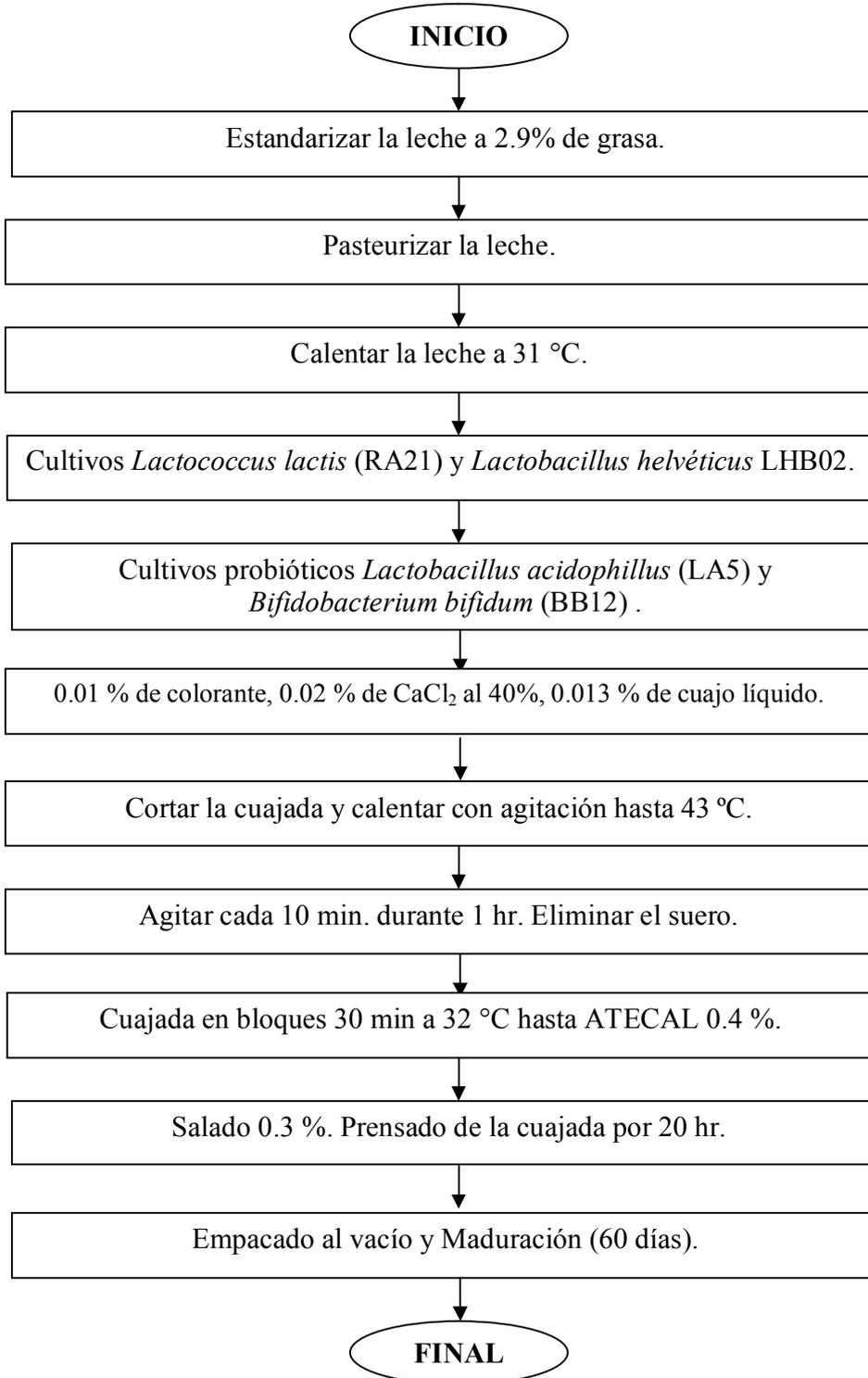


Figura 1. Flujo de proceso de queso cheddar con probióticos.

3.6 ANÁLISIS FÍSICOS

Los análisis de color y textura se realizaron en el laboratorio de análisis de alimentos de Zamorano a los 0, 15, 30, 45 y 60 días de maduración del queso.

El color se midió utilizando el colorímetro Colorflex Hunter Lab ® equipo que mide los valores L*, a* y b* que describen los colores en tres ejes de coordenadas. El valor L* va de 0 a 100 y mide la claridad, es decir, que tan negro o que tan blanco es el objeto siendo 0 negro y 100 blanco. El valor a* mide en el espectro visible los colores del verde al rojo, siendo a* (-) verde y a* (+) rojo. El valor b* mide los colores del espectro que van del azul al amarillo, siendo b* (-) azul y b* (+) amarillo.

La textura se midió utilizando el INSTRON 4444®, acople Compresión Warner Bratzer Crosshead Speed tipo guillotina. Se evaluó la fuerza de corte del queso expresada en kilo Newtons (kN).

3.7 ANÁLISIS QUÍMICOS

Los análisis de grasa y acidez se realizaron en el laboratorio de la planta de lácteos de Zamorano a los 0, 15, 30, 45 y 60 días de maduración del queso.

La grasa se midió utilizando el método de Babcock, AOAC (933.05) para quesos. La acidez se midió basándose en el método oficial para determinar acidez en quesos AOAC (33.7.14) (ANEXO 3).

3.8 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Este análisis se realizó en el laboratorio de la planta de lácteos de Zamorano a los 0, 15, 30, 45 y 60 días de maduración del queso.

Haciendo uso de técnicas de asepsia se cuantificaron coliformes totales en medio de cultivo Agar Rojo Violeta Bilis (ARVB). La técnica de siembra utilizada fue vertido (pour plate). Los platos se inocularon con 1 ml de solución preparada a partir de 5g de queso diluidos en 30 ml de agua peptonada esterilizada y se incubaron invertidas con la tapa hacia abajo a 37 °C durante 24 hr. El conteo de unidades formadoras de colonias que se identificaron por su color violeta intenso, se lo realizó manualmente utilizando el método estándar.

3.9 ANÁLISIS SENSORIAL

Todos los tratamientos fueron evaluados a los 60 días de maduración de queso por un panel no entrenado compuesto por 12 personas con hábitos de consumo de productos lácteos. Se realizó un análisis de aceptación para determinar si el panel distingue diferencias significativas entre los tratamientos. A cada panelista se le entregó una hoja de evaluación (ANEXO 4) con seis escalas hedónicas de cinco puntos (1= me disgusta mucho; 5= me gusta mucho) para los siguientes atributos: Apariencia, aroma, textura, acidez, sabor y aceptación general. Cada panelista tuvo que evaluar los tres tratamientos.

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para este análisis se utilizó el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS®). Se realizaron análisis de varianza y separación de medias Tukey con un nivel de significancia $p < 0.05$ para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Además, se hicieron correlaciones entre los resultados de los análisis físico-químicos con los resultados del análisis sensorial.

3.11 ANÁLISIS DE COSTOS

Se determinaron los costos variables del queso cheddar con probióticos y se comparó con los costos del queso cheddar producido actualmente en la planta de lácteos, para conocer si existe alguna diferencia en costos y proponer un precio de venta del nuevo producto.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS SENSORIAL DE ACEPTACIÓN

4.1.1 Apariencia

De acuerdo a los resultados mostrados en el cuadro 2, el panel sensorial no detectó diferencias significativas de apariencia entre los tratamientos, esto significa que los probióticos no ejercieron efecto sobre este atributo, por lo tanto, todos los tratamientos tuvieron la misma aceptación que fue cercana a 4, equivalente a “me gusta” en la escala hedónica.

Sin embargo, de acuerdo al colorflex se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en el valor a^* (cuadro 10) a los 45 días y a los 60 días de maduración del queso, tiempo al que se realizó la evaluación sensorial. Por lo tanto, debido a la alta variabilidad de gustos que tuvieron los panelistas, no se pudieron detectar diferencias de tonalidades que van en la escala verde-rojo del colorflex.

Cuadro 2. Análisis sensorial de apariencia.

TRT	Promedio \pm D. E. ⁽¹⁾	Separación de medias Tukey (P<0.05) ⁽²⁾
TRT 1 (Cultivo iniciador)	4.00 \pm 0.97	A
TRT 2 (C. iniciador + <i>L. acidophilus</i>)	3.88 \pm 0.97	A
TRT 3 (C. iniciador + <i>B. bifidum</i>)	3.69 \pm 0.97	A

⁽¹⁾ Escala hedónica 1 = me disgusta mucho, 5 = me gusta mucho.

⁽²⁾ Tratamientos seguidos de igual letra no son significativamente diferentes (P>0.05).

4.1.2 Aroma

Como se muestra en el cuadro 3, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la aceptación del atributo sensorial aroma, esto se debe a que el panel no fue entrenado para determinar este tipo de diferencias, o que durante la maduración de los quesos la lipólisis ocurrió en las mismas condiciones hidrolizando ácidos grasos libres incapaces de desarrollar intensidades significativas de aroma. A los 60 días de maduración todos los tratamientos del estudio tuvieron la misma aceptación cercana a 4 que en la escala hedónica equivale a “me gusta”.

Cuadro 3. Análisis sensorial de aroma.

TRT	Promedio \pm D. E. ⁽¹⁾	Separación de medias Tukey (P<0.05) ⁽²⁾
TRT 2 (C. iniciador + <i>L. acidophilus</i>)	3.91 \pm 0.87	A
TRT 1 (Cultivo iniciador)	3.91 \pm 0.87	A
TRT 3 (C. iniciador + <i>B. bifidum</i>)	3.66 \pm 0.87	A

⁽¹⁾ Escala hedónica 1 = me disgusta mucho, 5 = me gusta mucho.

⁽²⁾ Tratamientos seguidos de igual letra no son significativamente diferentes (P>0.05).

4.1.3 Textura

Los resultados del cuadro 4 muestran que para el panel sensorial todos los tratamientos fueron igualmente aceptados por su textura cercana a 4 equivalente en la escala hedónica a “me gusta”, es decir, en la evaluación sensorial no se detectaron diferencias de textura; sin embargo, conforme al análisis físico realizado con el instron (cuadro 11) sí hubo diferencias significativas entre tratamientos a los 0, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. Esto ocurrió debido a que los panelistas demostraron tener alta variación de gustos, lo cual les impidió distinguir diferencias de textura entre tratamientos.

Cuadro 4. Análisis sensorial de textura.

TRT	Promedio \pm D. E. ⁽¹⁾	Separación de medias Tukey (P<0.05) ⁽²⁾
TRT 1 (Cultivo iniciador)	3.86 \pm 0.92	A
TRT 2 (C. iniciador + <i>L. acidophilus</i>)	3.80 \pm 0.92	A
TRT 3 (C. iniciador + <i>B. bifidum</i>)	3.66 \pm 0.92	A

⁽¹⁾ Escala hedónica 1 = me disgusta mucho, 5 = me gusta mucho.

⁽²⁾ Tratamientos seguidos de igual letra no son significativamente diferentes (P>0.05).

4.1.4 Acidez

El cuadro 5 muestra que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a la aceptación del atributo sensorial acidez. Esto se debe a que el panel no fue entrenado para determinar este tipo de diferencias lo cual provocó una variación significativa de los datos o debido a que la incorporación de los probióticos se lo hizo en una proporción en que la glicólisis no causó una acidificación significativa de los quesos. A los 60 días de maduración todos los tratamientos del estudio tuvieron la misma aceptación cercana a 3 que en la escala hedónica equivale a “no me gusta ni me disgusta”.

De acuerdo al análisis físico de ATECAL (cuadro 12) se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos a los 45 y 60 días de maduración del queso. Asimismo, el nivel de acidez inicial y final de todos los tratamientos durante los 2 meses del estudio fue significativamente distinto ($p < 0.05$).

Cuadro 5. Análisis sensorial de acidez.

TRT	Promedio \pm D. E. ⁽¹⁾	Separación de medias Tukey ($P < 0.05$) ⁽²⁾
TRT 1 (Cultivo iniciador)	3.80 \pm 0.96	A
TRT 2 (C. iniciador + <i>L. acidophilus</i>)	3.47 \pm 0.96	A
TRT 3 (C. iniciador + <i>B. bifidum</i>)	3.36 \pm 0.96	A

⁽¹⁾ Escala hedónica 1 = me disgusta mucho, 5 = me gusta mucho.

⁽²⁾ Tratamientos seguidos de igual letra no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

4.1.5 Sabor

De acuerdo a los resultados mostrados en el cuadro 6, el panel sensorial no determinó diferencias estadísticas significativas en el sabor entre los tratamientos. A pesar que de acuerdo al análisis físico de ATECAL (cuadro 12) a los 60 días de maduración, el tratamiento 2 obtuvo la mayor acidez, se lo calificó con el mismo sabor que el queso control. Todos los tratamientos fueron igualmente aceptados con una media alrededor de 4 equivalente en la escala hedónica a “me gusta”.

Cuadro 6. Análisis sensorial de sabor.

TRT	Promedio \pm D. E. ⁽¹⁾	Separación de medias Tukey (P<0.05) ⁽²⁾
TRT 1 (Cultivo iniciador)	3.80 \pm 1.01	A
TRT 2 (C. iniciador + <i>L. acidophilus</i>)	3.69 \pm 1.01	A
TRT 3 (C. iniciador + <i>B. bifidum</i>)	3.58 \pm 1.01	A

⁽¹⁾ Escala hedónica 1 = me disgusta mucho, 5 = me gusta mucho.

⁽²⁾ Tratamientos seguidos de igual letra no son significativamente diferentes (P>0.05).

4.1.6 Aceptación General

Los resultados del cuadro 7 muestran que no se encontraron diferencias significativas en la aceptación general como consecuencia de que en todos los atributos evaluados el panel sensorial determinó la misma aceptación para todos los tratamientos. A pesar de la diferencia encontrada en los análisis físicos de color (valor a*), textura y acidez a los 45 días y a los 60 días de maduración, el panel sensorial no pudo detectar cambios en las características sensoriales de los quesos probióticos; esto es beneficioso debido a que se desarrolló un nuevo producto que fue igualmente aceptado al compararlo con el tradicional queso cheddar actualmente producido en la planta de industrias lácteas de Zamorano.

Cuadro 7. Análisis sensorial de aceptación general.

TRT	Promedio \pm D. E. ⁽¹⁾	Separación de medias Tukey (P<0.05) ⁽²⁾
TRT 1 (Cultivo iniciador)	3.86 \pm 0.88	A
TRT 2 (C. iniciador + <i>L. acidophilus</i>)	3.68 \pm 0.88	A
TRT 3 (C. iniciador + <i>B. bifidum</i>)	3.47 \pm 0.88	A

⁽¹⁾ Escala hedónica 1 = me disgusta mucho, 5 = me gusta mucho.

⁽²⁾ Tratamientos seguidos de igual letra no son significativamente diferentes (P>0.05).

4.2 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO

4.2.1 Color

Los resultados del análisis de color muestran que tanto para el valor L* (cuadro 8) como para el valor b* (cuadro 9) no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Por lo tanto, durante los dos meses que duró el estudio se detectó igual claridad en la escala (0-100) e igual tonalidad de color en la escala (azul-amarillo) lo cual es un resultado favorable ya que se asegura uniformidad de color y apariencia entre los tratamientos. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el análisis sensorial de apariencia (cuadro 2) en el que todos los tratamientos fueron igualmente aceptados.

Cuadro 8. Análisis de color valor L*.

TRT	día 0	día 15	día 30	día 45	día 60
	Escala Hunter (L)				
TRT 2 (C. iniciador + <i>L. acidophilus</i>)	74.56 ^{a(x)}	61.95 ^{a(y)}	61.55 ^{a(y)}	62.77 ^{a(y)}	61.35 ^{a(y)}
TRT 1 (Cultivo iniciador)	73.36 ^{a(x)}	67.13 ^{a(y)}	63.35 ^{a(y)}	65.17 ^{a(y)}	65.37 ^{a(y)}
TRT 3 (C. iniciador + <i>B. bifidum</i>)	72.35 ^{a(x)}	65.56 ^{a(x)}	60.99 ^{a(x)}	67.09 ^{a(x)}	67.44 ^{a(x)}
Desviación estándar	± 1.00	± 0.90	± 0.90	± 1.00	± 1.10

^(a) Medias seguidas de igual letra en cada columna no son significativamente diferentes (P>0.05).

^(x-y) Letras diferentes entre paréntesis indican diferencias significativas en el tiempo (P<0.05).

La figura 2 muestra que la claridad de los tratamientos inoculados con *Lactobacillus acidophilus* y el cultivo iniciador disminuyeron significativamente del día 0 al día 15 y a partir de esta medición no se detectaron diferencias en el tiempo hasta finalizar el estudio. Los valores obtenidos para el tratamiento inoculado con *Bifidobacterium bifidum* no fueron significativamente diferentes a través del tiempo.

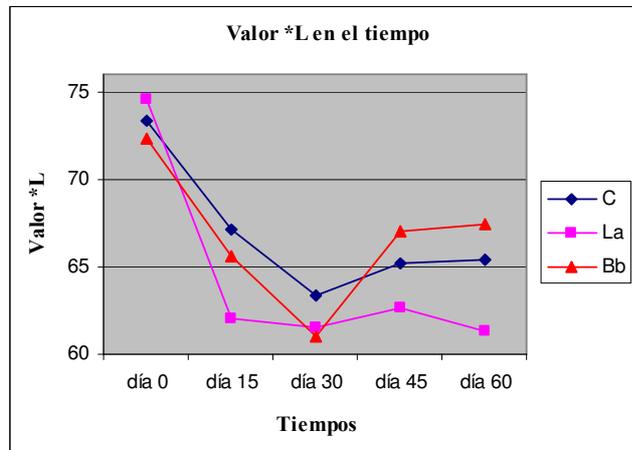


Figura 2. Comportamiento de Valor L* a través del tiempo.

De acuerdo a los resultados del cuadro 9, en la escala b* (azul-amarillo) todos los tratamientos excepto el control tuvieron la misma intensidad de color a través del tiempo, esto debido a que el nivel de grasa a través del tiempo en todos los tratamientos no cambió significativamente.

Cuadro 9. Análisis de color valor b*

TRT	día 0	día 15	día 30	día 45	día 60
	Escala Hunter (b)				
TRT 3 (C. iniciador + <i>B. bifidum</i>)	51.99 ^{a(x)}	52.33 ^{a(x)}	60.93 ^{a(x)}	54.53 ^{a(x)}	54.27 ^{a(x)}
TRT 2 (C. iniciador + <i>L. acidophilus</i>)	47.33 ^{a(x)}	51.82 ^{a(x)}	60.22 ^{a(x)}	56.63 ^{a(x)}	57.29 ^{a(x)}
TRT 1 (Cultivo iniciador)	47.19 ^{a(x)}	54.09 ^{a(xy)}	62.43 ^{a(y)}	60.93 ^{a(xy)}	57.62 ^{a(xy)}
Desviación estándar	± 1.10	± 1.09	± 1.00	± 1.00	± 1.00

^(a) Medias seguidas de igual letra en cada columna no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

^(x-y) Letras diferentes entre paréntesis indican diferencias significativas en el tiempo ($P < 0.05$).

En la figura 3 los valores de b* muestran una tendencia creciente hasta el día 30, a partir del día 30 disminuyen y desde los 45 días de maduración se estabilizan. Sin embargo, ninguna de estas variaciones es significativa a través del tiempo.

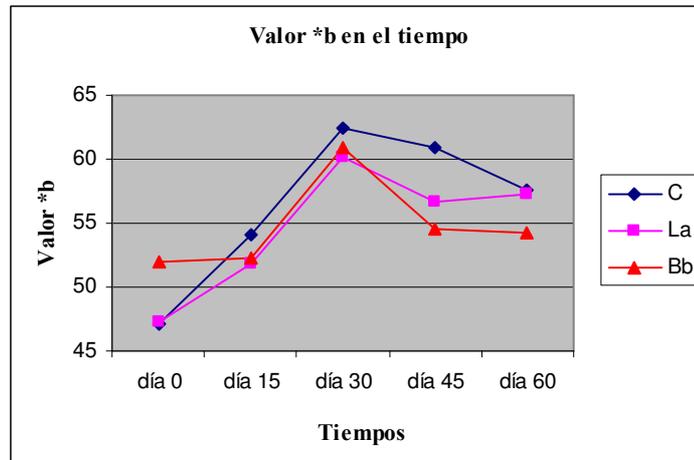


Figura 3. Comportamiento de Valor b* a través del tiempo.

Según los datos mostrados en el cuadro 10, se detectaron diferencias significativas entre tratamientos en el valor a* a los 45 y 60 días de maduración del queso. Al finalizar el estudio, el tratamiento inoculado con *Bifidobacterium bifidum* obtuvo el menor valor diferente al de los otros tratamientos, entre los que no apareció diferencias significativas.

Cuadro 10. Análisis de color valor a*

TRT	día 0	día 15	día 30	día 45	día 60
	Escala Hunter (a)				
TRT 3 (C. iniciador + <i>B. bifidum</i>)	23.75 ^{a(x)}	24.33 ^{a(x)}	25.89 ^{a(x)}	23.49 ^{a(x)}	23.00 ^{a(x)}
TRT 1 (Cultivo iniciador)	20.79 ^{a(x)}	26.33 ^{a(y)}	25.90 ^{a(y)}	25.39 ^{ab(xy)}	26.21 ^{b(y)}
TRT 2 (C. iniciador + <i>L. acidophilus</i>)	22.85 ^{a(x)}	25.24 ^{a(xy)}	28.20 ^{a(y)}	27.82 ^{b(y)}	27.16 ^{b(y)}
Desviación estándar	± 1.03	± 1.10	± 1.01	± 1.10	± 1.09

^(a-b) Medias seguidas de diferente letra en cada columna son significativamente diferentes (P<0.05).

^(x-y) Letras diferentes entre paréntesis indican diferencias significativas en el tiempo (P<0.05).

De acuerdo a la figura 4, solamente en los tratamientos inoculados con *Lactobacillus acidophilus* y el cultivo iniciador hubieron diferencias significativas al comparar sus valores en el tiempo. Para el tratamiento inoculado con *Lactobacillus acidophilus* el valor obtenido a los 0 días de maduración es diferente a los valores obtenidos en los días 30, 45 y 60. Para el tratamiento inoculado con el cultivo iniciador el valor obtenido a los 0 días de maduración es diferente a los valores obtenidos a los 15, 30 y 60 días del estudio.

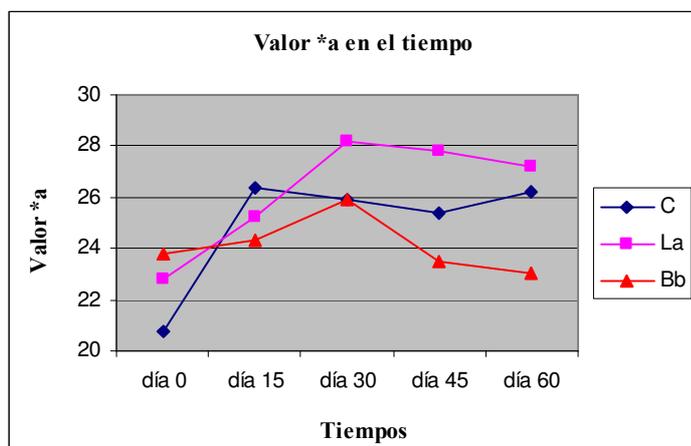


Figura 4. Comportamiento de Valor a* a través del tiempo.

4.2.2 Textura

De acuerdo a los datos presentados en el cuadro 11, sí hubo diferencias significativas entre tratamientos. El tratamiento 1 tuvo la textura más alta con relación a la de los otros dos, esto debido a que el tratamiento inoculado con *Lactobacillus acidophilus* tuvo mayor ATECAL a los 60 días de maduración (cuadro 12) lo cual lo hizo menos resistente a la fuerza de corte en el instron, por lo tanto, se encontró que existe una relación inversamente proporcional entre la fuerza de corte de un queso y su grado de acidez.

No se detectaron diferencias significativas en ningún tratamiento a través del tiempo. Todos los tratamientos tuvieron la misma textura durante el estudio.

Cuadro 11. Análisis de textura.

TRT	día 0	día 15	día 30	día 45	día 60
	[N]				
TRT 1 (Cultivo iniciador)	22.3 ^{a(x)}	22.9 ^{a(x)}	23.7 ^{a(x)}	23.8 ^{a(x)}	24.1 ^{a(x)}
TRT 2 (C. iniciador + <i>L. acidophilus</i>)	18.6 ^{b(x)}	18.5 ^{b(x)}	19.2 ^{b(x)}	19.6 ^{b(x)}	21.6 ^{b(x)}
TRT 3 (C. iniciador + <i>B. bifidum</i>)	18.4 ^{b(x)}	18.9 ^{b(x)}	19.7 ^{b(x)}	20.0 ^{b(x)}	20.4 ^{b(x)}
Desviación estándar	± 0.7	± 0.7	± 0.2	± 0.3	± 0.3

^(a-b) Medias seguidas de diferente letra en cada columna son significativamente diferentes (P<0.05).

^(x) Letras diferentes entre paréntesis indican diferencias significativas en el tiempo (P<0.05).

En la figura 5 se observa el comportamiento de la textura de los quesos a través del tiempo. Los tres tratamientos muestran una tendencia creciente, sin embargo, ninguna de estas variaciones en el tiempo fue significativa para ningún tratamiento. Además, se observa que la curva del tratamiento control es significativamente diferente a la de los tratamientos probióticos cuyos valores no mostraron ser diferentes.

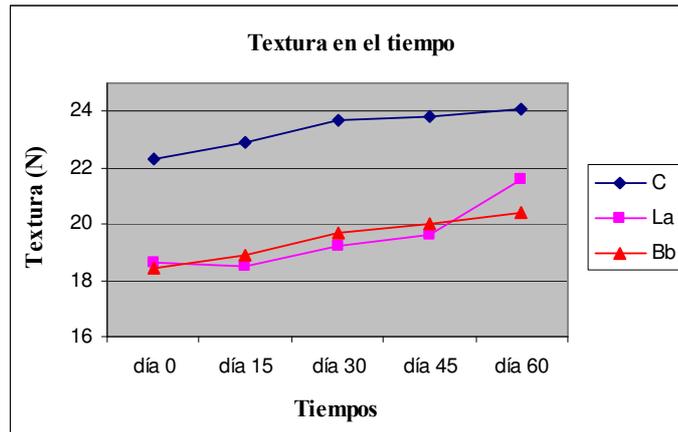


Figura 5. Comportamiento de textura a través del tiempo.

4.2.3 Acidez Titulable

El cuadro 12 muestra que a los 45 y 60 días de maduración se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos. Al finalizar el estudio, el tratamiento con mayor valor de acidez titulable fue el inoculado con *Lactobacillus acidophilus*, esto debido a que esta especie es altamente reconocida como una bacteria acidófila en contraste a *Bifidobacterium bifidum* cuyo potencial de acidificación es menor. Además, se detectó en todos los tratamientos que el nivel de acidificación alcanzado al final del estudio en relación a la acidez en el día 0 de maduración fue significativamente diferente y que cada 30 días hubo un aumento significativo de acidez en todos los tratamientos.

Cuadro 12. Análisis de ATECAL.

TRT	día 0	día 15	día 30	día 45	día 60
	% ATECAL				
TRT 2 (C. iniciador + <i>L. acidophilus</i>)	0.13 ^{a(x)}	0.20 ^{a(x)}	0.33 ^{a(xy)}	0.50 ^{a(yz)}	0.60 ^{a(z)}
TRT 3 (C. iniciador + <i>B. bifidum</i>)	0.13 ^{a(w)}	0.18 ^{a(wx)}	0.25 ^{a(xy)}	0.35 ^{ab(yz)}	0.42 ^{b(z)}
TRT 1 (Cultivo iniciador)	0.12 ^{a(w)}	0.21 ^{a(wx)}	0.26 ^{a(xy)}	0.34 ^{b(y)}	0.39 ^{b(z)}
Desviación estándar	± 0.02	± 0.02	± 0.02	± 0.06	± 0.06

^(a-b) Medias seguidas de diferente letra en cada columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

^(x-z) Letras diferentes entre paréntesis indican diferencias significativas en el tiempo ($P < 0.05$).

De acuerdo a la figura 6 a los 60 días de maduración se observa que la curva del control es significativamente distinta a los valores del tratamiento inoculado con *Lactobacillus acidophilus*. Para los 3 tratamientos los valores obtenidos a los 0 y 15 días de maduración son significativamente diferentes a los valores obtenidos a los 45, y 60 días del estudio.

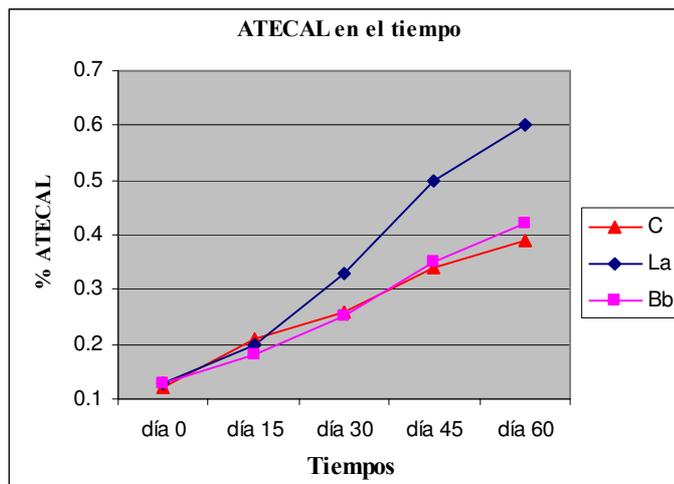


Figura 6. Comportamiento de ATECAL a través del tiempo.

4.2.4 Grasa

De acuerdo a los datos presentados en el cuadro 13, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos. Además, en ningún tratamiento se encontraron diferencias significativas a través del tiempo, por lo tanto, durante los 2 meses del estudio todos los tratamientos mantuvieron los requerimientos del queso cheddar (alrededor de 30 % de grasa). Estos resultados justifican lo obtenido en la escala b* (azul-amarillo) del colorflex, donde los tratamientos inoculados con los probióticos tuvieron la misma intensidad de color a través del tiempo.

Cuadro 13. Análisis de grasa.

TRT	día 0	día 15	día 30	día 45	día 60
	% de Grasa				
TRT 3 (C. iniciador + <i>B. bifidum</i>)	30.44 ^{a(x)}	30.22 ^{a(x)}	29.50 ^{a(x)}	29.16 ^{a(x)}	29.16 ^{a(x)}
TRT 1 (Cultivo iniciador)	29.16 ^{a(x)}	29.16 ^{a(x)}	29.00 ^{a(x)}	29.13 ^{a(x)}	29.00 ^{a(x)}
TRT 2 (C. iniciador + <i>L. acidophilus</i>)	29.00 ^{a(x)}	29.00 ^{a(x)}	28.83 ^{a(x)}	27.50 ^{a(x)}	27.00 ^{a(x)}
Desviación estándar	± 0.08	± 0.09	± 0.32	± 0.08	± 0.07

^(a) Medias seguidas de igual letra en cada columna no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

^(x) Letras iguales entre paréntesis indican que no hubo diferencias significativas en el tiempo ($P > 0.05$).

La figura 7 ilustra el comportamiento de la grasa a través de los 60 días de maduración. Se observa una tendencia decreciente del nivel de grasa conforme aumenta el tiempo, sin embargo, ninguna de estas variaciones fue significativa para ningún tratamiento.

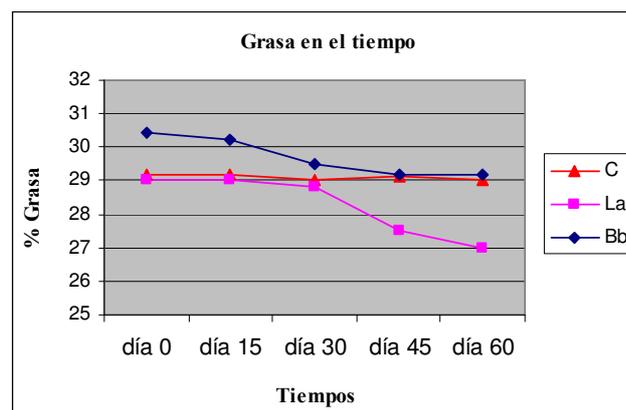


Figura 7. Comportamiento del nivel de grasa a través del tiempo.

4.3 CORRELACIONES

Se obtuvieron correlaciones entre los valores de los análisis físico-químicos obtenidos a los 60 días de maduración, con los valores obtenidos en la evaluación sensorial. Los resultados muestran el coeficiente de correlación de Pearson para 9 valores (3 tratamientos y 3 repeticiones).

4.3.1 ATECAL – Acidez

Se encontró que existe una correlación negativa alta de - 0.946 entre la ATECAL (0.47 ± 0.06) y el atributo sensorial de acidez (3.54 ± 0.96), esto significa que entre mayor sea la ATECAL del queso, la acidez recibirá menor calificación en la evaluación sensorial de aceptación. Por lo tanto, los consumidores prefieren un queso con menor acidez en relación a un queso con una ATECAL elevada.

4.3.2 Color – Apariencia

La correlación negativa alta de - 0.891 encontrada entre el valor L^* (64.72 ± 1.10) de color y el atributo sensorial de apariencia (3.85 ± 0.97), indica que entre menos claridad tenga el color del queso cheddar, mayor será la calificación de apariencia que obtendrá en la evaluación sensorial.

Mediante el análisis estadístico de correlación entre el valor a^* (25.46 ± 1.09) de color y la apariencia (3.85 ± 0.97) se encontró una correlación positiva media de 0.663, por lo tanto, los valores de la escala a^* (verde-rojo) del colorflex no afectaron significativamente la aceptación de apariencia.

La correlación positiva alta de 0.8 encontrada entre el valor b^* (56.39 ± 1.00) de color y el atributo sensorial de apariencia (3.85 ± 0.97) indica que entre mayor sea el valor de b^* , mayor será la calificación de apariencia que se obtendrá en la evaluación sensorial.

4.3.3 Textura – Textura (Aceptación)

Se determinó la correlación existente entre los resultados obtenidos en el instron (22.0 ± 0.3) y los resultados obtenidos en el análisis de aceptación (3.77 ± 0.92). La correlación positiva alta de 0.847 indica que entre mayor sea la fuerza medida por el instron mayor será la aceptación que tendrá este atributo en la evaluación sensorial.

4.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

4.4.1 Conteo de coliformes totales

Se analizaron coliformes totales a través del tiempo a los 0, 15, 30, 45 y 60 días de maduración del queso cheddar (Cuadro 14). Los resultados de este análisis muestran que no se detectaron diferencias significativas tanto entre los tratamientos como a través del tiempo.

Cuadro 14. Conteo de coliformes totales.

TRT	día 0	día 15	día 30	día 45	día 60	Máximo permitido por ley
	UFC/g					
TRT 3 (C. iniciador + <i>B. bifidum</i>)	11.00 ^{a(x)}	14.00 ^{a(x)}	14.00 ^{a(x)}	13.70 ^{a(x)}	11.00 ^{a(x)}	10
TRT 1 (Cultivo iniciador)	14.33 ^{a(x)}	11.66 ^{a(x)}	14.00 ^{a(x)}	16.00 ^{a(x)}	9.33 ^{a(x)}	10
TRT 2 (C. iniciador + <i>L. acidophilus</i>)	14.00 ^{a(x)}	14.00 ^{a(x)}	9.33 ^{a(x)}	10.00 ^{a(x)}	8.00 ^{a(x)}	10
Desviación estándar	± 1.10	± 0.90	± 2.20	± 2.10	± 1.00	± 0.00

^(a) Medias seguidas de igual letra en cada columna no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

^(x) Letras iguales entre paréntesis indican que no hubo diferencias significativas en el tiempo ($P > 0.05$).

La figura 8 muestra el comportamiento microbiológico de coliformes totales de los tratamientos a través del tiempo.

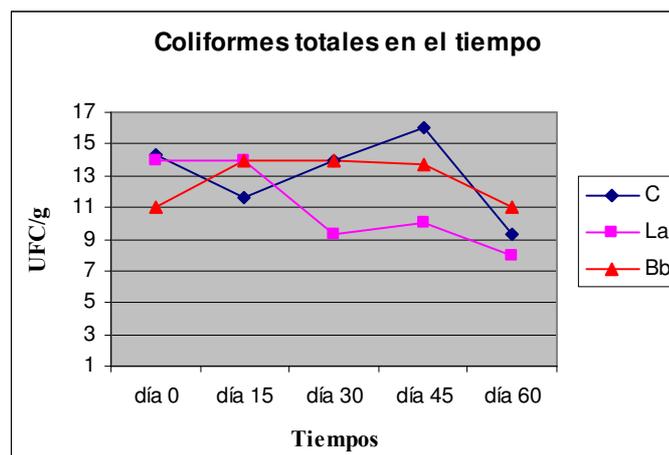


Figura 8. Conteo de coliformes totales a través del tiempo.

4.5 ANÁLISIS DE COSTOS VARIABLES

El cuadro 15 muestra que el costo variable de producción del queso cheddar probiótico en su presentación de 440 g es de L. 42.10, mientras que el queso cheddar actualmente elaborado en la planta de lácteos en su misma presentación tiene un costo variable de L. 41.49, lo cual es 1.5 % más costoso. Actualmente, el precio de venta del queso cheddar sin probióticos es de L. 62.7 lo cual representa el 51 % de ganancia por unidad vendida. Se sugiere un precio de venta de L. 64.8 para obtener una ganancia de 54 % por unidad vendida.

Cuadro 15. Costos variables queso cheddar probiótico 440 g.

Insumo	Cantidad	Unidad	Costo Unitario(L)	Costo Total (L)
Leche (2.9 %)	4.88	kg	7.80	38.13
Leche descremada en polvo	0.29	g	0.08	0.02
Cultivo iniciador RA21	0.11	g	17.20	1.93
Cultivo iniciador LHB02	0.03	g	17.20	0.67
Cultivo probiótico BB12 o LA5	0.02	g	25.00	0.61
Sal	0.02	g	0.00	0.00
Colorante para quesos	0.56	ml	0.32	0.18
Cuajo Líquido	0.48	ml	0.10	0.05
Cloruro de calcio	0.97	ml	0.02	0.02
Bolsa plástica	1.00	unidad	0.48	0.48
Costo Total				42.10

5. CONCLUSIONES

- Al evaluar los atributos apariencia, aroma, textura, acidez, sabor y aceptación general mediante un análisis sensorial de aceptación se determinó que los tratamientos inoculados con los microorganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, no presentaron diferencias significativas con respecto al control.
- Al comparar los tratamientos, la incorporación de *Lactobacillus acidophilus* incrementó el nivel de acidez a los 45 y 60 días de maduración y disminuyó la textura de los quesos ($p < 0.05$). Al finalizar el estudio, el tratamiento inoculado con *Lactobacillus acidophilus* obtuvo mayor ATECAL mientras que el tratamiento inoculado con el cultivo iniciador obtuvo mayor valor de textura ($p < 0.05$).
- La incorporación de los probióticos incrementó el nivel de acidez entre el día 0 y 60 del estudio e incrementó el valor a^* de color en el tratamiento inoculado con *Lactobacillus acidophilus* a partir de los 30 días de maduración del queso.
- Uno de los factores a evaluar para determinar el nivel de maduración de un queso es su porcentaje de acidez, a mayor tiempo de maduración, el queso cheddar probiótico tendrá mayor acidez y menor aceptación de los consumidores.
- La incorporación de los probióticos aumentó 1.5 % los costos variables del queso cheddar en su presentación de 440 g lo que significa que para la planta de lácteos de Zamorano su producción es económicamente viable.

6. RECOMENDACIONES

- Entrenar un panel sensorial capacitado para detectar diferencias en los atributos sensoriales de productos lácteos.
- Evaluar el efecto sobre las características físico-químicas y sensoriales de queso cheddar al incorporar el probiótico *Lactobacillus acidophilus* en lugar de *Lactobacillus helveticus*.
- Incorporar el probiótico *Lactobacillus acidophilus* para reducir el periodo de maduración de queso cheddar al aumentar su nivel de acidez y lograr mayor rotación de inventario en la planta de lácteos.
- Realizar un análisis microbiológico detallado que determine la viabilidad de los probióticos a través del tiempo usando medios de cultivo selectivos Agar Clostridium Reforzado con bromocresol verde y clindamicina (ARBVC) para *Lactobacillus acidophilus* y Agar Clostridium Reforzado con anilina azul y dicloxacilina (ARAAD) para *Bifidobacterium bifidum*.

7. BIBLIOGRAFÍA

Castro, A; Porras, V. 2003. La protección de leche materna a los recién nacidos. Una visión actualizada. Revista Mejicana de Pediatría. 70: 27-31.

Castro, A; Rovetto, C. 2006. Probióticos. Utilidad clínica. (en línea). Consultado el 8 de agosto del 2008.

Disponible en: <http://colombiamedica.univalle.edu.co/Vol37No4/pdf/v37n4a08.pdf>.

Codex Alimentario. 2001. Consulta de Expertos. (en línea). Consultado el 25 de mayo del 2008. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp.

Dinakar, P. 1994. Cheese description. (en línea). Consultado el 9 de agosto del 2008. Disponible en: <http://www.cheese.com/Description.asp.CHEDDAR>.

Estrada, D. 2007. Efecto de los probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* en las propiedades físico-químicas y sensoriales de yogur de fresa Zamorano. Conclusiones. Tesis. Lic. Ing. Agroindustria Alimentaria. HN. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 35 p.

Gibson, GR. 2002. British Journal of Nutrition. Probiotics as modulators of the gut flora. 88 (1). (en línea). Consultado el 25 de abril del 2008. Disponible en: <http://www.eufic.org/article/es/artid/perspectivas-probioticos/>

Mayo Foundation for Medical Education and Research. 2008. Lactobacillus acidophilus. (en línea). Consultado el 26 de abril del 2008. Disponible en: http://www.mayoclinic.com/health/lactobacillus/NS_patient-acidophilus.

Ong, L. 2005. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium sp.* International Dairy Journal 17 (2007) 67–78. (en línea). Consultado el 30 de agosto del 2008. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=Article.

Ong, L; Henriksson, A; Malik, KA. 2007. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium sp.* International Dairy Journal 17 (2007) 937–945. (en línea). Consultado el 30 de agosto del 2008. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=Article.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud. (FAO/OMS). 2001. Consulta de Expertos. AR. (en línea). Consultado el 25 de mayo del 2008.

Disponible en: http://www.fao.org/ag/agn/agns/micro_probiotics_es.asp.

Osorio, L. 2007. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Curso de Procesamiento de productos lácteos. Elaboración de quesos.

Parvez, S; Mali, K.A. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology. KR. 100 (2006) 1171–1185. (en línea). Consultado el 28 de agosto del 2008. Disponible en: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>

Revilla, A. 1995. Escuela Agrícola Panamericana. Ciencia y Tecnología de la Leche: Pruebas químicas.

Singh, T; Drake, M. 2003. Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety. Flavor of Cheddar Cheese: A Chemical and Sensory Perspective. 2 (5). (en línea). Consultado el 10 de agosto del 2008. Disponible en: <http://www.members.ift.org/NR/rdonlyres/20702.pdf>.

Taranto, M; Medicini M. 2005. Revista Química Viva (1). (en línea). Consultado el 20 de agosto del 2008. Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v4n1/taranto.htm>.

Thomas, A. 2005. Efecto de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* en las propiedades físico-químicas y sensoriales de yogur. Revisión de literatura. Tesis Lic. Ing. Agroindustria Alimentaria. HN. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 40 p.

Wikipedia Foundation Inc. 2008. *Lactobacillus acidophilus*. (en línea). Consultado el 26 de abril del 2008. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Especial:Buscar?search=Lactobacillus+acidophilus>

8. ANEXOS

Anexo 1. Bacterias ácido lácticas comúnmente usadas como probióticos.

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. delbrueckii</i> <i>ssp. (bulgaricus)</i>	<i>B. animalis</i>		<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. brevis</i>			

Microflora	Acciones asociadas	Referencia
<i>Bifidobacteria especies</i>	Reduce la incidencia de enterocolitis neonatal	Caplan and Jilling (2000)
<i>Enterococcus faecium</i>	Disminuye la duración de diarrea producida por gastroenteritis	Marteau et al. (2001)
<i>Lactobacillus</i>	Reduce la inflamación de la bolsa ileal.	Vanderhoof (2000)
	Mejora la digestión de la lactosa. Disminuye la diarrea y síntomas por intolerancia a la lactosa	Marteau et al. (2001)
	Mejora la función del sistema inmunológico	Schultz and Sartor (2000)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Disminución significativa de diarrea en pacientes que reciben radiación pélvica.	Marteau et al. (2001)
	Previene la infección urogenital e invasión de patógenos como: <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas</i>	Sanders (2001)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Disminuye los niveles de colesterol	Ouwehand et al. (2002)
	Reduce la inflamación del intestino y enterocolitis	Schultz and Sartor (2000)
	Reduce el dolor, flatulencia, hinchazón y estreñimiento producido por el síndrome de colon irritable.	Vanderhoof (2000)
	Efecto positivo en la inmunidad de niños con VIH +	Walker (2000)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Acorta la duración de gastroenteritis	Marteau et al. (2001)
	Disminuye la duración de diarrea	Shornikova et al. (1997)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Un tratamiento controlado mejora la inmunidad celular	Tomioka et al. (1992)
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Suprime la invasión de <i>Helicobacter pylori</i> por la secreción de ácido láctico.	Aiba et al. (1998)
<i>Saccharomyces boulardii (levadura)</i>	Disminuye la duración de diarrea asociada al uso de antibióticos	Marteau et al. (2001)
	Acorta la duración de gastroenteritis	Marteau et al. (2001)
	Disminuye los síntomas de colon irritable	Marteau et al. (2001)

Fuente: The Society for Applied Microbiology. Journal of Applied Microbiology 100 (2006) 1171–118.

Anexo 2. Cálculo de cantidad de probiótico utilizado en cada tratamiento.**Fórmula:**

(Concentración inicial) (ml de probiótico) = (Concentración final) (ml de leche en la quesera).

Probiótico	Concentración inicial (UFC/ml)	Concentración final en quesera (UFC/ml)	Cantidad a usar para 200 kg de leche
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	8.00×10^8	1000	0.25 ml
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1.19×10^9	1000	0.17 ml

Anexo 3. Método utilizado para la prueba de acidez.

La acidez se midió basándose en el método oficial para determinar acidez en quesos AOAC (33.7.14) (ANEXO 3).

Materiales

- 5 g de queso cheddar.
- Agua destilada
- Fenolftaleína.
- NaOH al 0.1 N.

Equipo

- Taza de color blanco.
- Pipeta de 10 ml.
- Bulbo.
- Equipo de titulación.
- Stomacker

Procedimiento

- Pesar 5 g de queso y 30 ml de agua destilada.
- Meter al stomacker por un min.
- Tomar 9 ml del queso diluido y colocar en la taza blanca.
- Añadir tres gotas de fenolftaleína.
- Titular con solución de 0.1 N de hidróxido de sodio (NaOH).
- El volumen de NaOH indicado en el titulador es la acidez titulable de la muestra. Cuando se está añadiendo la solución alcalina se debe agitar constantemente.

Anexo 4. Hoja de evaluación sensorial de aceptación de queso cheddar**Evaluación Sensorial
Queso Cheddar Probiótico**

Número de Muestra: _____

Encierre en un círculo su evaluación para cada una de las 6 características.

Apariencia				
1	2	3	4	5
Me disgusta mucho	No me gusta	No me gusta ni me disgusta	Me gusta	Me gusta mucho
Aroma				
1	2	3	4	5
Me disgusta mucho	No me gusta	No me gusta ni me disgusta	Me gusta	Me gusta mucho
Textura				
1	2	3	4	5
Me disgusta mucho	No me gusta	No me gusta ni me disgusta	Me gusta	Me gusta mucho
Acidez				
1	2	3	4	5
Me disgusta mucho	No me gusta	No me gusta ni me disgusta	Me gusta	Me gusta mucho
Sabor				
1	2	3	4	5
Me disgusta mucho	No me gusta	No me gusta ni me disgusta	Me gusta	Me gusta mucho
Aceptación General				
1	2	3	4	5
Me disgusta mucho	No me gusta	No me gusta ni me disgusta	Me gusta	Me gusta mucho

Comentarios:

.....