

**Universidad Nacional de Tucumán**  
**Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L.**



**Estudio de la incidencia de la microbiología de la leche caprina  
en la inocuidad y en la diferenciación según lugar de  
procedencia de los productos**

**Lic. Nancy Alejandra Torres**

**Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas**

**Directora: Dra. Mónica Chavez**

**Codirectora: Dra. Roxana Medina**

**2021**



FACULTAD DE CIENCIAS  
**NATURALES**  
E INSTITUTO MIGUEL LILLO  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN

**Estudio de la incidencia de la microbiología de la leche caprina  
en la inocuidad y en la diferenciación según lugar de  
procedencia de los productos**

**Lic. Nancy Alejandra Torres**

**Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas**

**Comision de Supervisión**

Directora: Dra. Mónica Chavez

Codirectora: Dra. Roxana Medina

Dra. Carina Audisio

Dra. Gabriela Zárate

Dedico esta tesis a mi mamá, quien en el transcurso de la misma me acompaño,  
alegrándose con cada avance, apoyándome en cada paso.  
Gracias por cada palabra que me dijiste, hoy las tengo presente. Gracias por el ejemplo  
constante que siempre fuiste.

## Agradecimientos

A mi querida familia...Mis padres, por haber sido siempre ejemplo de constancia y amor por el trabajo, más allá del esfuerzo o las dificultades. A mi esposo, Alexis, por su confianza en mí, por alentarme y acompañarme. A mis cuatro niños, que son mi inspiración, refugio de toda alegría. A mi suegra, Angela, por su apoyo en el transcurso de esta tesis.

A mi directora Dra. Mónica Chavez por darme el impulso necesario en este camino tan lindo de la investigación, por abrirme la cabeza y ayudarme a ver las cosas de manera integrada.

A mi codirectora, Dra. Roxana Medina, por la tranquilidad y confianza que me transmitió, por estar cada vez que la necesité, transmitiendo sus conocimientos y brindando su tiempo.

A la comisión asesora Dra. Carina Audisio y Dra. Gabriela Zarate, por sus aportes, sugerencias y correcciones tan útiles para mejorar la tesis.

Al grupo de trabajo al cual pertenezco, del cual me siento tan orgullosa: Virginia Sanchez, Silvia Orosco, Nicolás Lopez, Marcela Fili y Lourdes del Castillo, sin cada uno de ellos no hubiera sido posible este trabajo, gracias por haber estado tan presentes en el transcurso de esta tesis, desde el trabajo, las ideas, los aportes y las sonrisas compartidas.

Por transmitir tan generosamente sus conocimientos: Dr. Guillermo Shiuffe, por su asesoramiento y recomendaciones en todos los aspectos referidos a proteólisis. Dra. Marta Galvan, por su colaboración en todos los aspectos moleculares de este trabajo. Msc. Livia Negri, por su colaboración y asesoramiento en las determinaciones de compuestos volátiles.

A mi querida amiga Caro, por sus consejos y ánimos en momentos difíciles.

Al INTA, institución de la cual siento tanto orgullo, por brindarme el lugar de trabajo, la financiación y el tiempo para poder realizar el doctorado.

## Resumen

La producción de leche caprina es relevante en las familias rurales del NOA y es poca la información sobre la calidad higiénica y microbiota de la misma. El objetivo de la tesis fue estudiar la microbiología de la leche y de productos lácteos (quesos y leche fluida) caprinos en aspectos de la inocuidad y procedencia territorial.

Se identificaron y cuantificaron indicadores biológicos de calidad higiénica en sistemas productivos lecheros de tres regiones de Salta: Valles Áridos, Valles Templados y Quebrada. Los indicadores propuestos fueron: bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales (CT) y número de células somáticas. Estos fueron aplicados sobre 400 muestras de leche y analizados según factores productivos: zona, biotipo, tercio de lactancia, tipo de ordeño. Se propuso como valor límite de CT en leche cruda caprina 416 ufc/mL.

Se aplicaron estos microorganismos indicadores para cuantificar eficiencia de tratamiento térmico y realizar el estudio de vida útil de leche fluida, según tratamiento térmico: Pasteurización baja, Pasteurización media (PMA) y Alta temperatura corto tiempo (ATCT). Se ajustó un modelo matemático para estimar vida útil, resultando en 2 y 15,5 días para PMA y ATCT respectivamente.

Se realizó la caracterización microbiológica de la leche caprina destinada a la producción de quesos desde su inocuidad y potencial tecnológico. Las muestras se tomaron de tres tambos de cada uno de los ecosistemas: Valle de Amblayo (Amb) y Valle de Lerma (VL). Se aislaron 535 bacterias, de las cuales 265 resultaron ser bacterias lácticas (BAL). Según el potencial tecnológico, se seleccionaron 60 BAL (30 de Amb y 30 de VL) sobre las cuales se realizaron pruebas de inocuidad. Luego, se seleccionaron 40 BAL inocuas, 12 de Amb y 28 VL; estas pertenecieron a dos géneros: *Enterococcus* y *Lactococcus* (pruebas moleculares ARNr-16s y RAPD-PCR)

Se formularon dos fermentos, cada uno empleando cepas propias de la zona de origen, estas fueron seleccionadas en base a las pruebas tecnológicas: pH, acidez, crecimiento microbiano, actividades proteolítica y lipolítica. Cada fermento estuvo constituido por *E. faecium* y *E. durans*, dos cepas por fermento, una de cada especie. Estos fermentos fueron utilizados para elaborar quesos de pasta semidura bajo

condiciones controladas: control (queso sin fermento), queso elaborado con fermento Amb y queso elaborados con fermento VL. Se realizaron seguimientos microbiológicos, de pH y acidez durante elaboración y maduración (40días). Se evaluaron proteólisis (urea page, perfil nitrogenado y HPLC), lipólisis (perfil de ácidos grasos) y perfil de volátiles (cromatografía gaseosa GC-Masa) a 0 y 40 días de maduración. Se observó que durante la maduración las poblaciones BAL incrementaron y CT disminuyeron, evidenciando el efecto inhibitorio por parte de los fermentos sobre CT. Los quesos VL mostraron mayor concentración de ácidos grasos libres totales destacándose los ácidos oleico, palmítico, mirístico y cáprico. Los quesos Amb se caracterizaron por la presencia de compuestos volátiles como cetonas, ésteres, aldehídos y alcoholes.

## Summary

Goat milk production is relevant in rural NOA families and little information is available on the hygienic and microbiotic quality of goat milk. The objective of the thesis was to study the microbiology of goat milk and dairy products (cheeses and fluid milk) in the aspects of safety and geographic origin. Biological indicators of hygienic quality were identified and quantified in dairy production systems in three regions of Salta: Arid Valleys, Template Valleys and Gorge. Proposed indicators were: mesophilic aerobic bacteria, total coliforms (TC) and somatic cell count (SCC). These were used on 400 milk samples and analyzed according to productive factors: zone, biotype, lactation period, milking systems. 416 cfu/mL was obtained and proposed as a maximum value of TC in raw goat milk. Else, these indicator microorganisms were used to quantify heat treatment efficiency and to carry out shelf-life study of fluid milk, according to heat treatment: Low pasteurization (LW), medium pasteurization (PMA) and high temperature short time (HTST). A mathematical model was adjusted to estimate shelf-life, resulting in 2 and 15.5 days for PMA and ATCT respectively. Microbiological characterization of goat milk destined to cheese production was carried out from its innocuousness and technological potential. Samples were taken from three dairy goats systems of each of the ecosystems: Valle de Amblayo (Amb) and Valle de Lerma (VL). 535 bacteria were isolated, of which 265 were lactic bacteria (BAL). According to the technological potential, 60 BAL were selected (30 from Amb and 30 from VL) on which innocuousness tests were performed. Then, 40 innocuous BAL were selected, 12 from Amb and 28 from VL; these belonged to two types: *Enterococcus* and *Lactococcus* (molecular tests ARNr-16s and RAPD-PCR). Two ferments were formulated, each using strains specific to the area of origin. These were selected based on technological tests: pH, acidity, microbial growth, proteolytic and lipolytic activities. Each ferment consisted of *E. faecium* and *E. durans*, two strains per ferment, one of each species. These ferments were used to make semi-hard cheeses under controlled conditions in pilot plan of INTA: control (cheese without ferment), cheese made with Amb ferment and cheese made with VL ferment. Microbiological, pH and acidity monitoring was carried out during production and maturation (40 days). Proteolysis (urea page, nitrogen profile and

HPLC), lipolysis (fatty acid profile) and volatiles profile (GC-Mass gas chromatography) were evaluated at 0 and 40 days of maturation. It was observed that during cheese maturation BAL populations increased and CT populations decreased, evidencing the inhibitory effect of the ferments on CT. VL cheeses showed the highest concentration of total free fatty acids, with oleic, palmitic, myristic and capric acids standing out. Amb cheeses were characterized by the presence of volatile compounds such as ketones, esters, aldehydes and alcohols.



## Índice General

Resumen.....	
Summary .....	
Abreviaturas .....	
Índice de contenidos.....	
Introducción General .....	1
Objetivo General .....	9
Objetivos Específicos .....	9
Capítulo Nº 1: Indicadores de calidad higiénica en leche caprina.....	10
1.1 Introducción .....	10
1.2 Objetivo .....	11
1.3 Materiales y Métodos .....	12
1.3.1 Sitio de Estudio .....	12
1.3.2 Toma de muestras .....	15
1.3.3 Calidad de la leche caprina .....	17
1.3.3.1 Calidad higiénica .....	17
<i>Calidad microbiológica</i> .....	17
<i>Calidad sanitaria</i> .....	18
1.3.3.2 Calidad físico-química.....	18
1.3.3.3 Análisis estadístico .....	20
1.4 Resultados y Discusión .....	22
1.4.1 Calidad de leche caprina .....	22
1.4.1.1 Calidad higiénica .....	22
<i>Análisis de la asociación estadística entre RAM y CT</i> .....	31
1.4.1.2 Calidad fisicoquímicas de la leche caprina.....	32
Análisis de la relación RAM y Acidez .....	35
<i>Relación entre parámetros fisicoquímicos, el período de lactancia y el tipo de ordeño</i> .....	35
1.5 Conclusiones.....	37
Capítulo Nº 2: Indicadores microbiológicos de eficiencia de tratamientos térmicos y de vida útil de leche caprina y sus productos.....	38
2.1 Introducción .....	38
2.1.1 Calidad de la leche .....	38
2.1.2 Indicadores microbiológicos .....	38
2.1.2.1 Grupos y microorganismos indicadores.....	39
2.1.3 Barreras tecnológicas .....	41
2.1.3.1 Tratamientos térmicos.....	42
<i>Termización</i> .....	42
<i>Pasteurización</i> .....	42
A.1- <i>Pasteurización baja (LTLT: low temperature - long time)</i> .....	43
A.2- <i>Pasteurización alta (HTST: high temperature-short time)</i> .....	43
<i>Efectos microbiológicos de la pasteurización</i> .....	43
<i>Ultra alta temperatura (UHT)</i> .....	44
2.1.4 Estabilidad térmica en la leche de cabra.....	44
2.1.5 Vida útil.....	45
2.2 Objetivo .....	45
2.3 Materiales y Métodos.....	46
2.3.1 Muestras.....	46
2.3.2 Tratamientos térmicos .....	46

2.3.2.1	Pasteurización baja (PB) .....	47
2.3.2.2	Pasteurización media (PM).....	47
2.3.2.3	Pasteurización alta temperatura corto tiempo (ATCT) .....	48
2.3.3	Eficiencia del tratamiento térmico.....	49
2.3.4	Vida útil.....	50
2.3.4.1	Vida útil de la leche obtenida mediante PM.....	51
2.3.4.2	Vida útil de la leche obtenida mediante pasteurización ATCT.....	51
2.3.5	Determinaciones microbiológicas, físicas y químicas.....	51
2.3.5.1	Análisis fisicoquímico .....	51
2.3.5.2	Análisis microbiológicos.....	53
2.3.6	Análisis estadísticos.....	55
2.4	Resultados y Discusión.....	56
2.4.1	Características fisicoquímica de la leche caprina cruda.....	56
2.4.2	Efecto de los tratamientos térmicos sobre los microorganismos indicadores.....	57
2.4.3	Vida útil .....	62
2.4.3.1	Pasteurización Media.....	62
2.4.4	Persistencia de microorganismos patógenos específicos, según tratamiento térmico aplicado. ....	66
2.4.5	Pasteurización ATCT.....	67
2.5	Conclusiones.....	70
Capítulo Nº3: Potencial de la microbiota láctica natural de la leche caprina como indicador de denominación de origen (D.O.).....		71
3. 1.	Introducción.....	71
3.2	Objetivo.....	73
3.3	Materiales y métodos.....	73
3.3.1	Lugar de muestreo .....	73
3.3.2	Muestras.....	74
3.3.3	Análisis de calidad de la leche caprina .....	75
3.3.3.1	Calidad higiénica.....	75
3.3.3.2	Calidad fisicoquímica.....	76
3.3.4	Análisis Microbiológicos.....	76
3.3.4.1	Aislamiento de bacterias lácticas.....	76
3.3.4.2	Identificación de bacterias lácticas.....	77
3.3.4.3	Conservación de Bacterias lácticas.....	78
3.3.4.4	Caracterización tecnológica (Etapa exploratoria) .....	78
3.3.4.5	Pruebas de Inocuidad .....	81
3.3.5	Caracterización molecular y tecnológica de las cepas.....	82
3.3.5.1	Caracterización molecular .....	82
3.3.5.2	Diversidad genética de las cepas (perfiles RAPD-PCR) .....	84
3.3.6	Susceptibilidad a antibióticos.....	86
3.3.7	Actividad Antimicrobiana.....	88
3.3.8	Formulación de fermentos.....	89
3.3.9.	Análisis estadístico.....	90
3.4	Resultados y Discusión.....	92
3.4.1	Caracterización microbiológica, sanitaria y fisicoquímica de la leche de cabra	92
3.4.2	Análisis Microbiológicos.....	95
3.4.2.1	Aislamiento e identificación de bacterias lácticas .....	95
3.4.2.2	Pruebas Tecnológicas (Etapa exploratoria) .....	95
3.4.3	Análisis de Inocuidad.....	101
3.4.4	Caracterización molecular.....	103

3.4.4.1	Identificación molecular de bacterias lácticas.....	103
3.4.4.2	Diversidad genética.....	105
3.4.5	Susceptibilidad de las Bacterias lácticas frente a diversos antibiótico.....	109
3.4.5.1	Características tecnológicas de las cepas según zona de procedencia.....	118
3.4.5.2	Análisis del espectro antimicrobiano.....	120
3.4.6	Diseño del Fermento Láctico .....	121
3.4.6.1	Análisis de los fermentos.....	123
3.4.7	Selección del fermento.....	129
3.5	Conclusiones.....	133
Capítulo Nº4: Cepas lácticas de leche caprina con aptitud para transformación industrial.....		135
4.1	Introducción.....	135
4.2	Objetivo.....	138
4.3	Materiales y métodos.....	138
4.3.1	Elaboración de los fermentos lácteos.....	138
4.3.2	Elaboración de queso caprino.....	139
4.3.3.	Toma de muestras .....	141
4.3.4.	Análisis microbiológicos.....	141
4.3.5	Análisis fisicoquímico y composición global de los quesos.....	142
4.3.5.1	Parámetros fisicoquímicos. ....	142
4.3.5.2	<i>Composición global</i> .....	143
4.3.6	Procesos asociados a la maduración de quesos .....	145
4.3.6.1	Proteólisis .....	145
4.3.6.2	Lipólisis .....	151
4.3.6.3	Compuestos de aroma .....	152
	<i>Nariz electrónica</i> .....	152
	<i>Compuestos volátiles</i> .....	153
4.3.7	Rendimiento quesero.....	154
4.3.8	Análisis estadístico .....	154
4.4	Resultados y Discusión .....	155
4.4.1	Calidad física, química y microbiológica de la leche caprina utilizada en la elaboración de quesos .....	155
4.4.2	Procesos de elaboración de quesos caprinos.....	157
4.4.2.1	Evolución de la microbiota durante el proceso de elaboración de los quesos .....	157
4.4.2.2	Cambios del pH durante el proceso de elaboración de quesos caprinos .....	162
4.4.3	Caracterización de los quesos de cabra.....	164
4.4.3.1	Caracterización fisicoquímica y composición global de los quesos .....	164
4.4.4	Procesos asociados a la maduración de quesos .....	167
4.4.4.1	Proteólisis .....	167
4.4.4.2	Lipólisis .....	175
4.4.4.4	Compuestos volátiles .....	181
	<i>Nariz electrónica</i> .....	187
	<i>Análisis de Componentes Principales (ACP) de los ácidos grasos y compuestos volátiles de los quesos</i> .....	188
4.5	Conclusiones .....	190
Discusión y conclusiones generales.....		191
Proyecciones futuras .....		193
Referencias bibliográficas .....		195

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.3.1</b> Zonas agroecológicas de estudio, número de tambos muestreados por cuenca y período de muestreo.....	16
<b>Tabla 1.4.1</b> Características microbiológicas y sanitaria de la leche caprina cruda para tres zonas agroecológicas de la provincia de Salta. Años 2007-2014.....	26
<b>Tabla 1.4.2</b> Caracterización higiénica y sanitaria según zona de procedencia, tercio de lactancia, biotipo y tipo de ordeño.....	27
<b>Tabla 1.4.3</b> Regresión lineal entre CT y RAM, con muestras cuyos valores de RAM fueron inferiores a 5,69 log ufc/ml.....	32
<b>Tabla 1.4.4</b> Caracterización físico-química de la leche según zona, biotipo tercio de lactancia y tipo de ordeño. Años 2007-2014.....	33
<b>Tabla 2.4.1</b> Parámetros fisicoquímicos de las leches de cabra cruda utilizadas en cada tratamiento térmico y límites establecidos por el CAA .....	57
<b>Tabla 2.4.2</b> Evaluación de la eficiencia de los tratamientos térmicos mediante recuento de aerobios mesófilos (RAM) y coliformes totales (CT).....	60
<b>Tabla 2.4.3</b> Ecuaciones según el modelo de regresión lineal simple y coeficientes de regresión obtenidos para los valores de RAM y CT vs tiempo, de las leches caprinas tratadas térmicamente por PMB y PMA, vida útil del producto conservado en heladera en anaquel superior (Tº 6-8ºC) e inferior (Tº8-10ºC) durante 13 días.....	62
<b>Tabla 2.4.4</b> Microorganismos patógenos específicos, en leche caprina cruda y tratada térmicamente según pasteurización media baja y pasteurización media alta.....	67
<b>Tabla 3.3.1</b> Fermentación de citrato, según la formación de halo claro en medio diferencial agar citrato de calcio.....	80
<b>Tabla 3.3.2</b> Producción de diacético-acetoina, según la ausencia o presencia de una banda rosa en la parte superior del medio de cultivo.....	80
<b>Tabla 3.3.3</b> Categorías de susceptibilidad a vancomicina para <i>Enterococcus</i> spp. según la CIM (µg/mL).....	82
<b>Tabla 3.3.4</b> Puntos de cortes recomendados por la agencia NCCLS según el diámetro de inhibición.....	87
<b>Tabla 3.3.5</b> Categorías de susceptibilidad a ampicilina, vancomicina y gentamicina para <i>Enterococcus</i> spp.....	88

<b>Tabla 3.4.1</b> Comparación de la calidad microbiológica, sanitaria y físico química de leches caprinas de las zonas de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.....	93
<b>Tabla 3.4.2</b> Número de bacteria aislada y número de bacterias lácticas resultantes del total de los aislamientos.....	95
<b>Tabla 3.4.3</b> Características tecnológicas de las 60 BAL.....	102
<b>Tabla 3.4.4</b> Pruebas de inocuidad realizadas en BAL aisladas de leche caprina de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.....	103
<b>Tabla 3.4.5</b> Identidad determinada a través de la secuenciación del fragmento 16S de ARNr de las 40 cepas según zona de procedencia.....	104
<b>Tabla 3.4.6</b> Perfil de antibiograma de las bacterias lácticas estudiadas según zona de procedencia.....	111
<b>Tabla 3.4.7</b> Número de BAL susceptibles a los antibióticos analizados y número de BAL susceptibles según cantidad de antibióticos analizados.....	112
<b>Tabla 3.4.8</b> Concentración mínima inhibitoria (MIC) frente a ampicilina, vancomicina y gentamicina.....	114
<b>Tabla 3.4.9</b> Categorías de susceptibilidad a ampicilina, vancomicina y gentamicina para <i>Enterococcus</i> spp.....	115
<b>Tabla 3.4.10</b> Resistencia a las menores concentraciones de antibióticos (ampicilina, gentamicina y vancomicina) de las cepas <i>E. faecium</i> y <i>E. durans</i> , según zona de procedencia. Valores promedios del diámetro del halo de inhibición (mm).....	116
<b>Tabla 3.4.11</b> Cepas con propiedades antimicrobianas según patógeno seleccionado.....	121
<b>Tabla 3.4.12</b> Cepas seleccionadas de las zonas de Valle de Amblayo y Valle de Lerma para la formulación del fermento láctico.....	122
<b>Tabla 3.4.13</b> Fermentos formulados según zona de procedencia.....	123
<b>Tabla 3.4.14</b> Actividad proteolítica de las cepas combinadas por zona.....	129
<b>Tabla 4.3.1</b> Gel de poro grueso (Acrilamida 5%, p/v).....	146
<b>Tabla 4.3.2</b> Gel de poro fino (Acrilamida 7%, p/v).....	147
<b>Tabla 4.3.3</b> Soluciones para la tinción- decoloración de los geles.....	147

<b>Tabla 4.4.1</b> Calidad fisicoquímica, microbiológica e higiénica de la leche utilizada en las elaboraciones de los quesos.....	155
<b>Tabla 4.4.2</b> Perfil de los componentes proteicos de la leche de cabra utilizada en la elaboración de los quesos.....	157
<b>Tabla 4.4.3</b> Características fisicoquímicas de los quesos caprinos elaborados con y sin fermento durante maduración.....	164
<b>Tabla 4.4.4</b> Densidad óptica integrada referidos a sus valores iniciales (DOI /DOIi) para las fracciones analizadas por urea-PAGE en los tres tipos de quesos caprinos, a los 40 días de maduración.....	169
<b>Tabla 4.4.5</b> Evolución del fraccionamiento del nitrógeno de los quesos caprinos con y sin fermento durante maduración.....	170
<b>Tabla 4.4.6</b> Composición de ácidos grasos libres en los quesos de cabra elaborados sin fermento, con fermento Valle de Lerma y con fermento de Valle de Amblayo durante maduración (40 días).....	176
<b>Tabla 4.4.7</b> Compuestos volátiles identificados en quesos caprinos elaborados sin fermento, con fermento Valle de Lerma y fermento Valle de Amblayo, sin madurar y madurados (UAX1000).....	183

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.3.1</b> Zonas Agroecológicas de estudio y ubicación de las cuencas donde se encontraron los tambos muestreados.....	16
<b>Figura 1.4.1</b> Frecuencias absolutas y frecuencias relativas (%) acumuladas de los recuentos de aerobios mesófilos en las tres zonas en estudio. Años 2007-2014.....	22
<b>Figura 1.4.2</b> RAM y su distribución porcentual de valores mayores al límite del CAA (5,69 log/ufc/mL) por zona evaluada.....	23
<b>Figura 1.4.3</b> Frecuencias absolutas y relativas % acumuladas de Coliformes totales en las tres zonas en estudio. Años 2007-2014.....	23
<b>Figura 1.4.4</b> Frecuencias absolutas y relativas % acumuladas del Conteo de Células Somáticas, en las tres zonas en estudio. Año 2007-2014.....	24
<b>Figura 1.4.5</b> Conteo de Células Somáticas y su distribución porcentual de valores mayores al límite del CAA (6,18 log cél/mL), por zona evaluada.....	25
<b>Figura 1.4.6</b> Diagrama de sectores para ordeño del tipo manual y mecánico según calidad higiénica de leche caprina cruda, determinada por los indicadores RAM y CCS.....	30
<b>Figura 1.4.7</b> Relación entre RAM (log ufc/mL) y CT (log ufc/mL) para todas las cuencas estudiadas.....	31
<b>Figura 1.4.8</b> Regresión lineal entre RAM (log ufc/mL) y acidez (°D) para todas las cuencas estudiadas.....	35
<b>Figura 1.4.9</b> Acidez de las muestras en función de la proteína total de cada biotipo	36
<b>Figura 1.5.0</b> Valores promedios y su error estándar de las variables físico-químicas pH (a), acidez (b) y lipólisis (c) según periodo de lactancia (1er, 2do y 3er tercio) en las tres zonas lecheras caprinas en estudio, para dos tipos de ordeño, manual (negro) y mecánico (blanco). Año 2007-2014.....	37
<b>Figura 2.3.1</b> Sachets tricapa coextrusión PED, utilizados en PMB, PMA y ATCT.....	48
<b>Figura 2.3.2</b> Equipos de tratamiento térmico de leche. a) Tina quesera con camisa de agua (pasteurización baja). b) Equipo intercambiador de calor a placa (pasteurización PM). c) Equipo intercambiador tubular (HTCT) vista horizontal. d) Equipo intercambiador tubular (HTCT) vista vertical.....	49
<b>Figura 2.4.2</b> Comparación de los parámetros RAM (cuadrado negro) y BAL (cuadrado blanco), en leche cruda (cuadrante superior) y leche TT (después de aplicado los tratamientos térmicos PMB y ATCT, cuadrante inferior).....	61

<b>Figura 2.4.3</b> Vida útil microbiológica y sensorial de leche caprina pasteurizada, en condiciones recomendada de conservación. Rectas ajustadas a la relación RAM, CT y Acidez vs tiempo.....	66
<b>Figura 2.4.4</b> Vida útil microbiológica y sensorial de leche caprina ATCT (altas temperaturas cortos tiempos). Rectas ajustadas a la relación RAM (recuento de aerobios mesófilos) vs tiempo y acidez vs tiempo.....	69
<b>Figura 3.3.1</b> Valle de Amblayo. a) Descripción de la zona. b) Corral caprino.....	73
<b>Figura 3.3.2</b> Valle de Lerma. a) Descripción de la zona. b) Corral caprino.....	74
<b>Figura 3.3.3</b> Ubicación de las zonas en estudio en Valle de Amblayo (naranja) y Valle de Lerma (verde).....	75
<b>Figura 3.4.1</b> Análisis de componentes principales (CP) para las leches caprinas de las zonas de Valle de Amblayo y Valle de Lerma durante primavera y otoño, sobre las variables microbiológicas, sanitarias y físico-químicas.....	94
<b>Figura 3.4.2</b> Pruebas tecnológicas evaluadas en las 90 BAL.....	96
<b>Figura 3.4.3</b> Capacidad de utilizar citrato de BAL aisladas de leche caprina de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.....	97
<b>Figura 3.4.4</b> Síntesis de diacetilo y acetoina de BAL aisladas de leche caprinas de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.....	98
<b>Figura 3.4.5</b> Capacidad acidificante de BAL aisladas de leche caprina de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.....	98
<b>Figura 3.4.6</b> Capacidad de coagulación de BAL aisladas de leche caprina Valle de Amblayo y Valle de Lerma.....	99
<b>Figura 3.4.7</b> Crecimiento de BAL a alta concentración de ClNa aisladas de leche caprina de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.....	100
<b>Figura 3.4.8</b> Crecimiento a alta temperatura (45°C) de BAL aisladas de leche caprina de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.....	100
<b>Figura 3.4.9</b> Análisis de correspondencia múltiple. Características tecnológicas de las BAL relacionadas a la zona de procedencia.....	101
<b>Figura 3.4.10</b> Electroforesis en gel de agarosa (1%) mostrando perfiles de fragmentos amplificados empleando los primers RAPD a) B06 y b) B08.....	106



<b>Figura 3.4.11</b> Dendograma basado en los patrones de bandas (fingerprint) RAPD de cepas de <i>Enterococcus</i> spp. y <i>Lactococcus</i> sp. aplicando el coeficiente de correlación de Dice .....	108
<b>Figura 3.4.12</b> Características tecnológicas de las cepas según zona de procedencia.....	120
<b>Figura 3.4.13</b> Curvas del crecimiento microbiano de los fermentos de Valle de Amblayo incubados durante 144h.....	124
<b>Figura 3.4.14</b> Curvas del crecimiento microbiano de los fermentos de Valle de Lerma incubados durante 144 h.....	124
<b>Figura 3.4.15</b> Cambios de pH de los fermentos de Valle de Amblayo durante 144h de incubación.....	125
<b>Figura 3.4.16</b> Cambios de pH de los fermentos de Valle de Lerma durante 144h de incubación.....	125
<b>Figura 3.4.17</b> Cambios de acidez de los fermentos de Valle de Amblayo durante 144h de incubación.....	126
<b>Figura 3.4.18</b> Cambios de acidez de los fermentos de Valle de Lerma durante 144h de incubación.....	126
<b>Figura 3.4.19</b> Actividad lipolítica de los fermentos de Valle de Amblayo durante 144h de incubación.....	128
<b>Figura 3.4.20</b> Actividad lipolítica de los fermentos de Valle de Lerma durante 144h de incubación.....	128
<b>Figura 3.4.21</b> Esquema de los pasos seguidos para realizar la selección de los fermentos.....	132
<b>Figura 4.3.1</b> Protocolo utilizado en la elaboración de los quesos.....	140
<b>Figura 4.4.1</b> Cambios de la microbiota (BAL, RAM y CT) durante el proceso de elaboración y maduración de quesos sin fermento.....	158
<b>Figura 4.4.2</b> Cambios de la microbiota (BAL, RAM y CT)) durante el proceso de elaboración y maduración de quesos con fermento Valle de Lerma. ....	158
<b>Figura 4.4.3</b> Cambios de la microbiota (BAL, RAM y CT) durante el proceso de elaboración y maduración de quesos con fermento Valle de Amblayo (medias y desvíos estándar).....	159

<b>Figura 4.4.4</b> Cambios de pH durante el proceso de elaboracion de los quesos Sin Fermento, con Fermento Valle de Amblayo y Fermento Valle de Lerma. ....	162
<b>Figura 4.4.5</b> Contenido de grasa y proteína en base seca en los quesos elaborados a los 40 días de maduración.....	166
<b>Figura 4.4.6</b> Electroforegrama de quesos caprinos elaborados Sin fermento, con fermento Valle de Lerma y Fermento Valle de Amblayo.....	168
<b>Figura 4.4.7</b> Cromatogramas RP-HPLC del extracto soluble en agua de quesos elaborados con leche de cabra a tiempo cero (T0) y 40 días de maduración (T40). Según lote (1, 2 y 3). Elaborados sin fermento (SF), con fermento Valle de Lerma (VL) y fermento Valle de Amblayo (Amb).....	173
<b>Figura 4.4.8</b> Evolución de los picos hidrofílicos (entre 10 – 60 min, gris claro) y picos hidrofóbicos (60 - 100 min, gris oscuro), en quesos de cabra sin fermento (SF), con fermento Valle de Lerma (VL) y fermento Valle de Amblayo (Amb), a tiempo cero (T0) y tiempo 40 días (T40).....	174
<b>Figura 4.4.9</b> Ácidos grasos libres totales y variación de niveles de ácidos grasos de cadena corta (CC, barras negras C4-C10), cadena media (CM, barras grises C12-C14), y de cadena larga (CL, barras blancas C16-C18), en quesos sin madurar y madurados, elaborados: Sin fermento, con Fermento Valle de Lerma y Fermento Valle de Amblayo.....	177
<b>Figura 4.4.10</b> Perfil de ácidos grasos en los quesos madurados, elaborados sin fermento, con fermento Valle de Lerma y con fermento Valle de Amblayo.....	180
<b>Figura 4.4.11</b> Compuestos volátiles (ácidos, alcohol, cetonas y alcanos totales) en quesos Sin fermento, con fermento Valle de Lerma y con fermento Valle de Amblayo; sin madurar y madurados.....	182
<b>Figura 4.4.12</b> Compuestos volátiles (ésteres, aldehídos, bencenos) en quesos Sin fermento, con fermento Valle de Lerma y con fermento Valle de Amblayo; sin madurar y madurados.....	182
<b>Figura 4.4.13</b> Análisis discriminante de datos obtenidos por nariz electrónica, para los quesos caprinos elaborados sin fermento (SF), con fermento Valle de Lerma (VL) y fermento Valle de Amblayo (Amb) a los 40 días de maduración.....	188
<b>Figura 4.4.14</b> Biplot del Análisis de Componentes Principales (ACP) para la caracterización de quesos madurados, elaborados sin fermento (SF), con fermento Valle de Lerma (VL) y fermento Valle de Amblayo (Amb) según ácidos grasos y compuestos volátiles.....	189

## Abreviaturas

**ABLV:** Agar Bilis Lactosa Rojo Neutro Cristal Violeta

**ACM:** Análisis de Correspondencia Múltiple

**ACP:** Análisis de Componentes Principales

**AD:** Análisis Discriminante

**ARP:** Agar recuento en placa

**AG:** Ácido graso

**AGCC:** AG de cadena corta

**AGCL:** AG de cadena larga

**AGCM:** AG de cadena media

**AGL:** Ácidos grasos libres

**AGLT:** Ácidos grasos libres totales

**AI:** Anaquel Inferior

**Amb:** Valle de Amblayo

**AMP:** Ampicilina

**ANAVA:** Análisis de la varianza

**ARP:** Agar Recuento en Placa

**AS:** Anaquel Superior

**ATCT:** Alta temperatura corto tiempo

**BAL:** Bacterias ácido lácticas

**BHI:** Brain Heart Infusion (medio de cultivo)

**BPM:** Buenas prácticas de manufactura

**CP:** Componentes principales

**CAA:** Código Alimentario Argentino

**CCS:** Conteo de células somáticas

**CG:** Cromatografía gaseosa

**CIM:** Concentración mínima inhibitoria

**CHP:** Cloranfenicol

**CLI:** Clindamicina

**ICMSF:** International Commission on Microbiology Specification for Foods

**CT:** Coliformes totales

**DCA:** Diseño completamente aleatorizado

**DOI:** Densidad óptica integrada  
**DO:** Denominación de Origen  
**EM:** Espectrometría de masas  
**FAO:** Food and Agriculture Organization  
**GA:** Grado de avance  
**GEN:** Gentamicina  
**HTST:** high temperature-short time  
**IDF:** *International Dairy Federation*  
**IM:** índice de maduración  
**INTA:** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria  
**IG:** Identidad Geográfica  
**ITA:** Instituto de Tecnología de los Alimentos  
**LDR:** leche descremada reconstituida  
**LTLT:** low temperature - long time  
**MRS:** Man, Rogosa and Sharpe (medio de cultivo)  
 $\eta$  : eficiencia del tratamiento térmico  
**NCCL:** National Committee for Clinical Laboratory Standards  
**NCBI:** Centro Nacional de Información Biotecnológica  
**NS:** Nitrógeno soluble  
**NSA:** Nitrógeno soluble en agua  
**NS-APT:** Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico  
**NSLAB:** Non-starter lactic acid bacteria  
**NS-TSA:** Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético  
**NT:** Nitrógeno total  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud  
**OTUs:** Unidades Taxonómicas Operativas  
**pb:** Pares de bases  
**PB:** Pasteurización Baja  
**PCA:** Análisis de componentes principales  
**PEN:** Penicilina  
**PM:** Pasteurización media  
**PMA:** Pasteurización Media Alta

**Q:** Quebrada

**RAPD:** Random Amplified Polymorphic DNA

**RAM:** Recuento de aerobios mesófilos

**RP-HPLC:** Reverse phase - high performance liquid chromatography

**SLC:** Sobrenadantes libres de células

**SF:** Sin fermento

**SSAF:** Sub Secretaría de la Agricultura Familiar

**TET:** Tetraciclina

**TT:** Tratamiento térmico

**UPGMA:** Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages

**VA:** Valles Áridos

**VAN:** Vancomicina

**VL:** Valle de Lerma

**VT:** Valles Templados

## Introducción general

### Características generales de la leche

La leche es un fluido secretado por las glándulas mamarias de las hembras de todos los mamíferos, de los que hay alrededor de 4500 especies, para la alimentación de sus crías.

Desde un punto de vista fisicoquímico, puede considerarse a la leche como un fluido complejo, en el que sus componentes coexisten organizados en tres fases. Por un lado, hay una fase acuosa, en la cual la lactosa, las sales orgánicas e inorgánicas y algunas vitaminas están solubilizadas. En esta fase acuosa están también solubilizadas algunas proteínas, las proteínas del suero lácteo. Por otro lado, existe una fase coloidal, compuesta por las caseínas que forman agregados (denominados micelas), cuyo diámetro oscila entre 50 a 300 nm y otra fase en la que los lípidos existen en un estado emulsificado, formando glóbulos de 0,1 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, estabilizados por una membrana de lipoproteína (Fox, 2011a). Desde el punto de vista nutricional, la leche cubre en su totalidad los requerimientos nutricionales de las crías de mamíferos durante su período de mayor crecimiento, y es por ello que puede ser considerada el alimento natural más completo.

Debido a que los requerimientos nutricionales y fisiológicos son particulares para cada especie, existen diferencias en la concentración y/o estructura de sus componentes. El 85% de la producción mundial de leche corresponde a leche de vaca, 11% es de búfala, 2% de oveja y 2% de cabra. Por lo que en general, los estudios sobre la composición de la leche han sido dirigidos a las principales especies de explotación lechera: vaca, búfala, oveja y cabra (Fox, 2011a).

### Leche de cabra

#### Actividad productiva

Alrededor del 95% de la población caprina mundial se encuentra en Asia, África, y América Latina. En todo el mundo el ganado caprino está compuesto por 996 millones de animales, distribuido principalmente entre China (19%) e India (16%), siendo también importante la participación de Pakistán (6,3%) Nigeria (5,8%) y Bangladesh (5,5%). En

América Latina, Brasil y México son los países con mayor producción caprina, representado el 0,9% cada uno, seguido por Argentina con el 0,4% de la población mundial (FAO, 2013).

En Argentina, no es certero el número informado, ya que resultan difíciles de censar, debido a lugar y tipo de explotación.

Las explotaciones caprinas de leche, se ubican en su mayoría, en el noroeste argentino (Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca y Salta) y norte de la provincia de Córdoba y en menor medida en la región Pampeana. Se trata de sistemas extensivos y con biotipos mestizos (Criollo, Saanen, Anglo-Nubian), ubicados en ecosistemas de bajos recursos naturales (agua, gran amplitud térmica y pobre cantidad y calidad de forrajes, climas secos) y de complejo acceso (zonas montañosas alejadas de los centros urbanos principales). En los últimos años, técnicos en territorio de diferentes instituciones han recorrido y asistido estos elaboradores. Desde esta experiencia es posible afirmar que estas producciones rurales, desempeñan un rol social y económico importante para las zonas en las que se ubican, ya que, por las condiciones climáticas y limitados servicios, es muy difícil realizar otro tipo de emprendimientos productivos que permita sostener las familias rurales. Estos establecimientos elaboran quesos típicos regionales, de pasta blanda y sin maduración. Por otro lado, en zonas de mayores recursos naturales y servicios, hay, aunque en mucha menor cuantía, explotaciones intensivas, con selección de biotipos, implantación de pasturas, maquinarias y establecimientos elaboradores de quesos tipos europeos con procesos de maduración (Chavez y col., 2014). En ambos casos, el turismo es una importante fuente de comercio (Chavez y col., 2011). En la región Pampeana, además de los quesos también se produce leche UHT y leche en polvo caprina (Medina y col., 2011).

#### Parámetros de calidad de la leche de cabra

La composición de la leche de distintas especies, viene condicionada por las necesidades nutricionales de la especie, en general hay diferencias cuantitativas y también en cuanto a la naturaleza de los constituyentes de las distintas especies químicas de la leche (ej. secuencia de amino ácidos en caseínas o membranas globulares). Sin embargo, es apropiado hablar de los mismos componentes mayoritarios: agua, proteína, grasa, lactosa y minerales.

Asimismo, la concentración de sus especies químicas puede modificarse por factores ambientales y estacionales relativos a la zona de producción que influyen la calidad de pasturas; además de las variaciones propias del ciclo de la lactancia. También son determinantes el volumen de leche obtenida, los biotipos raciales, el esquema y manejo productivo. En la tabla 1 se puede observar la composición química de macro y micronutrientes destacados de leche de cabra según diversos autores (Fili, 2018).

**Tabla 1.** Composición química de la leche de cabra

Componente g/100g	Autores						
	Park y col., 2007	Raynal-Ljutovac y col., 2008	Kondyli, y col., 2007- 2012	Martínez, G., 2013***	Sanz Ceballos y col., 2009	Gomes y col., 2013	Khan y col., 2006
Lactosa	4,1	4,19	4,39 - 4,48	4,76	4,11	4,23	Nd
Proteínas	3,4	3,53	3,36 - 3,57	2,91	3,48	3,60	Nd
Grasas	3,8	4,51	4,10 - 4,21	3,69	5,23	3,15	Nd
SNG*	8,9	13,2	8,54 - 8,64	Nd**	8,34	8,23	Nd
Vit A mg	0,055	0,04	0,01- 0,05	Nd	Nd	Nd	Nd
Vit D µg	0,05	0,06	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Ca mg	134	126	132	Nd	158,57	Nd	176,06
P mg	121	97,0	97,7	Nd	118,97	Nd	Nd
Fe mg	0,07	0,05	0,06	Nd	0,15	Nd	0,085
Zn mg	0,56	0,34	0,37	Nd	0,528	Nd	0,606

Referencias: \* Sólidos no grasos \*\* No documentado \*\*\* Datos actuales del Valle de Lerma, Salta Argentina

La leche de cabra, al igual que la de otras especies, aporta proteínas de alto valor biológico. La mayor fracción es la caseína (CN) cuya micela difiere en estructura, mineralización, capacidad de hidratación y tamaño respecto a leche de vaca; lo que le otorga mejor digestibilidad, alcalinidad y capacidad “Buffer” o tamponante.

La calidad de la grasa láctea caprina, por otro lado, es un factor importante porque define la capacidad de la leche para ser procesada; y toma un rol relevante en las cualidades nutricionales y sensoriales de los productos que de esta se obtengan. La grasa láctea caprina, al igual que la bovina, está conformada por triglicéridos contenidos



en glóbulos. Estos glóbulos son más pequeños en los caprinos que en los bovinos, forman una fina emulsión (Attaie y Richter, 2000) y son más fácilmente digeribles que los de la leche de vaca. En el perfil de ácidos grasos son mayoritarios los de cadena corta y media. En relación con el contenido mineral, el calcio y el fósforo son los más destacados (Fili, 2018).

#### Características microbiológicas de la leche de cabra

La leche caprina, al igual que la bovina, reúne cualidades en su composición que la hacen propicia para el desarrollo de un número elevado de especies bacterianas.

La población microbiológica de la leche caprina puede presentar muchas variaciones dependiendo de cada etapa de su producción (extracción, transporte, manipuleo durante el procesamiento). La participación del ser humano en el control de estas etapas, es fundamental al momento de lograr una calidad integral de la leche y sus productos, puesto que el riesgo de transmitir alguna patología por este medio es alto. En este contexto, el Código Alimentario Argentino (CAA), se actualizó durante 2014, incluyendo especificaciones sobre leche caprina (CAA, De la canal y asociados, 2014). Esto implica un gran avance en esta materia, donde en general, fue pobre la información sobre calidad higiénica de leche caprina y se tomaba como referencia lo indicado para leche de vaca.

En las producciones caprinas en el noroeste argentino, la leche es procesada en la misma zona de producción, generalmente sin ningún tratamiento térmico que controle la microbiota nativa. El sistema de cría, la alimentación y las condiciones climáticas, tienen efecto sobre las variaciones de la microbiota que guía los procesos de fermentación y maduración de los productos lácteos. La biodiversidad de las cepas involucradas en el proceso de fabricación de queso es la base de la particularidad de los productos (Sciantu y Pireda, 2007).

Estudios de las cualidades microbiológicas de la leche de cabra utilizada para producir productos lácteos, han demostrado la alta biodiversidad de la leche producida durante la lactancia y por las diferentes características de los sistemas de gestión agrícola (Medina y col., 2001; Nikolaou y col., 2002; Scintu y col., 2004; Macedo y col., 2004; Oliszewski y col., 2006).

La diversidad de la microbiota de leche cruda contribuye a las características sensoriales peculiares entre quesos de leche cruda y en productos tradicionales. De hecho, muchas de las características deseadas por los consumidores no están presentes o son mucho menos evidentes en los quesos elaborados a partir de leche pasteurizada (Ortigosa y col., 2001; Gomez-Ruiz y col., 2002). La biodiversidad de la microbiota y su evolución durante el proceso de maduración son sin duda más numerosos cuando los microorganismos son los que están naturalmente en la leche.

En Argentina, estudios sobre bacterias lácticas aisladas de leche y quesos caprinos, han revelado los siguientes porcentajes: *Lactiplantibacillus plantarum* (35%), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (15%), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (5%), *Limosilactobacillus fermentum* (5%), *Enterococcus faecium* (35%) y *Pediococcus pentosaceus* (5%). Asimismo, en aislamientos de diferentes productos lácteos de cabra, fueron identificados: *E. faecalis* (9%), *E. faecium* (33%), *Leuconostoc* sp. (31%), *Streptococcus thermophilus* (24%) y *Pediococcus* sp. (3%), (Medina y col., 2011).

La complejidad de la población microbiana presente en productos lácteos de la leche de cabra da cuenta de la importancia de la protección de la microbiota natural de permanecer en el medio ambiente y en las zonas tradicionales de producción.

#### Leche caprina tratada térmicamente

La leche caprina, como se mencionó con anterioridad, tiene como destino principal el del queso, posiblemente por una cuestión cultural y tradición regional (Chavez, 2014), y en menor medida se elabora leche en polvo y leche UHT (Medina y col., 2011).

Los tratamientos térmicos resultan de la combinación de temperatura y tiempo; son aplicados con dos grandes finalidades, la primera tiene que ver con el control de la inocuidad, y la segunda con la prolongación de la vida útil de la leche. En este contexto, es importante mencionar que el CAA, define a la pasteurización como el tratamiento mínimo requerido para leche fluida destinada a la venta, buscando garantizar inocuidad.

Todo producto lácteo ha sido sometido a algún tipo de tratamiento térmico durante su procesamiento, salvo los quesos caprinos artesanales, los que se elaboran con leche cruda.

El diseño de los equipos y las variables de control de los procesos, requieren, entre otras variables, conocer la estabilidad de la leche frente a perfiles de temperatura. Particularmente la leche caprina presenta menor estabilidad térmica (Chavez, 2010) que la bovina, por lo cual equipos y condiciones de procesamiento deben ser acondicionadas para esta especie.

## El queso

Actualmente, se cree que el queso surgió por primera vez hace aproximadamente 8000 a 10000 años en la Mesopotamia, región del actual Irak, de la mano de la domesticación de ovejas y cabras y la obtención de leche de estos animales.

Los quesos de coagulación ácida podrían haber surgido espontáneamente, por la acción acidificante de los lactobacilos, naturalmente presentes en la leche, al metabolizar la lactosa (Fox, 2011b). Los quesos producidos por coagulación enzimática probablemente surgieron al usar los estómagos de los animales que producían la leche, como contenedor para transportar leche. Almacenar leche en el estómago de una cría la expuso a la acción de las enzimas coagulantes presentes en la mucosa gástrica de estos animales, produciéndose así la formación de la cuajada (Andrén, 2011).

Desde el punto de vista microbiológico, el queso es un complejo ecosistema de diversas especies de bacterias y en algunos casos también contiene ciertas especies de mohos y levaduras como flora natural. Durante la maduración, estos microorganismos llevan a cabo sus actividades metabólicas, para lo cual utilizan los hidratos de carbono, grasas y proteínas presentes en el queso, lo que tiene gran influencia sobre las características finales del producto. Debido a que el queso es un ambiente selectivo, no cualquier tipo de microorganismo es capaz de desarrollarse en su interior. Las bacterias que tienen dicha capacidad son conocidas como bacterias ácido lácticas (BAL o LAB, lactic acid bacteria por sus siglas en inglés).

## Bacterias lácticas

Las BAL son un grupo de microorganismos representadas por varios generos, con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Se caracterizan por la capacidad de producir ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares, incluyendo la lactosa, en la mayoría de las especies. Comúnmente son bacilos o cocos no móviles,

Gram-positivos, microaerófilos, ácido tolerantes, no formadores de esporas. Pueden ser mesófilas (temperatura óptima de crecimiento alrededor de 30°C) o termófilas (temperatura óptima alrededor de 45°C).

En cuanto a su ubicación taxonómica, las BAL pertenecen a alguno de los siguientes géneros principales: *Lactobacillus* (125 especies), *Lactococcus* (5 especies y 3 subespecies), *Streptococcus* (sólo una especie es de interés en tecnología alimentaria, *Streptococcus thermophilus*), *Leuconostoc* (22 especies y 3 subespecies), *Pediococcus* (9 especies), *Bifidobacterium*, *Carnobacterium* y *Enterococcus* (Fox, 2011c).

Las BAL están ampliamente distribuidas en la naturaleza, y han sido aislada de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, así como también del tracto digestivo y vagina de mamíferos, entre otras fuentes (Azadnia y col., 2011). Para su multiplicación requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento. La leche es el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL. Sin embargo, otros alimentos son también excelentes medios de crecimiento y producción de metabolitos de bacterias lácticas, entre ellos se encuentran las masas de cereales, vegetales y carnes (Vazquez y col., 2009).

La microbiota del queso resulta de la biota presente en la leche (cuando no es pasteurizada previamente a la elaboración) y la biota adquirida del ambiente durante el proceso de elaboración y de los cultivos agregados. La microbiota bacteriana del queso puede caracterizarse de la siguiente manera: 1) cultivo primario o iniciador, 2) cultivo secundario o adjunto, agregado principalmente por su efecto sobre el flavor, formación de ojos, etc. y 3) microorganismos adventicios o NSLAB (*non-starter lactic acid bacteria*) (Broome y col., 2011). Todos estos microorganismos contribuyen, desde un punto de vista bioquímico, a la complejidad (y variabilidad) del producto final (Powell y col., 2011).

### Fermento primario

Dentro de los cultivos primarios se pueden distinguir los mesófilos (crecimiento y una producción de ácido óptima a 30°C), que comprenden a especies del género *Lactococcus* y en ocasiones, *Leuconostoc* y a los termófilos (temperaturas de crecimiento óptimo de alrededor de 42°C), que típicamente incluye a las bacterias termófilas del género *Lactobacillus* y a *Streptococcus thermophilus*.

La función principal de los fermentos primarios es la de producir ácido láctico por fermentación de la lactosa en las etapas iniciales de la manufactura de quesos. La consecuente caída del pH es la que afecta a numerosos aspectos del proceso de elaboración de quesos y en última instancia, la composición y calidad del queso. Una producción de ácido predecible por el cultivo primario puede ser crucial para un control de la textura del queso y el desarrollo del flavor (Powell y col., 2011). También contribuye a generar condiciones adversas para el crecimiento de otros microorganismos. Otra característica de mucha importancia es la de formar parte en el desarrollo del flavor en quesos (Broome y col., 2011).

### Fermento secundario

Los cultivos secundarios pueden ser definidos como cultivos de microorganismos que son utilizados en la manufactura de algunos tipos de quesos con una función específica dentro del proceso de desarrollo y el control del flavor, el color y la textura del queso. El crecimiento y el desarrollo de los cultivos secundarios en quesos están normalmente precedidos por la fermentación de la lactosa a lactato por el fermento primario ya que la contribución de los cultivos secundarios a la acidificación de la leche suele ser limitada o nula. Sus propiedades fisiológicas o bioquímicas únicas, pueden ser la halotolerancia, el crecimiento a bajo pH, la utilización del lactato, la formación de CO<sub>2</sub>, la actividad proteolítica y peptidolítica, la actividad lipolítica y esterolítica o las actividades enzimáticas del catabolismo de aminoácidos (Ratray y Eppert, 2011).

### Bacterias ácido lácticas no pertenecientes al fermento primario (NSLAB)

Este grupo está presente en la mayoría de los quesos madurados durante un cierto tiempo y comprende principalmente a lactobacilos facultativos heterofermentativos, especialmente *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*, pero también pueden estar presentes *Pediococcus* spp. y lactobacilos heterofermentativos obligados como son *Levilactobacillus brevis* y *Limosilactobacillus fermentum*. Son microorganismos mesófilos y las principales fuentes de origen son la leche (especialmente en quesos elaborados con leche cruda) y/o el ambiente del lugar de elaboración. La mayoría de las NSLAB son anaerobios facultativos ácido y

halotolerantes y por lo tanto pueden crecer en el queso en estadíos más avanzados de la maduración, donde se transforman en la población predominante (Cogan, 2011).

En este trabajo de tesis se evaluó la calidad microbiológica de la leche caprina bajo dos aspectos: microorganismos que afectan la inocuidad de la leche y microbiota láctica que interviene en la elaboración de quesos. Se centró la atención en cuantificar microbiológicamente el impacto que la zona de procedencia y condiciones de proceso ocasionan sobre la inocuidad de la leche caprina para consumo humano. Fue también interés de este estudio, analizar indicadores microbiológicos de eficiencia de tratamiento térmico y la presencia de microorganismos patógenos en la leche caprina durante tratamientos térmicos. Por otro lado, se estudió el potencial de la microbiota láctica como herramienta de identidad territorial. Adicionalmente, esta microbiota fue analizada para explorar su aptitud tecnológica como fermento para la elaboración de quesos caprinos. Se utilizó leche caprina de la zona de los Valles Áridos, Quebradas y de los Valles Templados de la provincia de Salta.

### **Objetivo general**

Estudiar la microbiología de la leche y de productos lácteos caprinos en aspectos de la inocuidad y procedencia territorial.

### **Objetivos específicos**

- Identificar y cuantificar microorganismos y/o grupos de microorganismos indicadores de calidad higiénica en leche caprina de diferentes zonas de procedencia que puedan comprometer su inocuidad.
- Identificar microorganismos o grupos de microorganismos de la leche caprina como indicadores de eficiencia de tratamientos térmicos y de vida útil de sus productos.
- Investigar el potencial de la microbiota láctica natural de la leche caprina como indicador de denominación de origen (D.O.).
- Evaluar el efecto de cepas seleccionadas en las características fisicoquímicas, bioquímicas y sensoriales de quesos artesanales.

## Capítulo Nº 1: Indicadores de calidad higiénica en leche caprina

### 1.1 Introducción

La leche caprina en todo el país, es producida para elaborar quesos. Se trata de sistemas tambo-quesería, asociados a la sustentabilidad de la familia campesina (Chavez y col., 2019), diferenciándose del concepto de sistema bovino de leche intensivo-industrial que implica la producción de leche separada de la usina transformadora. Sistemas caprinos similares pueden observarse en Brasil y en la zona Mediterránea de Europa, aunque también cuentan con pequeñas industrias queseras (Morgan y col., 2003; Pirisi y col., 2007; Oliveira y col., 2011; dos Santos Souza y col., 2019).

En el NOA, la leche caprina se destina mayoritariamente a la elaboración de queso y en muchos casos no se pasteuriza.

En Salta, la actividad caprina es una actividad rural tradicional, ubicada fuertemente en los Valles Calchaquíes, con sistemas productivos extensivos acordes con las condiciones climáticas y su tecnología tradicional, condicionadas por la baja disponibilidad de agua y electricidad. También, hay sistemas intensivos preferentemente en los Valles Templados, zona que se caracteriza por estar en el ejido urbano, con rutas apropiadas, y mejor acceso al agua y energía eléctrica (Chavez y col., 2011). Por otro lado, la zona de Quebrada, es una zona de transición entre Valles Templados y La Puna, donde la vegetación pasa de arbolada a pastos ralos a medida que asciende. La tecnología aplicada en este sistema es similar a la de los Valles Calchaquíes.

Según Walstra y col. (2001), la interacción entre ecosistema y la leche define el perfil de microorganismos presentes en la leche y sus productos. Sumado a esto, y de acuerdo a la información actualmente disponible, la composición química de la leche de cabra varía según factores: a) no controlados por el ser humano: región, clima; y b) introducidos por las prácticas productivas: biotipo racial caprino, momento de lactancia, alimentación, y prácticas sanitarias. Este último aspecto contempla la posible presencia de residuos de drogas veterinarias en la leche que no son detectados a simple vista y que en alguna medida producen su adulteración (Vega y col., 2005; Pece y col., 2005; Chavez y col., 2006).

La calidad de la leche, desde un enfoque productivista, depende del potencial que ésta posee para ser sometida a un tratamiento tecnológico, dando como resultado un producto que cumpla las expectativas del consumidor en términos de salud (valor nutricional), seguridad (calidad higiénica) y satisfacción (atributos sensoriales) (Zumbo y col., 2004).

El Código Alimentario Argentino (CAA), la normativa (Ley 18.284) de mayor referencia en nuestro país, establece las normas higiénico-sanitarias, bromatológicas, de calidad y de identificación comercial que se deben cumplir para que un producto elaborado se comercialice. Se encuentra en permanente actualización, por lo que ha incorporado recientemente (2014), especificaciones sobre parámetros de calidad de leche caprina, por ejemplo, pH, acidez, conteo de células somáticas y recuento total de bacterias aerobias mesófilas.

En este contexto, y debido a que la leche es un excelente medio de conservación y crecimiento para una gran variedad de microorganismos (Wolfer, 1996), para alcanzar estándares de calidad aceptables, se hace indispensable la mejora continua, estableciendo estrategias según la zona de producción, el manejo sanitario de los animales, las condiciones de transporte, la conservación y la manipulación en general (Bennett, 2000; Taverna, 2002; Cabrera, 2005).

El control de la calidad higiénica sanitaria de la leche, es una herramienta importante para garantizar su inocuidad. Al respecto, se han caracterizado indicadores de higiene de leche caprina para una cuenca productiva (Gutemberg) de Córdoba (Aimar y col., 2013), para un establecimiento de Santiago del Estero (Frau y col., 2012). En Salta, se analizó además el impacto del tipo de ordeño (manual vs mecánico) (Chavez y col., 2009). En esta tesis se decidió evaluar la incidencia de diversos factores productivos en los indicadores de higiene y sanidad, para la mayor zona productora de la provincia de Salta: Valles Áridos, y para Valles Templados y Quebrada, zonas de menor producción.

## **1.2 Objetivo**

Cuantificar e identificar microorganismos y/o grupos de microorganismos indicadores de calidad higiénica en leche caprina de diferentes zonas de procedencia que puedan comprometer su inocuidad



## 1.3 Materiales y Métodos

### 1.3.1 Sitio de Estudio

Se seleccionaron tres zonas agroecológicas diferenciadas por condiciones geográficas y climáticas: Valles Áridos, Quebrada y Valles Templados.

#### Valles Áridos

Esta región se ubica de norte a sur entre los 24° 30' y 26° 30' de latitud sur 66° 20' de longitud oeste en la provincia de Salta. Su altitud varía entre 1680 y 3015 msnm. El clima es árido, con precipitaciones menores a 200 mm, concentradas en los meses de verano. Al coincidir la época de lluvias con la de mayor temperatura, se produce una alta evapotranspiración, lo que potencia el déficit hídrico (Bianchi y Yáñez, 1992). El clima se caracteriza también por poseer una marcada amplitud térmica entre la noche y el día que ronda los 14°C, y que, sumada a la intensa radiación solar y a la mayor temperatura durante el día, condicionan fuertemente la disponibilidad de agua, tanto para riego como para uso doméstico (Pícolo y col., 2008).

La energía eléctrica disponible solo se encuentra en los pueblos próximos a la ruta 40 y algunas comunidades aledañas a estos. En la mayoría de las comunidades de serranía no disponen de recurso energético. La mayoría de la población cocina y calefacciona los hogares a través del consumo de leña, la que también es escasa en la zona, proviniendo de arbustos nativos.

Los Valles Áridos se caracterizan por tener productores de la agricultura familiar, con producción para autoconsumo y venta, los cuales se encuentran en áreas marginales, tanto en altura como en los llanos y excepcionalmente en la periferia de algunas ciudades.

Las cabras que componen los rodeos son de raza criolla y tienen un tiempo de vida productiva promedio de 8 años; en la actualidad mejoradas con cruces Anglo-Nubian. La rusticidad de este tipo de sistema familiar (manejado principalmente por las mujeres y los hijos), no contempla la selección genética. Hay profesionales de INTA y de la Sub Secretaría de la Agricultura Familiar (SSAF) que operan en los Valles Áridos, estos

productores cuentan con tecnologías propias (ancestrales), y en los últimos 15 años, han incorporado nuevos recursos, acordes con sus sistemas productivos y cultura.

A partir de estudios realizados durante 2007 – 2008 por Chavez y col. (2012), se tomaron los siguientes datos:

- Son sistemas productivos familiares, de rebaños entre 5 a 200 animales, formados por más de un biotipo, siendo las razas criolla/mestiza y Anglo Nubian las de mayor presencia, aunque también se encuentra la raza Saanen. La mayoría pertenece a pequeños productores que utilizan la leche para la producción de quesos del tipo fresco sin madurar, que elaboran con recetas propias y heredadas de generación en generación, y que consumen, permutan o venden.
- En general la alimentación de las cabras es del tipo pastoreo en pastizales naturales y, en muchos casos, suplementadas por pasturas implantadas (alfalfa y verdes de invierno) y maíz.
- La actividad principal en estos sistemas productivos es la elaboración del queso de cabra, la crianza de cabrito es una actividad complementaria. Los insumos y tecnología quesera, en su mayoría son propias de la zona. La leche es el principal insumo de esta actividad.
- La tecnología de ordeño preponderante es del tipo manual en corral (93%). En el 50% de los casos el agua utilizada durante ordeño es potable o bien, proveniente de vertientes. La leche recién ordeñada, es destinada a la elaboración de quesos en forma inmediata sin instancias de conservación intermedias, solo en casos excepcionales se congela o enfría.

En esta zona se analizaron cuatro cuencas: Amblayo, Cachi-La Poma, Luracatao y Cafayate.

### Valles y Quebradas

La zona de Valles y Quebrada, une Valle de Lerma con La Puna. Se ubica entre campo Quijano y Puerta Tastil en el departamento de Rosario de Lerma, y en el departamento de Chicoana (Quebrada de Escoipe), provincia de Salta. Es un accidente geográfico (quebrada) que se extiende a lo largo de 90 Km, donde afloran formaciones rocosas que datan del periodo Precámbrico. Está flanqueado por altas sierras que en

conjunto se elevan hasta por encima de los 4000 msnm. El primer tramo de la quebrada presenta vegetación abundante y arbolada, la que se pierde a medida que se asciende, y es reemplazada por pastos ralos y cardones de gran altura. Las precipitaciones oscilan de 390 mm a 148 mm siguiendo el gradiente altitudinal. El agua apta para el consumo es escasa y en general la toman a partir de vertientes naturales ya que no existe agua corriente.

En esta zona se analizó la Quebrada del Toro, donde la existencia de productores del tipo artesanal, se encuentra relacionada con el movimiento turístico que utiliza la zona como tránsito desde el valle templado a los áridos de altura. Se trata de puestos de familia dedicados al pastoreo de caprinos y a la siembra de papa, habas y algo de maíz. La raza criolla es el principal componente de los rebaños mientras que en algunas zonas se han introducido reproductores de las razas Anglo Nubian y Saanen. En general, el tiempo de vida promedio de los animales es de 8 años.

### Valles Templados

Se encuentra ubicado en el centro geográfico de la provincia de Salta. Las lluvias se concentran en el periodo estival, de noviembre a abril. Las precipitaciones son superiores a los 1000 mm anuales en el noreste e inferior a los 400 mm anuales en el sur del valle.

La zona de Valles Templados en general tiene un sistema de cría integral intensiva. Estos sistemas se encuentran próximos a los núcleos urbanos o asociados a cuencas lecheras bovinas. Están conformados por pequeños y medianos productores propietarios de la tierra, y aunque son predios con escasa superficie, tienen agua para riego facilitando el implante de pasturas. En esta zona y por la amplia disponibilidad de recursos naturales y también tecnológicos, los rodeos cuentan, en su mayoría, con biotipo Saanen y/o Anglo-Nubian. Los períodos de vida productiva varían de 4 a 5 años, debido a que se realiza selección y descarte continuo. En cuanto al manejo emplean programas nutricionales (pastoreo rotativo, suplementación), reproductivos (monta dirigida, inseminación artificial, sincronización de celos) y sanitarios (vacunaciones, desparasitaciones). La tecnología de ordeño es manual o tecnificada en algunos casos. En estos sistemas, como en los anteriores, la leche se destina totalmente a la elaboración de queso. Se tratan de sistemas tambos-quesería.

En esta zona se analizó la cuenca de Valle de Lerma, esta cuenca se encuentra ubicada en la zona intermontana central de la provincia a una altitud media de 1100 – 1200 msnm. La temperatura promedio es algo superior a 20°C durante el verano y menor a 11°C durante el invierno. Dado que congrega la mayor densidad poblacional, con centros urbanos, rutas de acceso, disponibilidad energética, universidades y actores de la gestión pública, resulta más fácil acceder a los recursos necesarios para estas producciones.

### **1.3.2 Toma de muestras**

Se colectaron un total de 400 muestras de leche caprina durante los años 2007 y 2014 en las tres zonas de estudio: Valles Áridos (VA: 68 tambos), Quebrada (Q: 6 tambos) y Valles Templados (VT: 7 tambos) (Tabla 1.3.1).

Todas las muestras de leche cruda, correspondientes a la mezcla del ordeño diario matinal, fueron tomadas en un período de 10 días, empleando la de tres días consecutivos para la evaluación de parámetros fisicoquímicos y sanitarios; y la de dos fechas consecutivas para el análisis de parámetros microbiológicos.

Las muestras se recolectaron luego del ordeño, en vasos estériles, se conservaron refrigeradas (4°C) y fueron remitidas al laboratorio para su evaluación dentro de las 24 h.

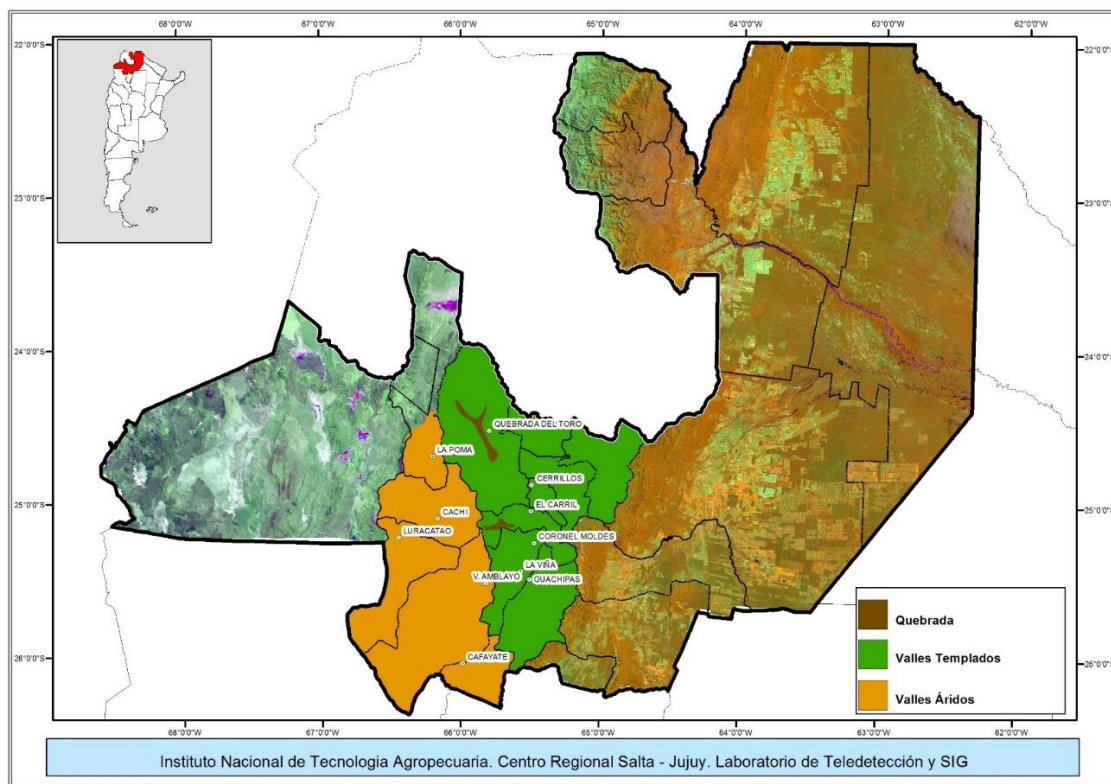
Se registró el tipo de ordeño (manual o mecánico), biotipo (Anglo-nubian, Saanen, Mestiza, Alpina, Toggenburg) y tercio de lactancia en el cual se encontraba la cabra en el momento de ordeño: primer tercio (hasta los 90 días después del parto), segundo tercio (entre los 90 y 180 días después del parto), tercer tercio (entre los 180 días y hasta el final de la lactancia, aproximadamente 270 días).

**Tabla 1.3.1.** Zonas agroecológicas de estudio, número de tambos muestreados por cuenca y período de muestreo.

Zona	Cuenca	Nº de tambos	Año
VA	Amblayo	22	2007-2008
	Cachi La Poma	4	2008-2009
	Luracatao	33	2013-2014
	Cafayate	9	2008
Q	Quebrada del Toro	6	2012-2013
VT	Valle de Lerma	7	2007 a 2010 y 2013-2014

VA: Valles Áridos. Q: Quebrada. VT: Valles Templados.

La Figura 1.3.1, señala las tres zonas agroecológicas de la provincia de Salta de estudio: Valles Áridos, Quebrada y Valles Templados, y la ubicación de las cuencas donde se encontraron los tambos muestreados.



**Figura 1.3.1.** Zonas Agroecológicas de estudio y ubicación de las cuencas correspondientes a los tambos muestreados. Conforman la cuenca de Valle de Lerma: Cerrillos, El Carril, Coronel Moldes, La Viña y Guachipas.

### 1.3.3 Calidad de la leche caprina

#### 1.3.3.1 Calidad higiénica

El análisis de la calidad higiénica de la leche, tiene como finalidad conocer los cambios en la leche a consecuencia de la intervención del ser humano durante el manejo de la producción. En este sentido se seleccionaron tres indicadores: el recuento de aerobios mesófilos (RAM), los coliformes totales (CT) y el conteo de células somáticas (CCS). Este último, representa las células de descamación de las glándulas mamarias del animal que se desprenden de estas llegando a la leche, sumado a los glóbulos blancos circulantes. Este proceso biológico puede deberse a factores fisiológicos, naturales del animal, como a la posibilidad de presencia de inflamación de las glándulas mamarias debido, en la generalidad de los casos, a agentes etiológicos microbiológicos.

#### Calidad microbiológica

Las evaluaciones de microorganismos indicadores de calidad higiénica de leche caprina, se realizaron según las directrices del Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2000). Se cuantificaron los microorganismos viables cultivables mediante el recuento de bacterias aerobias mesófilas y recuento de coliformes totales.

#### - *Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM)*

El método utilizado fue el recuento en placa. Se tomaron 10 mL de la muestra que fueron transferidas a 90 mL solución reguladora de peptona, la solución se homogenizó en vortex. Posteriormente se tomó 1 mL de la solución que fue colocada en tubos conteniendo 9 mL de agua peptonada para realizar las correspondientes diluciones. Finalmente se tomó 1 mL de cada dilución y se llevó a caja de Petri con el agregado de 15 mL de medio de cultivo Agar recuento en placa (ARP-Britania. Composición: extracto de levadura 2,5 g/L, tripteína 5 g/L, glucosa 1g/L, agar 15 g/L). Luego de 72 h a 30°C se realizó el recuento de colonias.

- *Coliformes totales (CT)*

El método utilizado fue el recuento en placa. De los tubos de dilución utilizados en RAM, se tomó 1 mL (de las diluciones previamente definidas) y se llevó a caja de Petri con el agregado de 15 mL de medio de cultivo Agar bilis lactosa rojo neutro cristal violeta (ABLV-Britania. Composición: extracto de levadura 3 g/L, peptona 7 g/L, sales biliares 1,5 g/L, lactosa 10 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, rojo neutro 0,03 g/L, cristal violeta 0,002 g/L, agar 15 g/L). Luego de 24 h a 37°C se realizó el recuento de colonias.

### Calidad sanitaria

- *Conteo de células somáticas (CCS)*

El Conteo de células somáticas se obtuvo por el método de microscopía fluorescente por citometría de flujo (cél/mL, Fossomatic), ISO 13366-2:2006 (IDF 148-2:2006).

### **1.3.3.2 Calidad fisicoquímica**

Este aspecto de la calidad de la leche, permite indagar sobre los equilibrios fisicoquímicos de la leche y las posibles alteraciones de la misma por acción de microorganismos. En tal sentido, los parámetros físicos-químicos evaluados fueron: pH (potenciometría), Acidez (°Dornic), y Lipólisis ( $\mu\text{eq/mL}$ ).

- *pH en leche caprina*

Se evaluó por potenciometría, empleando un pH-metro marca (OAKTON pH 510 series y electrodo Schott Z 509 para leche) calibrado con soluciones de referencia o buffer. Todas las muestras se midieron a la misma temperatura.

- *Acidez en leche caprina*

La determinación de acidez en leche se realizó mediante la norma IRAM 14005/1976 modificada. A partir de una solución madre de NaOH (1 N), se preparó una solución de NaOH 0,111 N. Se valoró con solución estándar de HCl 0,1 N y a partir de ésta se calculó la concentración real del NaOH y el factor de corrección de la solución.

Se midió por duplicado 10 mL de muestra homogénea en tubo de ensayo. Se tituló con la solución valorada de NaOH 0,111 N hasta llegar a pH 8,30 utilizando electrodo a 21°C de temperatura.

Se registró el volumen de solución de NaOH utilizado en la titulación de cada alícuota y el factor de corrección de la solución de NaOH empleada. Estos registros, se utilizaron para calcular la acidez luego de aplicar la ecuación 1:

$$Ac = V_g * 10 * f_c \quad (1)$$

Donde:

Ac: Acidez en grados Dornic (°D).

Vg: Volumen en mL de NaOH gastado en la titulación.

fc: Factor de corrección del NaOH 0,111 N.

El resultado final de la medición se obtuvo promediando los resultados obtenidos en las repeticiones para cada muestra de leche y se expresó en grados Dornic (°D).

#### - *Lipólisis*

La determinación de Lipólisis se realizó por titulación Deeth. Se termizó la leche a 40°C y se homogeneizó. Se tomaron 3 mL de cada muestra (21°C) o agua para el blanco y se colocó en una probeta de 50 mL. Se agregaron 10 mL de mezcla para lipólisis (40 partes en volumen de alcohol isopropílico, con 10 partes de éter de petróleo 30-65°C y una parte de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N); 6 mL de éter de petróleo y 4 mL de agua destilada. Se mezcló en agitador vórtex vigorosamente durante 15 segundos. Se dejó reposar de 5 a 10 min hasta que se separaron dos fases. Se tomó una alícuota de 5 mL de sobrenadante y se colocó en un tubo de ensayo. Se tituló con solución de KOH 0,01 N usando 6 gotas de fenolftaleína metanólica como indicador. Se observó que la solución pasara de incolora a rosa claro.



El valor de lipólisis obtenido corresponde a ácidos grasos libres en micro equivalentes por mililitro de leche ( $\mu\text{eq/mL}$ ) (ecuación 2):

$$\text{Deeth (microeq/mL)} = \frac{(V - V_b) * N * f * 1000}{3 * R} \quad (2)$$

Donde:

V: volumen en mL de KOH 0,01 N gastado en la titulación de la muestra

V<sub>b</sub>: volumen en mL de KOH 0,01 N gastado en la titulación del blanco

N: normalidad del KOH usado: 0,01

f: factor de corrección del hidróxido

R = volumen alícuota titulada/volumen total sobrenadante, siendo:

Volumen sobrenadante = volumen total - volumen precipitado

Volumen total: 23 mL

3: corresponde a los mililitros de muestra analizados

Las determinaciones se hicieron por triplicado y se informaron para cada muestra un promedio de los resultados obtenidos de las repeticiones.

### 1.3.3.3 Análisis estadístico

Se estimaron estadísticos descriptivos para las variables físico-químicas: pH, acidez ( $^{\circ}\text{D}$ ) y lipólisis ( $\mu\text{eq/L}$ ) por zona, tercio del periodo de lactancia y tipo de ordeño.

Para cada una de las características fisicoquímicas, se ajustó un ANAVA teniendo en cuenta el efecto de la cuenca y del tercio de lactancia que fue evaluado en cada cuenca. Las comparaciones de medias se realizaron con test a posteriori LSD de Fisher.

Los indicadores que determinan calidad higiénica de la leche: RAM ( $\text{ufc/mL}$ ), CT ( $\text{ufc/mL}$ ) y CCS ( $\text{cél/mL}$ ) fueron transformados a la escala logarítmica, conformando variables normalizadas. Se ajustó un modelo de Análisis de la Varianza (ANAVA o ANOVA por sus siglas en inglés ANalysis Of VAriance) considerando el efecto del tipo de ordeño,

la zona agroecológica en la que se evaluó el indicador y el tercio de lactancia en la que se encontraba la cabra en el momento de la evaluación.

Se clasificó la calidad higiénica de la leche como buena o mala según los valores recomendados por el Código Alimentario Argentino (CAA). A través de esta clasificación, se estudió la asociación entre la calidad y el tipo de ordeño, aplicando el estadístico chi-cuadrado de Pearson. Entonces, se consideró una leche caprina cruda de calidad BUENA cuando el RAM era inferior a 500000 ufc/mL y el CCS fuera inferior a 1500000 cél/mL. Si el RAM o el CCS superaban estos umbrales, la calidad higiénica de la leche fue clasificada como MALA.

Se analizó la relación entre el RAM y CT a través de un análisis de regresión lineal simple.

## 1.4 Resultados y Discusión

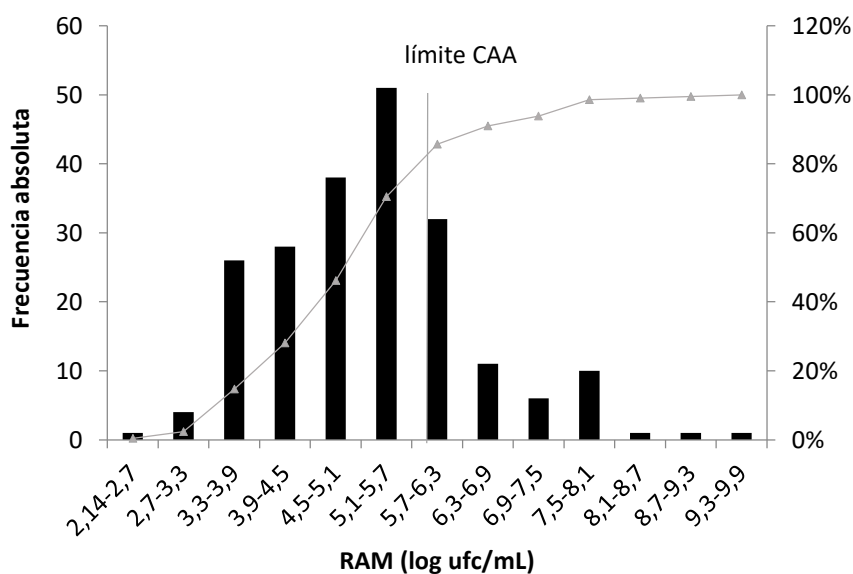
### 1.4.1 Calidad de leche caprina

Se analizaron la incidencia de los parámetros indicadores de higiene y fisicoquímicos, en forma separada.

#### 1.4.1.1 Calidad higiénica

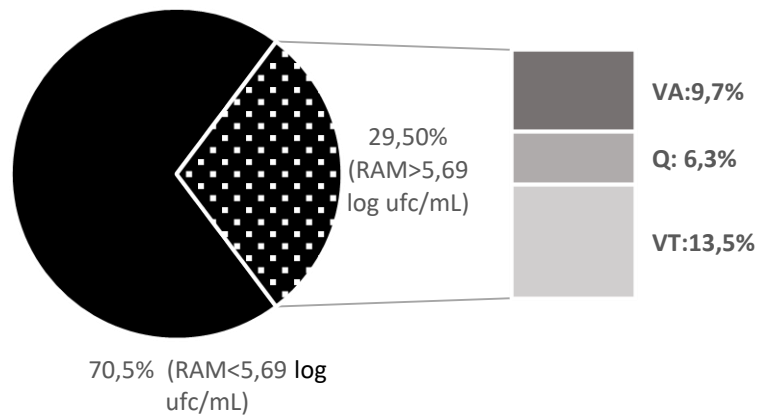
Se analizó la distribución de frecuencia de las variables de calidad higiénica (RAM, CT y CCS) durante los años 2007-2014, sobre un total de 321 datos registrados.

El rango de variación de los valores de RAM fue 2,64 - 9,69 log ufc/mL, siendo más frecuentes las muestras de leche cuyos valores se encontraron entre 5,1 y 5,69 log ufc/mL, intervalo que incluye el resultado de la media (5,23 ufc/mL). El 70,5% de los datos estuvieron dentro de los límites especificados por el Código Alimentario Argentino (CAA: 500000 ufc/mL equivalente a 5,69 log ufc/mL) (Figura 1.4.1). Por otro lado, Valles Templado (VT) es la zona que presentó la mayor cantidad de muestras fuera de ese límite (13,5%), seguida por Valles Áridos (VA) con el 9,7% (Figura 1.4.2).



**Figura 1.4.1** Frecuencias absolutas y frecuencias relativas (%) acumuladas de los recuentos de aerobios mesófilos en las tres zonas en estudio. Años 2007-2014.

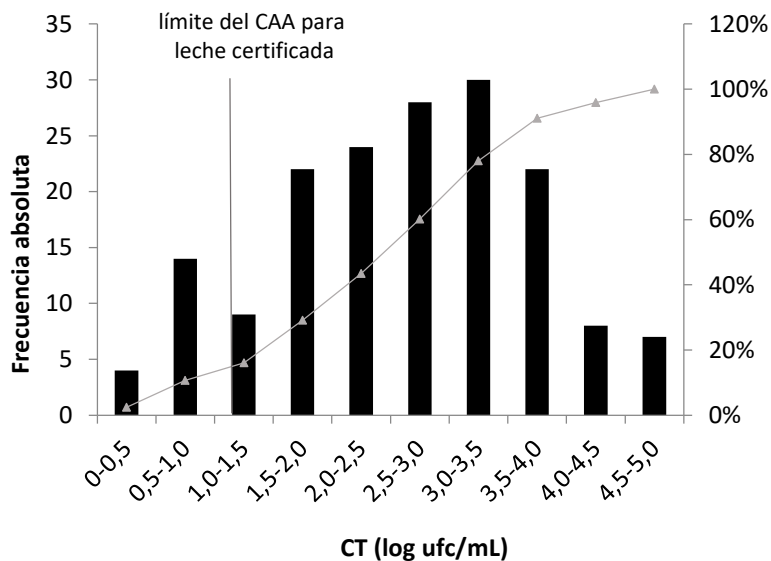
RAM: Recuento aerobios mesófilos.



**Figura 1.4.2** RAM y su distribución porcentual de valores mayores al límite del CAA (5,69 log/ufc/mL) por zona evaluada.

RAM: Recuento aerobios mesófilos. VA: Valles Áridos. Q: Quebrada. VT; Valles Templados.

En un análisis similar (análisis de frecuencia), el rango de valores para CT durante los años 2007 – 2014 fue 0 - 4,79 log ufc/mL. El CAA no presenta valores límites para CT en leche caprina cruda, pero sí para leches bovina cruda certificada (hasta 10 ufc/mL), considerando este último valor, el 10,7% de las muestras, podrían haber sido clasificadas por el CAA como leches crudas certificadas. El valor medio para CT fue de 2,19 log ufc/mL, si bien este intervalo acumula el 43,5% de los datos, se observa una tendencia hacia valores mayores, con frecuencias absolutas superiores en el intervalo 3,0-3,5 log ufc/mL (Figura 1.4.3).

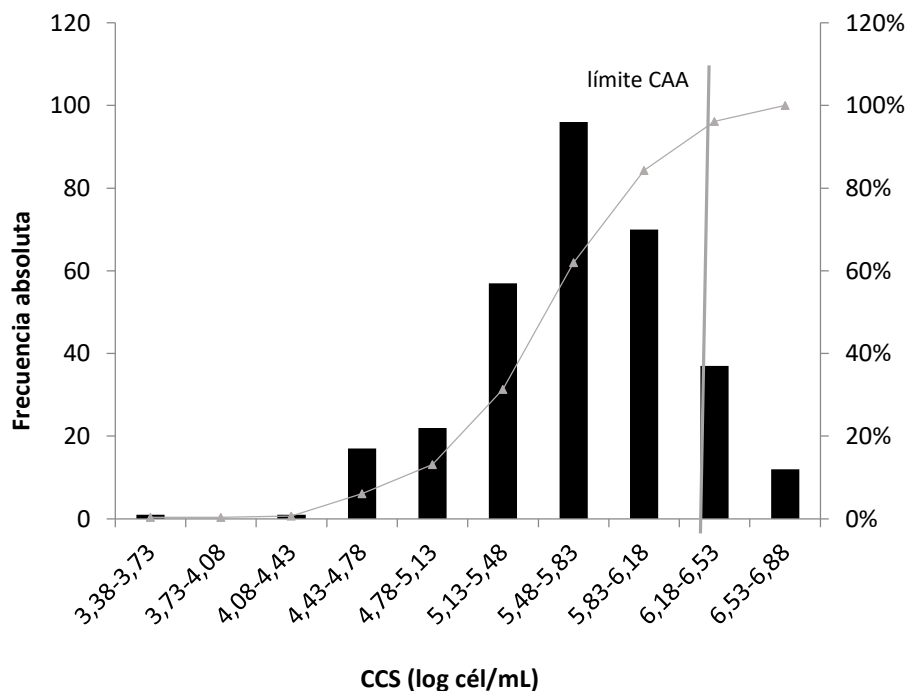


**Figura 1.4.3.** Frecuencias absolutas y relativas % acumuladas de Coliformes totales en las tres zonas en estudio. Años 2007-2014.

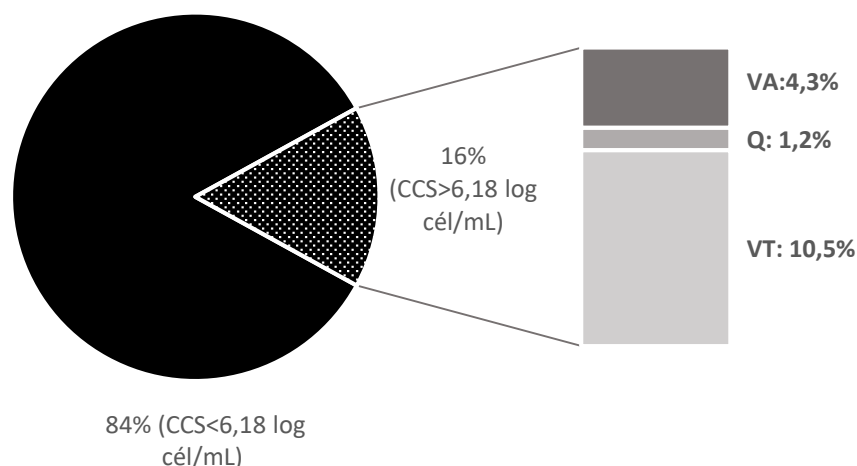
CT: Coliformes Totales.

El rango de valores para CCS fue 3,48 - 6,86 log cél/mL. El 84% de los datos, mostraron valores inferiores a los exigidos por el CAA (1500000 cél/mL, equivalente 6,18 log cél/mL). En Francia los límites son más estrictos: CCS: menor a 1000000 cél/mL, (Oficina Regional Interprofesional de Lait de Ch'evre de Poitou-Charentes), considerando este valor, el porcentaje de muestras por debajo de dicho límite es importante (%75) (Figura 1.4.4). Asimismo, en su trabajo de tesis Scaltritti (2012), propone como valor límite 650.000 cél/mL, calculado a partir de una base de 136 datos de INTA Salta y Catamarca. Considerando los resultados obtenidos en esta tesis, donde un alto porcentaje de muestras contienen valores inferiores a 1000000 cél/mL, alcanzar y sostener estos valores por los productores caprinos de Salta, puede ser una meta factible de realizar mediante el uso de herramientas de mejora continua de la calidad.

Del 16% de las muestras fuera del límite del CAA, el 10,5% fueron de VT, el 4,3% de VA y el 1,2% de Q (Fig.1.4.4 y Fig.1.4.5).



**Figura 1.4.4.** Frecuencias absolutas y relativas % acumuladas del Conteo de Células Somáticas, en las tres zonas en estudio. Año 2007-2014.  
CCS: Conteo de Células Somáticas.



**Figura 1.4.5.** Conteo de Células Somáticas y su distribución porcentual de valores mayores al límite del CAA (6,18 log células/mL), por zona evaluada.

VA: Valles Áridos. Q: Quebrada. VT: Valles Templados

Se obtuvieron medidas descriptivas de las características microbiológicas (RAM y CT) y sanitarias (CCS), analizadas por zona de estudio: VA, Q y VT, en la provincia de Salta, evaluadas entre los años 2007 y 2014 (Tabla 1.4.1).

El valor promedio de RAM de cada zona, se encontró por debajo de lo permitido por el CAA (500.000 ufc/mL equivalente a 5,69 log ufc/mL). El valor máximo más alto correspondió a VT. La variabilidad, expresada en términos de coeficiente de variación, en las tres zonas analizadas fue similar y menor al 24%.

Los valores promedios en CT para las tres zonas en estudio, no superaron los 2,39 ufc/mL (equivalente 246 ufc/mL). La variabilidad de los datos fue alta, superando el 50% en VA y Q, por lo que la diferencia se da entre los tambos dentro de la región, lo que sugirió en esta variable, como un buen indicador de la falta de control de las prácticas de manejo en producción primaria y manejo de ordeño.

El recuento de aerobios mesófilos (RAM) es comúnmente usado para conocer el estado de inocuidad de la leche; en su valor, se encuentran contenidas bacterias lácticas beneficiosas para el ser humano; entonces su interpretación puede ser confusa. Al incluir la variable CT en el análisis, se ponderó directamente el compromiso del ambiente y del ser humano en la inocuidad.

**Tabla 1.4.1** Características microbiológicas y sanitaria de la leche caprina cruda para tres zonas agroecológicas de la provincia de Salta. Años 2007-2014.

Variable	Zona	n	Valor Promedio	CV (%)	Mín	Máx
RAM	VA	110	5,12	23,74	3,04	7,92
	Q	28	4,54	21,51	2,64	6,18
	VT	72	5,67	18,35	3,41	9,59
CT	VA	93	2,05	53,93	0,0	4,79
	Q	26	2,25	52,78	0,30	4,77
	VT	59	2,39	39,11	0,00	4,30
CCS	VA	221	5,65	8,96	4,36	6,86
	Q	28	5,55	8,63	3,48	6,26
	VT	65	5,90	8,07	4,56	6,85

VA: Valles Áridos. Q: Quebrada. VT: Valles Templados. RAM: Recuento de Aerobios Mesófilos. CT: Coliformes Totales. CCS: Conteo de Células Somáticas. n: tamaño muestral. CV: Coeficiente de Variación. Min, Máx.: valores mínimos y máximos

El CAA no incluye, para leche caprina cruda, valores de CT, sin embargo, los resultados obtenidos están por debajo a los reportados en estudios similares realizados en Malasia, Grecia y Portugal (Morgan y col., 2003; Chye y col., 2004; Kondyli y col., 2012) que muestran recuentos entre 4 y 7 log ufc/mL para leche cruda caprina.

Los valores promedios del CCS, para las tres zonas en estudio, no superaron los 5,99 log cél/mL (equivalente 977.237 cél/mL) estando todos por debajo de los valores recomendados por el CAA (1500000 cél/mL equivalente a 6,18 log cél/mL). Los valores mínimos y máximos observados en las muestras de leche, mostraron una variabilidad menor al 9%.

Los valores de CT y CCS, se encontraron cercanos a los registrados en zonas productivas de Francia cuya calidad, con valores medios entre 2,02 y 2,24 log ufc/mL para CT, y 5,99 y 6,07 log cél/ml para CCS, fue la mejor observada entre los tres países europeos con mayor actividad caprina (Francia, Portugal y Grecia), (Morgan y col., 2003). Las similitudes se dieron incluso en los coeficientes de variación, bajos para CCS (9,03), y altos para CT (CV mayores o iguales a 55,9%), valor que indica cómo influye la diversidad de manejo en la calidad higiénica de la leche caprina cruda.

La Tabla 1.4.2, muestra el ANAVA de las variables RAM, CT y CCS, discriminando zona de procedencia, tercio de lactancia, biotipo y tipo de ordeño. Los efectos cruzados entre estas variables no resultaron significativos en ningún caso.

Según zona de procedencia, el ANAVA ajustado determinó para RAM y CCS diferencias estadísticamente significativas (valor  $p < 0,5$ ) entre las tres zonas (VA, Q, VT).

La zona VT mostró los mayores valores promedio para las tres variables. Los ambientes en los que se encuentran los establecimientos en VT, son más húmedos y con mayor temperatura durante todo el año, favoreciendo estas condiciones, el desarrollo de microorganismos, incidiendo en los valores de RAM y CCS, en este último de forma indirecta.

El biotipo Saanen, presentó los valores promedio más altos para las tres variables, las diferencias significativas se observan en RAM, donde Saanen se diferenció estadísticamente de la raza Mestiza y Toggenburg; y en el CCS donde Saanen y Anglo se diferenciaron de Toggenburg. En ninguno de los casos analizados, se registraron valores que superaran los límites permitidos por el CAA.

**Tabla 1.4.2.** Caracterización higiénica y sanitaria según zona de procedencia, tercio de lactancia, biotipo y tipo de ordeño.

Variable		RAM (log ufc/mL)			CT (log ufc/mL)			CCS (log cél/mL)		
		n	VP±DE		n	VP±DE		n	VP±DE	
Zona	VA	110	5,12±1,21	b	93	2,05±1,10	a	220	5,65±0,50	b
	Q	28	4,54±0,98	c	26	2,25±1,19	a	25	5,55±0,48	b
	VT	72	5,65±1,04	a	59	2,38±0,94	a	68	5,89±0,47	a
Biotipo	Anglo-nubian	15	5,43±0,75	ab	12	1,70±0,97	b	15	6,07±0,58	a
	Saanen	52	5,63±1,13	a	41	2,52±0,90	a	37	5,93±0,37	a
	Mestiza	139	5,06±1,22	b	121	2,13±1,12	ab	248	5,64±0,51	ab
	Alpina	sd	sd		sd	sd		3	5,54±0,32	ab
	Toggenb.	9	5,08±0,50	b	3	2,03±0,57	ab	9	5,52±0,28	b
Tercio de lactancia	1º	23	5,54±0,91	ab	12	2,09±0,96	b	23	5,82±0,31	ab
	2º	53	6,06±1,41	a	30	2,85±0,82	a	53	5,65±0,40	b
	3º	81	5,19±0,93	b	50	2,12±0,99	b	81	5,94±0,43	a
Tipo de ordeño	Manual	147	5,05±1,22	b	124	2,08±1,11	a	268	5,68±0,52	a
	Mecánico	62	5,63±0,97	a	53	2,42±0,93	a	44	5,72±0,42	a

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (valor  $p < 0,05$ ) entre valores de la misma columna.

RAM: Recuento de Aerobios Mesófilos. CT: Coliformes Totales. CCS: Conteo de Células Somáticas. sd: sin determinar. n: tamaño muestral. VP: Valor Promedio. DE: Desvío Estándar.



Las variables fueron analizadas por separado para lograr un mejor entendimiento del comportamiento registrado.

RAM es una variable que refleja el ambiente en que los animales se desarrollan, Saanen presentó los mayores valores de RAM, este un biotipo utilizado mayormente en VT, región de clima templado, alta humedad y sistema productivo intensivo. Adicionalmente, la raza Mestiza fue la que presentó el menor valor de RAM; estos animales estuvieron bajo un sistema extensivo en zona árida (baja humedad y alta amplitud térmica). Atendiendo este contexto, las diferencias en los valores de RAM podrían atribuirse más a las condiciones climáticas y a las condiciones del sistema productivo que a la raza. Asimismo, Anglo-nubian con Mestiza y Toggenburg, no mostraron diferencias estadísticamente significativas, es importante mencionar que Toggenburg fue un solo rebaño en VT y que la variación muestral fue mayor a las restantes, esto dificulta discriminar las diferencias.

Por otro lado, un alto porcentaje (63%) de los animales ordeñados mecánicamente son del biotipo Saanen, como se discutirá luego, es probable que el tipo de ordeño sea la razón por la cual CT en Saanen sea mayor que los otros biotipos evaluados. No se encontraron publicaciones que comparen estas variables higiénicas por razas.

La información consultada sobre CCS, mostraron que no hay una relación clara entre esta variable y las razas. Suarez y col. (2012), verificaron que Saanen y Alpina presentaron valores mayores que Toggenburg, coincidiendo con lo encontrado en esta tesis. Sin embargo, Suarez y col. (2012), mencionaron que otros autores no observaron diferencias entre razas, y otros, obtuvieron resultados contrarios a los medidos por él.

El segundo tercio de la lactancia, presentó los mayores valores de RAM y CT mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto al primer y tercer tercio, esto puede ser explicado si se tiene en cuenta que, al iniciarse este tercio, se produce el cambio de una estación seca a otra húmeda en todos los sistemas productivos evaluados.

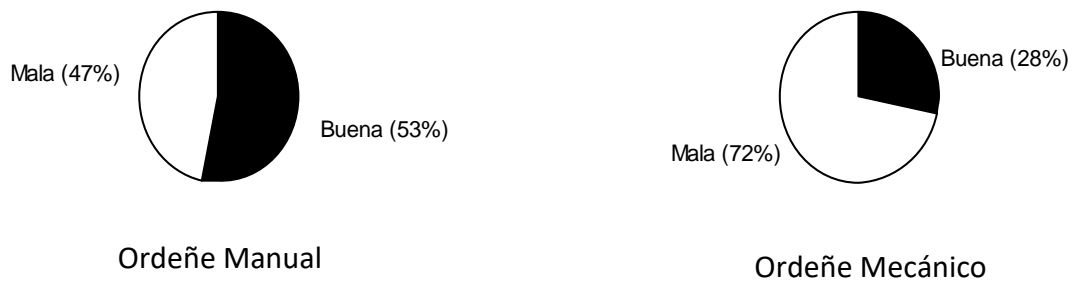
Foschino y col. (2002), midió RAM en 10 tambos caprinos de Italia, sin encontrar relación significativa entre este indicador y el periodo de muestreo, contradiciendo lo obtenido en los presentes resultados. Estos autores cuantificaron los cambios en 10 tambos durante 6 meses, por otro lado, y en el presente caso, se cuantificaron 81

tambos, distribuida la toma de las muestras en 7 años; es posible que esta diferencia se deba al campo experimental de un caso y otro.

El valor promedio de CCS durante el segundo tercio fue menor, diferenciándose estadísticamente con respecto al primer y tercer tercio, coincidiendo con lo relevado por Pirisi y col. (2007), quien expuso que el nivel normal de células somáticas no mastíticas en leche caprina se caracteriza por una gran variabilidad, siendo particularmente alta en el período calostrado (primer tercio) y al final de la lactancia (tercer tercio), pudiendo estar influida por diversos factores como la edad del animal, su nivel de producción, el estrés, el estado sanitario del animal, etc.. Sin embargo, Suarez y col. (2012), encontraron que los valores de CCS aumentaron conforme transcurrió la lactancia, siendo alto el nivel de implicancia obtenido para este factor en CCS.

El análisis del efecto de la tecnología de ordeño (manual vs mecánico) sobre los indicadores estudiados (RAM, CT y CCS), mostró que solo RAM es sensible a este efecto, siendo mayor el promedio encontrado para ordeño mecánico, coincidiendo estos resultados con los obtenidos por Haenlein (2002). Se verificó que tanto el ordeño manual como el mecánico, no afectaron CT (no se encontraron diferencias estadísticamente significativas), aunque fue mayor la variabilidad en el ordeño mecánico.

Se analizó la asociación entre el tipo de ordeño con la calidad de la leche caprina (buena calidad: RAM<5,69ufc/ml y CCS<6,18 cél/mL, mala calidad: valores superiores a los indicados). El estadístico chi-cuadrado de Pearson indicó que la calidad de la leche está asociada al tipo de ordeño ( $p<0,05$ ). El 53% de las muestras de leches obtenidas a partir de ordeño manual fueron clasificadas como de buena calidad, mientras que el 28% en el caso de ordeño mecánico (Figura 1.4.6). Estas diferencias pueden deberse a las condiciones de limpieza de las máquinas de ordeño. El cociente de chance (odds ratio) estimado: 1/3, indicó que hay aproximadamente 3 veces más chances de obtener leche clasificada como de buena calidad higiénica cuando el ordeño es del tipo manual respecto al mecánico. Esto da cuenta de la importancia de promover prácticas de manejo en aquellos establecimientos que cuenten con este tipo de ordeño donde la tecnología puede ir en detrimento, si no está bien manejada.



**Figura 1.4.6.** Diagrama de sectores para ordeño del tipo manual y mecánico según calidad higiénica de leche caprina cruda, determinada por los indicadores RAM y CCS.  
Buena calidad: RAM < 500000 ufc/mL y CCS < 1500000 cél/mL, Mala calidad: RAM y/o CCS mayores a los valores indicados.

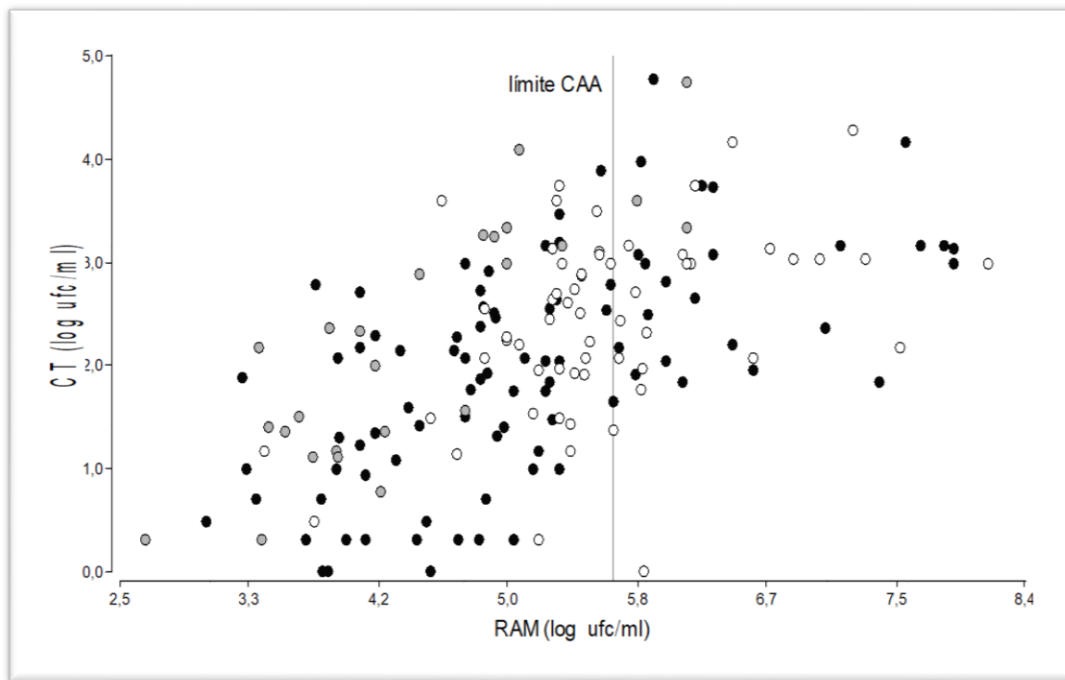
En general la leche caprina analizada en los sistemas productivos en estudio, fue de buena calidad, puesto que, de acuerdo a los parámetros de calidad microbiológica e higiénica, no superaron los límites establecidos por el CAA. Los valores medios de RAM cumplieron con las normativas establecidas en EEUU (Directive 92/46 modificada por Directive 94/71) para leche caprina cruda dentro de los cuales, tienen en cuenta el si se aplicará tratamiento térmico a la leche antes de la producción del queso (RAM < 1500000 si se aplica tratamiento térmico, RAM < 500000 si no se aplica tratamiento térmico). Sin embargo, si se compara con algunos países europeos (Francia, España, Italia, Grecia, Portugal, Noruega y Países Bajos), donde el sector caprino está bien desarrollado e implementa el sistema “Pago por calidad”, para el cual el valor de referencia es < 50000 ufc/mL, y las leche con valores > 200000 ufc/mL son clasificadas como clase C, sería necesario implementar mejoras en el manejo. En igual sentido, teniendo en cuenta el criterio de EEUU para leche que no reciben tratamiento térmico, y lo exigido por el CAA para leche cruda caprina, sería necesario desarrollar e implementar herramientas de gestión de la inocuidad que introduzcan las mejoras pertinentes, en los establecimientos cuyas muestras arrojaron valores mayores a 500000 ufc/mL, en este caso el 29,5%.

Para CCS, países como EEUU y Francia presentan límites más estrictos: < 1000000 cél/mL (Directive 92/46 modificada por Directive 94/71 EEUU, y de acuerdo con la calidad en la región de Poitou-Charentes, Francia, especificaciones 2001, Oficina Regional Interprofesional de Lait de Ch'evre de Poitou-Charentes). Estos límites fueron

alcanzados por los valores promedios de CCS en los sistemas productivos de VA, Q y VT, y cuyos valores extremos pueden ser reducidos con un sistema de mejora continua.

#### Análisis de la asociación estadística entre RAM y CT

Se encontró una asociación estadísticamente significativa (valor  $p < 0,0001$ ) y positiva entre las variables RAM y CT. La tasa de cambio estimada de CT fue 0,58 log ufc/mL por cada aumento unitario de RAM. Esta relación lineal positiva confirmó lo expuesto por Taverna y col. (2002), donde se espera que a medida que aumenta el RAM, halla un aumento de CT. El modelo ajustado indicó valores promedios de RAM diferentes de cero cuando no hay CT (Figura 1.4.7), lo cual se condice con la naturaleza de RAM.



**Figura 1.4.7.** Relación entre RAM (log ufc/mL) y CT (log ufc/mL) para todas las cuencas estudiadas.

VA: círculos negros, Q: círculos grises, VT: círculos blancos

Como se mencionó anteriormente, el CAA no especifica un límite para CT en leche caprina cruda como lo hace para RAM. Sin embargo, es recomendable contar con más de un indicador al momento de evaluar la situación higiénica de una muestra, habidas cuentas que RAM es un indicador que incluye también bacterias benéficas, como lo son las bacterias lácticas; en efecto, valores de RAM altos pueden estar enmascarando alto contenido de bacterias lácticas. En este sentido, luego de verificar

que existe una asociación positiva entre RAM y CT y con la finalidad de proponer un valor límite de control de CT para leche cruda caprina, se analizó la población de datos de las muestras cuyos valores de RAM fueron inferiores a 5,69 log ufc/mL (límite propuesto por el CAA); resultando esto en una población que consto con el 70% del total de datos. Se realizó un análisis de regresión (Tabla 1.4.7), por medio del cual fue posible verificar que con el aumento de RAM aumentó CT ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,52$  y  $R^2 = 0,27$ ). También a partir de la misma se obtuvo la siguiente ecuación:

$$CT(n) = \beta_0 + \beta * RAM(n) \quad (3)$$

Siendo n el número de muestras

**Tabla 1.4.3.** Regresión lineal entre CT y RAM, con muestras cuyos valores de RAM fueron inferiores a 5,69 log ufc/ml.

Coef	Est	E.E	LI(95%)	LS (95%)	T	p-valor
Constante	-1,59	0,52	-2,61	-0,56	-3,07	0,0027
RAM	0,74	0,11	0,52	0,96	6,80	<0,0001

La ecuación (1) fue aplicada al valor límite del CAA para RAM (5,69 log ufc/mL), de esta manera se estimó el valor de CT=416 log ufc/mL, el cual podría ser considerado como límite de aceptación para CT de leche cruda caprina de Salta.

$$CT = -1,59 + 0,74 * 5,69$$

$$CT = 2,62 \text{ log ufc/mL, por lo tanto}$$

$$CT^* = 416 \text{ log ufc/mL; siendo } CT^* \text{ el } \log^{-1} \text{ de CT}$$

#### 1.4.1.2 Calidad fisicoquímica de la leche caprina

Se analizaron los parámetros físicos-químicos: pH, acidez y lipólisis en la leche caprina, según zona de procedencia, biotipo, periodo de lactancia y tipo de ordeño (Tabla.1.4.4).

**Tabla 1.4.4** Caracterización físico-química de la leche según zona, biotipo tercio de lactancia y tipo de ordeño. Años 2007-2014.

Variable		pH		Acidez (°D)		Lipolisis (µeq/mL)	
		VP±DE		VP±DE		VP±DE	
Zona	VA	6,70±0,09	b	17,05±2,36	a	1,91±0,43	a
	Q	6,71±0,08	ab	15,15±1,38	b	Sd	
	VT	6,74±0,11	a	13,93±2,48	c	1,73±0,42	a
Biotipo	Anglo	6,72±0,06	bc	15,7±2,23	b	1,69±0,29	a
	Saanen	6,75±0,10	b	13,72±2,4	c	1,82±0,45	a
	Mestiza	6,70±0,09	c	16,79±2,38	a	1,89±0,44	a
	Alpina	7,02±0,06	a	9,75±0,64	d	Sd	
	Toggenburg	6,75±0,20	bc	12,82±2,3	cd	Sd	
Tercio de lactancia	1º	6,78±0,13	a	14,2±3,4	b	1,87±0,37	a
	2º	6,71±0,09	b	14,86±2,7	b	1,88±0,44	a
	3º	6,72±0,07	b	16,77±2,36	a	2,08±0,49	a
Tipo de ordeño	Manual	6,75±0,09	a	16,64±2,42	a	1,86±0,43	a
	Mecánico	6,70±0,11	b	13,86±2,63	b	1,93±0,45	a

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (valor  $p < 0,05$ ) dentro de una misma columna.

VP: Valor promedio. DE: Desvíos Estándar. Sd: sin determinar

Los valores de pH y acidez estuvieron acordes a los recomendados por el CAA (pH: 6,57 - 6,96. Acidez: 14 - 22 °D).

Los valores promedios de pH en las tres zonas en estudio fueron similares. Sin embargo, las diferencias fueron estadísticamente significativas en la acidez de las leches, siendo en VA donde se observó los valores más altos.

El valor promedio de pH más bajo se observó en el biotipo mestizo, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre Saanen y Alpina. Asimismo, este biotipo (mestizo), fue el que produjo las leches más ácidas, mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto a los otros biotipos. Es importante mencionar que la acidez natural de la leche, es debida a diferentes componentes de la misma: caseínas, sustancias minerales, ácidos orgánicos y fosfatos disueltos en la leche. Existe una relación entre el valor de acidez y proteína, puesto que su cuantificación por

metodología de titulación significa ponderar toda especie disuelta en la leche con carga negativa, esto incluye entre otras a las proteínas. Entonces, alto contenido de proteínas hace que la acidez sea alta, esto dado cuando las condiciones microbiológicas de la leche sean adecuadas (Negri, 2005), como en este caso. En el biotipo mestizo, el volumen de producción (litros/día) es menor con respecto a los demás biotipos, por lo que los componentes de la leche están más concentrados (Orosco y col; 2011). En suma, altos valores de proteínas, ocasionan altos valores de acidez; no se trata de un defecto, por el contrario, es una cualidad de la leche.

A su vez, VA y Q tienen entre el 96 y 100 % de raza mestiza, mientras en VT hay más variedad de razas entre las cabras que conforman los rebaños ocupando Saanen el 67% y Anglo el 27%. Entonces, la raza mestiza cuenta con mayores valores de proteínas (mayor acidez titulable) y esta, a su vez, se encuentra mayormente en VA y Q, de esta manera se explica los valores altos de acidez en estas zonas.

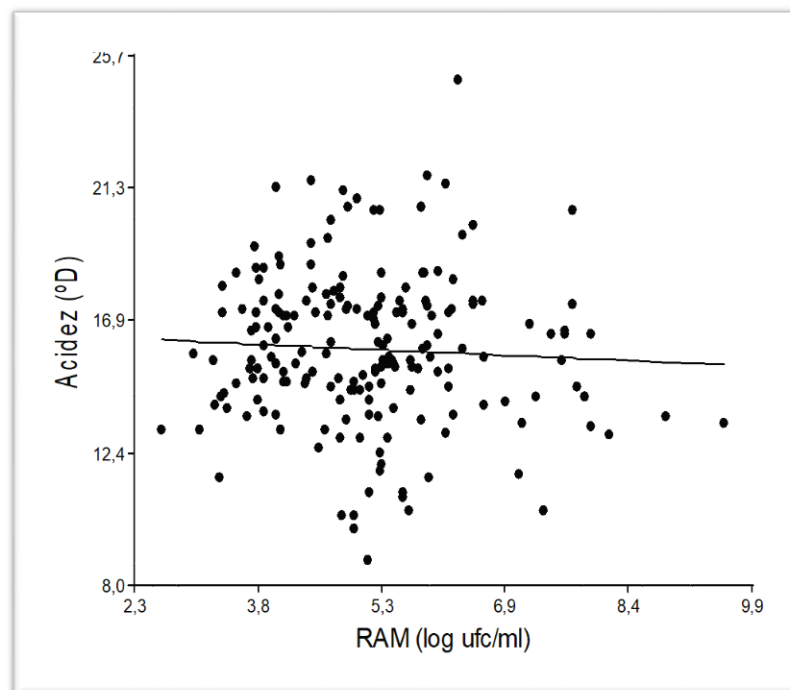
El tercio de lactancia influyó en la acidez de la leche mostrando los valores más altos durante el tercer tercio; debiéndose a los cambios fisiológicos propios de la lactancia y a los niveles de producción. Martínez (2018), explica que la producción de leche a lo largo de toda la lactancia no es constante, siendo máxima en el 1º tercio mientras que disminuye entre un 25 y 50% en el tercer tercio. Es importante destacar que una mayor producción de leche tiene una correlación negativa con la composición (contenido de sólidos: grasa y proteína) y viceversa. Por lo que a menor producción de leche (agua), la cantidad de sólidos se encuentra concentrada.

Se observó mayor acidez en el ordeño de tipo manual que en el mecánico, lo cual puede ser explicado porque los animales ordeñados manualmente son mestizos, y naturalmente cuentan con acidez mayor. Por otro lado, los valores de pH fueron más bajos en el ordeño mecánico; es válido considerar que el pH muestra un aspecto de la estabilidad de la leche en relación a los componentes disueltos en la misma, en este caso aun cuando fueren diferentes significativamente, ambos están dentro de los valores normales para leche caprina (Chavez y col., 2011, Orosco y col., 2012).

Se observaron valores promedios de lipólisis normales en todas las leches analizadas (Morgan, 2001; Chaves y col., 2007); ninguno de los factores estudiados, mostraron incidencia sobre este parámetro.

### Análisis de la relación RAM y Acidez

Se estudió la relación entre RAM (log ufc/mL) y la acidez (°D) de todas las muestras a través de un modelo de regresión lineal simple (Fig.1.4.8), y no se encontró una asociación estadísticamente significativa (valor  $p=0,4$ ). La acidez desarrollada, es atribuida a la intervención de microorganismos sobre la lactosa, degradándola y generando ácido láctico y otros ácidos (Negri, 2005). Para este estudio donde los valores de RAM fueron adecuados según el CAA, la diferencia de acidez entre las zonas puede ser atribuida al biotipo más que al manejo y ordeño



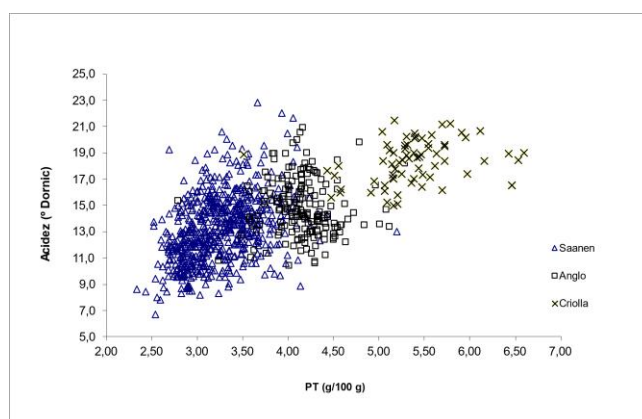
**Figura 1.4.8.** Regresión lineal entre RAM (log ufc/mL) y acidez (°D) para todas las cuencas estudiadas.

### Relación entre parámetros fisicoquímicos, el período de lactancia y el tipo de ordeño

Se analizó la evolución del pH, acidez y lipólisis según el período de lactancia y el tipo de ordeño (Figura 1.4.9). Se verificó que el pH del ordeño mecánico, es superior al manual durante el 1er tercio de la lactancia (Fig. 1.4.9 a), esto se puede asociar al manejo de los animales luego del descalostrado; en efecto el pH del calostro es mayor al de la leche, posiblemente los criterios para incluir animales al ordeño sean diferentes entre los productores con tecnología de ordeño manual vs mecánico; estos últimos incorporan animales al ordeño, antes que los que ordeñan manualmente.

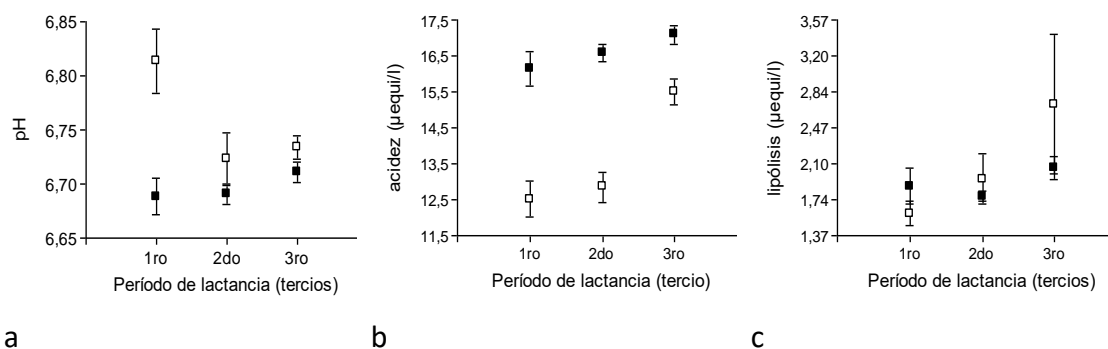


La acidez varió según el tercio de la lactancia, siendo mayor durante el tercer tercio; esto explicado por el efecto normal de concentración propio del final de la lactancia, aspecto que se verificó en ambos tipos de ordeño. Por otro lado, las leches obtenidas por ordeño manual, fueron más ácidas que por ordeño mecánico. Estos resultados quedan asociados al biotipo y no al tipo de ordeño, puesto que la acidez natural y normal del biotipo mestizo (que predomina en el ordeño manual), es mayor que el biotipo Saanen (biotipo que predomina en el ordeño mecánico). Esta afirmación surge de investigaciones propias del grupo como consecuencia de la evaluación de la acidez titulable según biotipo (Orosco y col., 2013) (Figura 1.4.9). En este grafico se observa que la acidez titulable se ve modificada por la concentración de proteína, siendo mayor para el biotipo mestizo y correspondiéndole al biotipo Saanen el menor valor promedio. Este comportamiento se verificó luego de corroborar el pH normal de la leche, al igual que RAM y CT.



**Figura 1.4.9.** Acidez de las muestras en función de la proteína total de cada biotipo.  
Fuente: Orosco y col., 2013.

En lipólisis, el ordeño manual mostró mayor variabilidad que el ordeño mecánico durante el tercer tercio de lactancia (Figura 1.4.9.c). El ordeño mecánico por su naturaleza, tiene mayor probabilidad de romper los glóbulos grasos de la leche e incrementar la lipólisis; este comportamiento es más marcado sobre el tercer tercio por el efecto de concentración de ese momento de la lactancia.



**Figura 1.5.0.** Valores promedio y su error estándar de las variables físico-químicas pH (a), acidez (b) y lipólisis (c) según periodo de lactancia (1er, 2do y 3er tercio) en las tres zonas lecheras caprinas en estudio, para dos tipos de ordeñe, manual (negro) y mecánico (blanco). Año 2007-2014.

## 1.5 Conclusiones

- Los parámetros para el control higiénico y sanitario de leche caprina seleccionados (RAM, CT y CCS), permitieron verificar que la calidad higiénica y sanitaria de leche caprina del NOA, está acorde con lo requerido por el CAA, otras normativas internacionales y con lo publicado por otros autores.
- Fue posible verificar que RAM se ve modificada por factores ambientales y por la intervención del ser humano; los cambios en CT pudieron ser asociados a los sistemas productivos y CCS, por su parte, pudo ser relacionado al ambiente y a los cambios fisiológicos del animal durante lactancia.
- El parámetro acidez, al fin de evaluar inocuidad, no solo incluye información sobre la manipulación del personal durante producción, sino también sobre el biotipo lechero, por lo que debe ser analizado en conjunto con otros indicadores como por ejemplo pH, RAM y proteínas.
- Finalmente, se propuso un valor límite de control para CT para leche caprina cruda de Salta, independientemente del sistema productivo, zona agroecológica y biotipo.

## Capítulo Nº 2: Indicadores microbiológicos de eficiencia de tratamientos térmicos y de vida útil de leche caprina y sus productos

### 2.1 Introducción

#### 2.1.1 Calidad de la leche

La leche, como se introdujo en el capítulo anterior, constituye un alimento básico en la alimentación humana, ya que aporta los nutrientes esenciales para el crecimiento y su desarrollo. Se sintetiza en células especializadas de la glándula mamaria y es estéril cuando es secretada por los alvéolos de la ubre (Tolle, 1980).

La calidad microbiológica de la leche cruda depende de diversos factores tales como el estado sanitario del animal, la limpieza del establecimiento donde se realiza el ordeño, la tecnología de ordeño: limpieza y uso de utensilios, limpieza de ubres, el control adecuado de la temperatura después del ordeño (Moussa y col., 2013; ICMSF, 1998) y por otro lado, las condiciones del acopio y traslado de la leche a procesamiento/transformación, particularmente, limpieza y temperatura de los contenedores. Estos factores pueden favorecer el crecimiento microbiano y su metabolismo con los consecuentes cambios indeseables que acortan la vida útil de la leche (Fromm y Boor, 2004). El tipo de microorganismo y su cantidad, dependen de estos factores, por tanto, pueden ser tomados como indicadores de la calidad de la leche, pudiéndose conocer aspectos de su inocuidad y de las condiciones sanitarias de producción (Rosmini y col., 2004; Guerreiro y col., 2005).

#### 2.1.2 Indicadores microbiológicos

Se propuso el uso del término *microorganismo indicador* para aquellos marcadores cuya presencia en cantidades dadas, indica un tratamiento o etapa de procesamiento que compromete la inocuidad (Mossel y col., 2006). Una prueba positiva a los microorganismos indicadores, no necesariamente indica la presencia del

microorganismo patógeno en el mismo producto; pero en determinado número muestran que estos productos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran haber introducido organismos peligrosos y/o permitido la multiplicación de especies infecciosas o toxigénicas. A diferencia de la detección de un *microorganismo índice* cuya presencia en cantidades o niveles por encima de ciertos límites indica la posible presencia de un patógeno similar desde el punto de vista ecológico.

Evidentemente un microorganismo marcador dado puede funcionar a la vez como índice y como indicador, incluso en el mismo alimento (Mossel y col., 2006). Estos indicadores son más fáciles de cuantificar, permitiendo agilizar controles y monitoreos.

#### **2.1.2.1 Grupos y microorganismos indicadores**

##### *- Recuento de bacterias totales*

Se definen como las cifras de unidades formadoras de colonias de un grupo de bacterias por gramo (ufc/g) del alimento u otro tipo de muestra, obtenida bajo las que parecen condiciones óptimas de cultivo (Mossel y col., 2006). Cada tipo de recuento de viables cultivables, es potencialmente útil para fines específicos según las condiciones de crecimiento definidas: la incubación a temperaturas entre 0 y 7°C favorece el crecimiento de las bacterias *psicrótrofas*, indicadoras de alteración en alimentos refrigerados; temperaturas entre 30 y 37°C son favorables para el desarrollo de los organismos *mesófilos*, cuyo número elevado significa que pueden haberse dado condiciones favorables para la multiplicación de microorganismos patógenos de origen humano o animal. La incubación a temperaturas más elevadas (50 - 60°C) permite el desarrollo de microorganismos *termófilos*, pero inhibe a los mesófilos y psicrótróficos.

También, la concentración de oxígeno presente, permite dividir este grupo en dos: aerobios (antes mencionados) y anaerobios. Los recuentos de bacterias *anaerobias* incluyen a los microorganismos anaerobios estrictos y anaerobios facultativos pertenecientes a las *Enterobacteriaceae*. Estos últimos, son útiles como indicadores de la existencia de condiciones favorables para la multiplicación de organismos anaerobios productores de intoxicaciones alimentarias tales como *Clostridium perfringens* (Mossel y col., 2006; ICMSF, 2000).

- *Grupo coliformes*

Desde aproximadamente 1920, el denominado grupo coliformes, ha sido utilizado como microorganismos marcadores en el análisis de leche pasteurizada y helados. Esto se debe al alto compromiso que tienen estos microorganismos con la salud humana, frente a la alta probabilidad de que estén presentes. En general, estos microorganismos se asocian a la intervención del ser humano durante el procesamiento, mostrando la higiene general y los riesgos sanitarios por contaminación.

En los alimentos que han recibido un tratamiento para garantizar su sanidad, la presencia de niveles considerables de coliformes indica: 1) tratamiento inadecuado y/o contaminación posterior al tratamiento, más frecuentemente por materias primas, equipos sucios, o manejo no higiénico, 2) multiplicación microbiana que pudiese haber permitido el crecimiento de toda la serie de microorganismos patógenos y toxigénicos (Mosse, 2006). El CAA, así como otras reglamentaciones internacionales (ICMSF), consideran el grupo coliformes como uno de los parámetros microbiológicos cuyo límite microbiológico debe ser cumplido en muchos productos destinados al consumo humano.

- *Enterococos*

Los enterococos pueden ingresar a la leche cruda y productos lácteos durante la fabricación a partir de fuentes humanas, animales o ambientales, y se han sugerido como organismos indicadores útiles para la higiene del proceso (Garg y Mital, 1991; Giraffa, 2003). Pueden tener un papel significativo como indicadores de prácticas de limpieza y desinfección deficientes en las industrias de alimentos, debido a su gran resistencia a la desecación, a las temperaturas elevadas y bajas y a los detergentes y desinfectantes. La ICMSF no ofrece límites microbiológicos recomendados para los enterococos.

- *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un género cuyo hábitat natural es el tracto entérico del hombre y de los animales. Por ello, la presencia de este microorganismo en un alimento indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal. *E. coli* es el indicador clásico de la posible presencia de patógenos entéricos en el agua, en productos lácteos y en otros alimentos. Recuentos sustanciales de *E. coli* en un alimento

sugiere una falta general de limpieza, del manejo del mismo y un almacenamiento inadecuado (Mossel, 2006).

- *Bacterias mesófilas esporuladas*

El género *Bacillus* spp. está muy extendido en el medio ambiente y puede propagarse desde el suelo y pasto hasta las ubres de los animales lecheros y, desde ahí a la leche cruda. La presencia de estos microorganismos en los alimentos indica que el tratamiento térmico fue insuficiente para destruir las esporas (ICMSF, 2000).

- *Estafilococos*

La presencia de *Staphylococcus aureus* en un alimento se interpreta, por lo general, como indicativo de contaminación a partir de la piel, la boca y las fosas nasales de los manipuladores de alimentos, si bien el material y equipos sucios y las materias primas de origen animal pueden ser así mismo la fuente de contaminación (ICMSF, 2000). En el caso de las producciones lecheras, está asociado al proceso de ordeño principalmente; también porque estos microorganismos son causante de mastitis (inflamación de las glándulas mamarias), razón por la cual es alta la probabilidad de su presencia en leche cruda. La ropa y cabellos de los operarios, suman a los factores antes mencionados.

### **2.1.3 Barreras tecnológicas**

La importancia de la leche como alimento ha llevado a crear diferentes técnicas para su conservación tales como: secado, acidificación, radiación, tratamientos por calor y frío. Estas técnicas buscan prolongar y conservar las características nutricionales y organolépticas de la leche original, así como eliminar la presencia de microorganismos patógenos y reducir la población de los microorganismos que causan el deterioro de la leche. En este estudio en particular, se consideraron los tratamientos realizados por calor, ya que los mismos son ampliamente utilizados durante las transformaciones de la leche.

### 2.1.3.1 Tratamientos térmicos

Se distinguen tres tipos de tratamientos térmicos, dependiendo de las condiciones de tiempo y temperatura aplicadas: termización, pasteurización y esterilización (Comisión del Codex Alimentarius, 2003).

#### Termización

La termización es un proceso suave de subpasteurización (62 - 65°C por 10 - 20 segundos) que es capaz de inactivar microbios de deterioro lábiles al calor, que producen enzimas termoestables a bajas temperaturas tales como lipasas y proteinasas, lo que permite una extensión del tiempo de almacenamiento antes del tratamiento principal de la leche (Wilbey, 1996).

#### Pasteurización

La FAO / OMS (2004), definieron la pasteurización como “Un tratamiento térmico microbicida destinado a reducir el número de microorganismos patógenos en la leche y en los productos líquidos, si están presentes, a un nivel en el que no constituyen un peligro significativo para la salud”.

Las condiciones de pasteurización son diseñadas para destruir eficazmente los organismos *Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burnetii* (FAO, 2007). La pasteurización implica un tratamiento térmico suave, generalmente a temperaturas por debajo del punto de ebullición del agua, por lo que el impacto en la composición de la leche es mínimo (Tunick y col., 2016; Pexara y col., 2018).

Existen procedimientos de control para evaluar la eficacia del proceso de pasteurización: la prueba de fosfatasa alcalina, es comúnmente usada en el control de calidad. La fosfatasa alcalina es una enzima que está presente naturalmente en leche cruda (Sharma y col., 2003), la cual tiene una resistencia térmica mayor que la de los patógenos no formadores de esporas, y se inactiva cuando se calienta a 71,7°C durante 15 segundos (Deeth y Lewis, 2017). Al inactivarse esta enzima, queda garantizado que se alcanzó las condiciones de mortandad de los patógenos no esporulados de la leche.

### A.1- Pasteurización baja (LTLT: low temperature - long time)

La pasteurización baja usa una combinación de tiempo y temperatura: 30 min o más entre 61 y 66°C, de forma que se consiga destruir microorganismos patógenos no esporulados (ICMSF 1998, USFDA, 2002), sin que la temperatura empleada afecte las proteínas, provocando mínimas modificaciones en el sabor y el color (ALAIS, 1985; Alegbeleye, 2018). Esta pasteurización es la comúnmente utilizada durante el proceso de elaboración de quesos, para minimizar el efecto “coaching” o cobertura de las caseínas con las proteínas de suero.

### A.2-Pasteurización alta (HTST: high temperature-short time)

El método de pasteurización más común es el de los intercambiadores de calor diseñados para el proceso HTST (Roginski, 2005), proceso continuo que se realiza generalmente a temperatura de  $\geq 71^{\circ}\text{C}$  a  $\leq 78^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos (USFDA, 2002).

En el sistema HTST la leche cruda mantenida en un estanque, a temperaturas de refrigeración, se hace pasar por un intercambiador de calor de placas o de forma tubular donde alcanza la temperatura programada. La clave del proceso reside en asegurar que cada partícula de leche permanece a no menos de  $71^{\circ}\text{C}$  por al menos 15 segundos (Escuder-Vieco y col., 2018). Este equipamiento y rango de trabajo de variables, se utiliza para la producción de leche pasteurizada, luego envasada en sachet; con una vida útil entre 5 a 7 días conservada en cadena de frío.

### Efectos microbiológicos de la pasteurización

La FAO (1984), señala que los métodos de pasteurización de 63 – 65°C por 30 min y 72 – 75°C por 16 segundos, destruyen todos los microorganismos patógenos y el 99% de los no patógenos, pero no destruyen a los microorganismos esporulados (Amiot, 1991; Dumakisile y col., 2005).

Las bacterias coliformes crecen rápidamente en la leche, especialmente sobre  $20^{\circ}\text{C}$ , y atacan proteínas y lactosa, como resultado de esto se forma gas y el sabor de la leche se vuelve rancio. La pasteurización a  $72^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos, mata a los coliformes prácticamente al mismo grado que a *Mycobacterium tuberculosis*.

Las bacterias lácticas, producen ácido láctico fundamentalmente a partir de la lactosa, de estas, los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* suelen ser sensibles a



tratamientos de pasteurización baja, los cuales suelen ser suficiente para eliminarlas (Pereda, 2008). Por otro lado en cuanto al género *Enterococcus*, varios autores han aludido la resistencia de estos microorganismos al calor (Franz y col., 1999; Giraffa, 2002; Martinez y col., 2003) y han observado que los enterococos pueden sobrevivir a la temperatura de pasteurización (Rao y col., 1986; Giraffa y col., 1997).

#### Ultra alta temperatura (UHT)

La leche UHT requiere tratamientos no inferiores a 135°C durante al menos un segundo (ICMSF, 1998). Estos tratamientos destruyen las células vegetativas, así como la mayoría de los patógenos formadores de esporas (incluidas las esporas de *C. botulinum* y *B. cereus*) pero no destruyen las esporas de algunos microorganismos no patógenos, como *Bacillus sporothermodurans*, que son bacilos altamente termorresistentes (Claeys y col., 2013). El proceso de temperatura ultra alta (UHT) conduce a mínimos cambios organolépticos en la leche sin alterar la nutrición y ofrece una vida útil mayor a 5 meses (Raynal-Ljutovac y col., 2007).

#### **2.1.4 Estabilidad térmica en la leche de cabra**

Los tratamientos térmicos son procesos importantes que afectan la calidad de la leche y especialmente las propiedades físico-químicas; particularmente esta propiedad de la leche, es de interés para el diseño de los equipos de la industria. En efecto, la leche tiene un límite de tolerancia sobre los tratamientos térmicos, límite que de ser superado provoca la coagulación de las caseínas, formando precipitados que obstruyen cañerías e impiden el normal desempeño de los procesos de industrialización. Esta propiedad de la leche, cambia según la especie: la leche de cabra y oveja es menos estable para los tratamientos térmicos que la leche de vaca. En leche de cabra, las interacciones entre actividad de calcio, perfiles de pH y formación del complejo lactoglobulina/caseína difiere de los observados para la leche de vaca, asimismo la variabilidad dentro de la misma especie es alta (Raynal-Ljutovac y col., 2007). De acuerdo a Chavez (2014), la estabilidad térmica de la leche, está asociada a la estabilidad de la estructura micelar de las caseínas de la leche. Si la micela ha perdido sus características de suspensión se aglutinan formando coágulos en precipitados. Según la autora, aunque las reacciones

inducidas por el calor son similares entre especies animales, la leche bovina a pH natural (6,5 - 6,7) presenta su valor de máxima estabilidad, indicada por su tiempo de coagulación (TC); mientras que la leche caprina tiene un pH natural entre 6,6 - 6,7, pero el punto de máxima estabilidad térmica se produce a pH 6,91. En el rango de pH entre 6,7 y 6,9, la carga neta negativa de la micela aumenta y disminuye la presencia de calcio iónico, ambos factores contribuyen a estabilizar la micela con el consecuente aumento de TC. Es decir que el punto de mayor estabilidad térmica en la leche caprina no es a su pH natural, razón por la cual es menos estable y se diferencia de la bovina.

### **2.1.5 Vida útil**

Los alimentos son sistemas físico-químicos y biológicamente activos, por lo tanto, la calidad de los alimentos es un estado dinámico continuo. Para cada alimento en particular, hay un periodo de tiempo determinado después de su producción, durante el cual mantiene el nivel requerido de sus cualidades organolépticas y de seguridad bajo determinadas condiciones de conservación. Este periodo se define como *vida útil* del alimento (Labuza, 1999; Casp y Abril, 1999).

Roginski y col. (2003), señalan que la leche pasteurizada por métodos tradicionales, generalmente tiene una vida útil de 7 a 28 días, la que depende de factores tales como: la calidad de la leche cruda, contaminación post pasteurización y control de temperatura especialmente en el envasado y almacenamiento (Cromie, 1991; Rysstad y Kolstad, 2006).

En esta tesis, considerando las características de la leche caprina, su estabilidad térmica; y teniendo en cuenta la influencia de las distintas combinaciones tiempo/temperatura en la calidad fisicoquímica, microbiológica y organoléptica de la leche posterior al tratamiento térmico, así como durante su vida útil, se decidió analizar dos tipos de pasteurización: LTLT, HTST.

## **2.2 Objetivo**

Identificar microorganismos o grupos de microorganismos de la leche caprina como indicadores de eficiencia de tratamientos térmicos y de vida útil de sus productos.

## 2.3. Materiales y Métodos

### 2.3.1 Muestras

Las leches crudas utilizadas durante las distintas experiencias se obtuvieron de animales sanos del biotipo Saanen y Anglo-Nubian del tambo experimental del INTA Estacion Experimental Agropecuaria (EEA) Salta. La alimentación de dichos animales fue en base a pastoreo directo de verdes invernales (avena-merilotus) y estivales (sorgo forrajero) con suplementación energética de silaje de sorgo y grano de maíz. El ordeño fue mecánico, se dispuso de un tanque de frío para acopio. Las leches crudas utilizadas en cada experiencia de tratamiento térmico, correspondieron a distintos lotes.

### 2.3.2 Tratamientos térmicos

Para estudiar la eficiencia de tratamientos térmicos en leche caprina, se tuvo en cuenta la temperatura, el tiempo de exposición de la leche a esa temperatura y el equipamiento utilizado en el proceso.

Se ensayaron tres tipos de tratamiento térmico, los cuales se denominaron de la siguiente manera:

- **Pasteurización baja (PB):** Pasteurización en tina a 65°C, 30 minutos.

- **Pasteurización media (PM):** Pasteurización mediante un equipo intercambiador de calor a placa; el agua es el elemento calefactor de intercambio.

Se probaron dos condiciones de temperatura y tiempo durante la etapa de calentamiento:

- Pasteurización media baja (PMB): 75°C, 17 segundos.

- Pasteurización media alta (PMA): 77°C, 19 segundos.

- **Alta temperatura corto tiempo (ATCT):** Tratamiento térmico mediante un equipo intercambiador tubular con etapa de precalentamiento (columnas

tubulares de intercambio) y propulsado por bomba; la fuente de calor es vapor. La temperatura y tiempo con los que se trabajó fue: rango= 117 - 120°C, 7 segundos.

### **2.3.2.1 Pasteurización baja (PB)**

El ensayo PB se realizó en las instalaciones de la planta piloto del INTA EEA Salta. Se realizaron 25 experiencias de pasteurización; para cada una, se colectó la leche caprina cruda obtenida de los ordeños realizados durante la mañana y la tarde, en tanque de frío a 4°C con agitación, hasta el momento de su proceso. Se utilizaron entre 35 y 50 litros de leche cruda para cada experiencia, los cuales fueron colocados en tina (con camisa de agua) hasta alcanzar la temperatura de 65°C, manteniéndose constante durante 30 minutos (Figura 2.3.2 a).

### **2.3.2.2 Pasteurización media**

El ensayo PM se realizó en un equipo intercambiador de calor a placas, el cual está compuesto por un tanque de recepción y recirculado en acero inoxidable de 200 L, y un intercambiador a placas de tres etapas: precalentamiento, calentamiento y enfriamiento, cuyo caudal fue de 250 L/h. El medio de intercambio es agua (Figura 2.3.2 b).

La leche cruda caprina se obtuvo a partir de dos ordeños consecutivos (mañana y tarde), se colectaron 50 litros de leche en un tanque de frío a 4°C con agitación, que inmediatamente se trasladaron al establecimiento (Escuela Agrícola Martín M. de Güemes nº 5122 de Salta) para su tratamiento térmico y envasado.

Se analizaron dos temperaturas y tiempos de pasteurización durante la etapa de calentamiento: Pasteurización media baja: 75°C 17s y Pasteurización media alta: 77°C 19s. En consecuencia, los ensayos se denominaron: PMB y PMA, los cuales se realizaron por triplicado y duplicado respectivamente.

## Envasado

Inmediatamente después de la pasteurización, la leche fue envasada en sachet tricapa coextrusión PED, en correspondencia con el uso industrial (Figura 2.3.1).

### **2.3.2.3 Pasteurización alta temperatura corto tiempo (ATCT)**

El equipo empleado para llevar a cabo las experiencias sobre leche caprina fue un intercambiador de calor construido y adaptado en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Salta (Figura 2.3.2.c y d). Se trata de un sistema continuo, en el que se logra entregar mucha energía (calor) en corto tiempo. El proceso térmico aplicado a la leche caprina consistió de una etapa de precalentamiento (85-90°C, 7 segundos), otra de calentamiento ATCT (117-120°C 7 segundos) y posterior enfriamiento a 30°C.

La leche caprina cruda, se obtuvo del ordeño matutino, para cada experiencia se colectaron 50 litros de leche en un tanque de frío a 4°C con agitación que inmediatamente se trasladaron a la planta piloto II de la Universidad Nacional de Salta para su tratamiento térmico y envasado. El ensayo se realizó por triplicado.

## Envasado

El envasado fue manual en cámara esterilizada con luz UV; luego los sachets (tricapa coextrusión PED) fueron llevados a cámara de frío (4-8°C) (Figura 2.3.1).



**Figura 2.3.1.** Sachets tricapa coextrusión PED, utilizados en PMB, PMA y ATCT.



**Figura 2.3.2.** Equipos de tratamiento térmico de leche. a) Tina quesera con camisa de agua (pasteurización baja). b) Equipo intercambiador de calor a placa (pasteurización PM). c) Equipo intercambiador tubular (HTCT) vista horizontal. d) Equipo intercambiador tubular (HTCT) vista vertical.

### 2.3.3 Eficiencia del tratamiento térmico

La eficiencia de la pasteurización se analizó a través de la ecuación:

$$\eta (\%) = (C_0 - C_f) / C_0 * 100 \quad (1)$$

Donde:

$\eta$  (%)= eficiencia del pasteurizado

C0= concentración de microorganismos inicial en tanque de recepción

CF= concentración de microorganismos final

- Fosfatasa alcalina

Para verificar la eficiencia del tratamiento térmico aplicado en el caso de pasteurización, se realizó la prueba de la fosfatasa alcalina (Lactognost). La actividad de la fosfatasa alcalina se determina por la acción hidrolítica de dicha enzima sobre un sustrato sintético que da una coloración a la muestra de leche. Los resultados negativos, positivo débil y muy positivo fueron determinados según las siguientes indicaciones.



Este control de eficiencia de tratamiento térmico es válido solo para pasteurización; en el caso de tratamiento ATCT, el pulso intenso de calor y el bajo tiempo de aplicación del mismo, no inactivan esta enzima por lo que los resultados no son efectivos.

### 2.3.4 Vida útil

Se analizó la vida útil de la leche caprina pasteurizada según los tratamientos térmicos de pasteurización media y pasteurización ATCT. No se efectuó estudio de vida

útil con PB en tina ya que este tratamiento, solo se usa como una etapa en la elaboración del queso. En todos los casos, el estudio de vida útil se produjo inmediatamente luego de aplicado el tratamiento térmico y envasado el producto.

#### **2.3.4.1 Vida útil de la leche obtenida mediante PM**

La leche pasteurizada mediante tratamiento térmico PMB y PMA, envasada, se conservó en heladera durante 13 días. Se probaron dos rangos de temperaturas de conservación, entre 6 - 8°C (anaquel superior de la heladera, identificado como AS) y entre 8 - 11°C (anaquel inferior de la heladera, AI). La primera temperatura fue planteada según lo exigido por el CAA (<8°C), como la adecuada para la conservación de los alimentos, la segunda temperatura fue planteada considerando las condiciones de una heladera de hogar que pudiera tener mayor temperatura por estar muy llena o ser abierta repetidas veces.

Las muestras, se tomaron apenas producido el tratamiento térmico (t0) y por duplicado (dos sachet) a tiempo: 4, 7, 13 y 14 días. Se previó la cantidad de sachet necesarios para realizar la toma de muestras individuales y descartar los mismos una vez realizados los análisis.

#### **2.3.4.2 Vida útil de la leche obtenida mediante pasteurización ATCT**

La leche envasada se conservó en heladera durante 35 días, a una temperatura de conservación entre 6 - 8°C. Las muestras individuales se tomaron por duplicado (dos sachet) a tiempo: 0, 5, 7, 10, 12, 17, 20, 21, 25, 31 y 35 días.

### **2.3.5 Determinaciones microbiológicas y físicoquímicas**

#### **2.3.5.1 Análisis físicoquímicos**

Sobre la leche cruda se analizaron los siguientes parámetros físicos químicos:



- Composición de leche (grasa, proteína, lactosa, SNG). Determinación con Analizador Automático de Leche Lacto Star de Funke Gerber: por Turbidimetría e Impedancia.
- pH: potenciometría, pHmetro OAKTON pH 510 series y electrodo Schott Z 509 para leche.
- Acidez: Por titulación ácido-base en la que se valoran los ácidos presentes en la leche con una base de concentración conocida. En esta titulación, el punto final se determina mediante una medición potenciométrica: pH 8,30; correspondiente al punto de viraje de la fenolftaleína. IRAM 14005/1976.
- Sólidos totales: Se calcula por diferencia de peso entre el peso inicial de una muestra y el peso final después de pre-secar una porción de muestra en baño de agua, se evapora el agua de la misma a 102°C de temperatura en estufa de secado. El contenido de sólidos totales en la leche expresado en gramos en cien gramos de leche (%p/p) se calcula como:

$$\%ST = \frac{(P_3 - P_1)}{(P_2 - P_1)} * 100 \quad (2)$$

Donde:

P1: Peso de la cápsula de aluminio con su tapa.

P2: Peso de la cápsula de aluminio con su tapa y 3 mL de la muestra.

P3: Peso de la cápsula de aluminio con su tapa y 3 mL de la muestra después de haber estado en estufa a 102°C durante 24 horas.

Para el ensayo de vida útil de la leche pasteurizada se analizaron RAM, CT, BAL, pH y acidez, en los siguientes tiempos de muestreo para cada tratamiento térmico:

- Pasteurización media: 0, 4, 7, 13 y 14 días
- Tratamiento térmico ATCT: 0, 5, 7, 10,12, 17, 20, 21, 25, 31 y 35 días.

### 2.3.5.2 Análisis microbiológicos

Sobre la leche cruda, inmediatamente pasteurizada y en la leche envasada correspondiente al estudio de vida útil, se evaluó en cada tiempo de muestreo:

- Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas (RAM), mediante el método de recuento en placa, en agar PCA (Britania), con incubación a 30°C durante 48h (ICMSF, 2000).
- Coliformes totales (CT), mediante recuento en placa, en agar bilis rojo violeta (Britania), luego de incubación por 24h a 37°C (ICMSF, 2000).
- Bacterias lácticas (BAL), mediante el método de recuento en placa, en agar MRS (De Man y col., 1960) (Biokar), con incubación en microaerobiosis a 37°C durante 72h.

Adicionalmente, sobre la leche cruda, inmediatamente pasteurizada, y a los 14 días de conservada en heladera se evaluó:

- *Escherichia coli* (ICMSF, 2000). A partir de diluciones preparadas en agua peptonada, se tomó 1 mL y se colocó en tubos con caldo Mac Conkey (Britania) utilizando tres tubos por dilución. Se incubó a 37°C por 24 y 48 h. Un asa con cultivo proveniente de los tubos Mac Conkey gas positivo, se inoculó en tubos con caldo lactosado bilis (2%) verde brillante (BioKar) y en agua petonada. Se incubó a 44°C por 24 h. Se colocó 5 mL de cada tubo de agua peptona positiva en tubo de ensayo y se le realizó la prueba de Indol. Se consideró positivo de coliformes fecales, los tubos que produjeron gas en caldo lactosa bilis (2%) verde brillante y que produjeron indol en agua de peptona. La confirmación de *E. coli*, se realizó mediante las pruebas de identificación de organismos coliformes: IMViC (Britania). Las cuales consisten en: Prueba de indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato sódico.

- *Salmonella* sp. (presencia- ausencia). (ICMSF, 2000): La detección de *Salmonella* consistió en 5 pasos:

*Preenriquecimiento:* Se tomaron 25 mL de muestra y se mezclaron con 225 mL de caldo lactosado (BioKar) y se incubó a 37 °C por 24-48 horas.

*Enriquecimiento:* Del cultivo se tomaron volúmenes de 1,0 mL para inocular tubos con caldo tetratonato (Müller Kauffmann) (Britania, B0214505) y caldo selenito cistina (Britania) para la fase de enriquecimiento selectivo. Los que se incubaron a 18 h a 37°C y 18 h a 43°C respectivamente.

*Aislamiento:* Se tomaron muestras de los cultivos de caldo tetratonato y caldo selenito cistina y se sembraron mediante estría en placas con agar sulfito bismuto (Biokar), agar xld (Xilosa Lisina Desoxicolato), y agar Verde Brillante (BPLS) (Britania). Se incubaron las placas invertidas a 37°C durante 24 h. Se realizó la observación de colonias típicas para *Salmonella*.

*Pruebas de identificación:* A partir de cada cultivo puro se realizaron las siguientes pruebas de identificación: tinción de Gram, oxidasa, TSI y LIA (siembra por punción y en superficie), Caldo urea (Siembra), todas incubadas a 37°C 24 h. También β-galactosidasa, producción de Indol. Producción de acetil metil carbinol y/o rojo de metilo

- Recuento de estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus*). (ICMSF, 2000): A partir de las diluciones preparadas, se inoculó 0,1 mL en placas de agar Baird Parker (Biokar), las cuales fueron incubadas por 48 h a 35°C. Se consideraron sospechosas las colonias que presentaron una coloración negra y que fueran convexas, con reborde blanco y una zona de aclaramiento. Éstas fueron confirmadas mediante las pruebas de tinción Gram, catalasa, fermentación del manitol, coagulasa y de la Termonucleasa.
- *Listeria* sp. (presencia- ausencia) (Mossel y col., 2006): Se tomaron 25 mL de cada muestra y se homogeneizaron en 225 mL de caldo Listeria (Biokar), el cual fue incubado a 30°C por 48 h. Se realizó un

aislamiento selectivo utilizando agar Oxford (Britania), el cual se incubó por 48 h a 35°C. Las colonias sospechosas, redondas, café oscuras y con una depresión central fueron confirmadas mediante las pruebas de Gram, oxidasa, catalasa, fermentación de xilosa, ramnosa, arabinosa, movilidad a 25°C y luz de Henry.

### **2.3.5 Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se realizaron a través del programa Infostat. Se ajustó un modelo ANAVA considerando las variables RAM, CT, BAL según tratamientos térmicos. La prueba de comparación de medias se realizó a través del estadístico LSD Fisher.

## 2.4 Resultados y Discusión

### 2.4.1 Características fisicoquímicas de la leche caprina cruda

El análisis fisicoquímico de las leches de cabra destinadas a los diferentes ensayos de tratamientos térmicos se muestra en la Tabla 2.4.1.

El CAA, fija rangos en los parámetros físicos y químicos para la leche de cabra destinada a ser consumida como tal o a la elaboración de leches y productos lácteos; considerando estos valores, se puede observar que los valores de pH, concentración de grasa y proteínas de las leches analizadas, están dentro de los rangos establecidos por el CAA, mientras que los valores de acidez y sólidos no grasos, están por debajo del mismo.

La leche de la raza Saanen, utilizada en todos los ensayos, tiene una acidez natural baja con respecto a otros biotipos y esto es debido a que la acidez titulable constituye, fundamentalmente, una medida de la concentración de proteínas y fosfatos en leches de buena calidad higiénica–sanitaria (Orosco y col., 2011). En el caso particular de las leches PB (pasteurización baja), PMB (pasteurización media baja) y PMA (pasteurización media alta), la baja acidez coincide con la baja concentración de sólidos no grasos (SNG).

Por otro lado, la acidez desarrollada, es atribuida a la fermentación de la lactosa por los microorganismos, generando ácido láctico y otros ácidos. El CAA considera la medida de pH como una determinación rápida de desarrollo de acidez por acción microbiana, los valores obtenidos de pH para las leches de todos los tratamientos nos indica una leche en adecuadas condiciones. Es decir que: pH normal y bajo nivel de acidez indican leches sin riesgos de inocuidad pero posiblemente débiles para fines nutricionales. En efecto, la proteína de leche de biotipo Saanen, está reportada como 3,25 ( $\pm 0,09$ ) y 3,18 ( $\pm 0,19$ ) por Scaltritti y Chavez (2009) y Herrera y col. 2010; siendo menores a las obtenidas para el biotipo Anglo-Nubian y Mestizo criollo. Asimismo, Orosco y col. (2013), encontraron una correlación entre acidez natural y caseínas asociada al biotipo ( $r^2 = 0,33$ ). Los autores probaron estadísticamente que la acidez natural del biotipo Criollo, es superior a la de los biotipos Anglo Nubian y Saanen,

comportamiento que explicaron teniendo en cuenta, el alto contenido de proteínas del biotipo Criollo (ver Fig.1.4.9. pág 36).

**Tabla 2.4.1.** Parámetros fisicoquímicos de las leches de cabra cruda utilizadas en cada tratamiento térmico y límites establecidos por el CAA

Parámetros físico - químicos	PB		PMB (75°C 15s)		PMA (77°C 19s)		ATCT		CAA
	n	VP±DE	n	VP±DE	n	VP±DE	n	VP±DE	
pH	18	6,72±0,08	3	6,76±0,04	2	6,70±0,04	3	6,69±0,06	6,57-6,96
Acidez (°D)	18	12,04±0,65	3	13,72±1,85	2	13,9±0,71	3	13,93±1,27	14 - 22
Grasa(%)	12	3,53±0,52	3	3,99±1,25	2	3,49±0,07	3	4,78±0,38	Min. 3,0
Proteína Total (%)	12	3,01±0,03	3	3,62±0,17	2	3,36±0,04	3	3,11±0,05	Min.2,8
Sólidos No Grasos (%)	12	8,74±0,08	3	7,55±0,27	2	7,11±0,06	3	9,00±0,14	Min.9

PB: Pasteurización Baja. PMB: Pasteurización Media Baja. PMA: Pasteurización Media Alta. ATCT: Alta Temperatura Corto Tiempo. CAA: Código Alimentario Argentino. n: tamaño muestral. VP: Valor Promedio. DE: Desvíos Estándar.

Todos los ensayos fueron realizados con lotes diferentes del mismo biotipo Saanen, los ensayos ATCT fueron realizados en su mayoría durante el último tercio de la lactancia de este rebaño, proceso fisiológico que generalmente genera mayor concentración de grasa y proteínas.

#### 2.4.2 Efecto de los tratamientos térmicos sobre los microorganismos indicadores.

El efecto de los cuatro tratamientos térmicos aplicados en las leches de cabra se puede observar en la tabla 2.4.2.

Las leches crudas utilizadas en los tratamientos PB y ATCT, presentaron valores promedios de RAM superiores a los recomendados por el CAA (5,9 log ufc/mL), no obstante, los valores promedios de RAM de las leches crudas utilizadas en los distintos ensayos de tratamiento térmico, no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Los valores promedios de CT para las leches crudas de los tratamientos

PB, PMA y ATCT estuvieron por encima 3,5 log ufc/mL, mientras que para el tratamiento PMB se encontró por debajo de 2 log ufc/mL, mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto a los demás tratamientos. El CAA no establece valores límites para CT en leche cruda caprina, sin embargo, en el capítulo 1 de la presente tesis se expone como valor recomendado 2,6 log ufc/mL; y será tomado como parte del análisis de este capítulo

Como es de esperar, hubo una importante reducción microbiológica al aplicar los tratamientos térmicos. Los valores de RAM en la leche tratada mediante PB, PMB y PMA, mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la leche ATCT, cuyo RAM fue el menor, lo cual supone que este tratamiento incidió de manera más marcada sobre la microbiota aerobia total. Para todos los tratamientos, los valores promedios de CT fueron menores a 1 log ufc/mL y no mostraron diferencias estadísticamente significativas, no obstante, se observó mucha variabilidad en los resultados de los tratamientos PMB, PMA y ATCT, lo cual nos indica que debe ponerse atención en la sistematización del proceso térmico aplicado y/o la limpieza de los equipos utilizados. Silva y col. (2008) y Walstra (1999), señalan que los coliformes se destruyen durante la pasteurización, por lo tanto, los valores obtenidos en el tratamiento PMB indicaron reforzar medidas de control del tiempo y temperatura en el equipo, y en el mismo sentido la rutina de limpieza. Hecho esto y persistiendo el comportamiento, se resolvió aumentar la relación temperatura tiempo, dando lugar al tratamiento PMA. Cabe mencionar que las condiciones de tiempo y temperatura usadas inicialmente para el tratamiento PMB, fueron las sugeridas por los fabricantes del equipo para leche bovina.

- *Eficiencia de los tratamientos térmicos*

Se evaluó la eficiencia de los tratamientos térmicos ( $\eta$  %) aplicados a la leche caprina a través de los parámetros RAM y CT, y la determinación de la fosfatasa alcalina (Tabla 2.4.2).

El producto obtenido (leche pasteurizada) después de aplicar cada tratamiento térmico y para todos los casos, se encontró dentro de los valores exigidos por el CAA para leche caprina pasteurizada (RAM 4,69 log ufc/mL y CT 1,69 log ufc/mL). Los tratamientos PMA y ATCT fueron efectivos, alcanzando un porcentaje de reducción de microorganismos mayor al 99,6% para valores de RAM y mayor a 99,9% para CT. El

tratamiento térmico PB, tuvo una eficiencia térmica de 98,4% para valores de RAM mientras que para CT fue del 100%. El tratamiento térmico PMB, no alcanzó una eficiencia óptima, puesto que con ambos indicadores (RAM y CT), los valores de  $\eta$  fueron inferiores al 92%, razón por la cual llevó a sistematizar la limpieza de la línea y estandarizar las condiciones de pasteurizado a 77°C - 19s (PMA).

Las bacterias aerobias mesófilas (RAM) contienen una diversidad microbiana alta, entre la que se encuentra microorganismos que pueden resistir la temperatura de pasteurización (termodúricos), pudiendo causar posterior deterioro en la leche pasteurizada. La microbiota termodúrica está constituida por los microorganismos pertenecientes a los géneros: *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Paenibacillus* y *Macrococcus* (Ribeiro y col., 2018). El género *Enterococcus* tiene una presencia importante en las leches caprinas crudas estudiadas en el noroeste argentino (Taboada y col., 2015) por lo que su persistencia en leches expuestas a tratamientos térmicos es factible, y una posible razón por la que los tratamientos PB y PMB no alcanzaron los valores esperados de  $\eta$  en RAM. McAuley y col. (2012), en ensayos realizados con aislamientos de *Enterococcus* de diferentes especies (*durans*, *faecalis*, *faecium* y *hirae*), los que fueron expuestos a diferentes temperaturas simulando pasteurización baja (63°C 30min) y alta (72, 75 y 78°C por 15s), comprobaron que los aislamientos más resistentes al calor, eran *E. durans*, *E. faecium*, y *E. hirae*. Asimismo, estos autores concluyeron que la resistencia al calor del género *Enterococcus* es altamente variable, depende de la especie y del ambiente al que estuvieron expuestos. Las especies anteriormente mencionadas fueron encontradas en las leches caprinas provenientes del tambo de INTA Salta (luego analizado en el Capítulo 3), lugar donde se extrajo la leche para el presente ensayo.

Walstra (1999) reportó que una pasteurización es eficiente si los CT están ausentes en la leche pasteurizada. En este estudio, los tratamientos PB, PMA y ATCT, mostraron una eficiencia alta en el control de CT (>99,9%), sin embargo, la variabilidad encontrada en PMA y ATCT, marcaron puntos críticos donde hay mayor riesgo de contaminación durante la aplicación del tratamiento térmico.

Los resultados obtenidos de la fosfatasa alcalina al término de los procesos de pasteurización fueron negativos, lo cual indicó que la pasteurización se realizó de manera adecuada para todos los tratamientos (Ludikhuyze y col., 2000). Para la leche



ATCT la fosfatasa alcalina no pudo ser medida por no ser recomendada la metodología empleada para las temperaturas utilizada en este tratamiento.

**Tabla 2.4.2** Evaluación de la eficiencia de los tratamientos térmicos mediante recuento de aerobios mesófilos (RAM) y coliformes totales (CT).

TRAT. TERM.	n	RAM (log ufc/mL)			CT (log ufc/mL)			Fosfat. Alcalina
		Leche cruda	Leche pasteurizada	η %	Leche cruda	Leche pasteurizada	η %	
		VP±DE	VP±DE	VP±DE	VP±DE	VP±DE	VP±DE	
PB	25	6,22±0,82a	3,64±0,49b	98,42±3,00	3,83±1,20a	0,00c	100±0,00	Negativa
PMB	3	5,68 ±0,19a	4,39±0,30b	92,20±8,70	1,98±0,55b	0,28±0,49c	91,3±15,00	Negativa
PMA	2	5,96±0,06a	3,75±0,52b	99,60±0,10	3,59±0,30a	0,15±0,21c	99,9±0,03	Negativa
ATCT	3	6,43±0,64a	2,46±0,46c	100±0,00	4,22±0,32a	0,63±1,09c	99,94±0,10	s/d

Tratamientos térmicos: PB (Pasteurización Baja), PMB (Pasteurización Media Baja), PMA (Pasteurización Media Alta), ATCT (Alta Temperaturas Corto Tiempo).

n: tamaño muestral. η %: porcentaje de la eficiencia del tratamiento térmico. VP: Valor Promedio. DE: Desvíos Estándar. s/d: sin determinar.

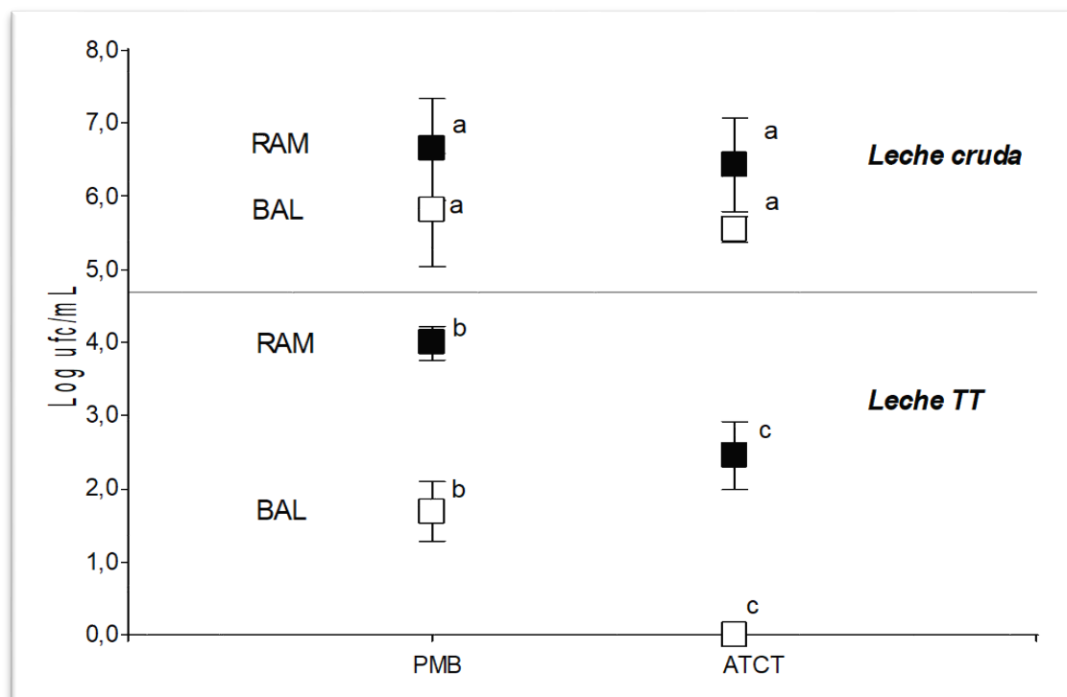
Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (valor  $p < 0,05$ ) para las variables RAM y CT, entre leche cruda y tratada térmicamente y entre tratamiento térmico aplicado (entre filas y columnas).

Es importante también reconocer que el indicador RAM, puede incluir la microbiota láctica nativa de la leche. La Figura 2.4.1, muestra los valores de RAM y BAL en leche antes y después de aplicado los tratamientos térmicos PB y ATCT. La leche caprina cruda utilizada en ambos tratamientos, no presentó diferencias estadísticamente significativas en los parámetros microbiológicos analizados. Después del tratamiento térmico, los valores de RAM en ATCT fueron marcadamente menores que en PB. La población de BAL disminuyó en aproximadamente 2 log ufc/mL en PB, mientras que en la leche con el tratamiento ATCT, la población de BAL no pudo ser detectada por los métodos tradicionales. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre las leches tratadas térmicamente, para ambos indicadores (RAM y BAL).

De acuerdo a la bibliografía analizada (FDA, 2009), ambos tratamientos térmicos inciden con una eficacia térmica del 99,9% sobre los microorganismos mesófilos. Entonces, la microbiota presente después de la pasteurización, la que resistió las

condiciones del tratamiento térmico empleada, es la termotolerante. Como se mencionó anteriormente, *E. durans*, *faecium* y *hirae* son especies que pueden resistir altas temperaturas, asimismo, estas fueron especies encontradas en las leches crudas caprinas utilizadas en este ensayo (analizadas en Capítulo 3). Según los resultados obtenidos, las poblaciones de BAL incidieron en los valores más altos de RAM del tratamiento PB, y podrían pertenecer de acuerdo a la información bibliográfica al género *Enterococcus*.

Al evaluar los indicadores de contaminación es importante tener en cuenta los diferentes grupos, puesto que podemos realizar predicciones erróneas. Un valor alto de RAM no necesariamente corresponderá con valores altos en coliformes, sino que puede indicar un alto número de BAL, como en este ensayo, este tipo de microorganismo podría incidir en la vida útil de la leche pasteurizada.



**Figura 2.4.2** Comparación de los parámetros RAM (cuadrado negro) y BAL (cuadrado blanco), en leche cruda (cuadrante superior) y leche TT (después de aplicado los tratamientos térmicos PMB y ATCT, cuadrante inferior).

Letras distintas (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas (valor  $p < 0,05$ ) según cada variable, antes y después de aplicado el tratamiento térmico.

### 2.4.3 Vida útil

#### 2.4.3.1 Pasteurización Media

El estudio de vida útil, se basa en medir los cambios de parámetros críticos a lo largo del tiempo, bajo determinadas condiciones de envasado y conservación. En este caso, los parámetros elegidos fueron RAM y CT. Para describir los cambios de ambos parámetros en función del tiempo, se ajustó un modelo de regresión lineal simple a los datos medidos; a partir de la ecuación obtenida, se estimó la vida útil microbiológica del producto. En este modelo la variable independiente (x) es el tiempo de conservación, y la dependiente (y) es la concentración de RAM y CT; cada variable dependiente con su ecuación de ajuste. Se tuvo en cuenta como máximo valor de la variable independiente (y), los valores de RAM y CT exigidos por el CAA para leche caprina pasteurizada (RAM 4,69 log ufc/mL y CT 1,69 ufc/mL) (Tabla 2.4.3).

**Tabla 2.4.3.** Ecuaciones según el modelo de regresión lineal simple y coeficientes de regresión obtenidos para los valores de RAM y CT vs tiempo, de las leches caprinas tratadas térmicamente por PMB y PMA, vida útil del producto conservado en heladera en anaquel superior (T° 6-8°C) e inferior (T°8-10°C) durante 13 días.

Calidad microbiológica	Pasteurización	Anaquele	Ecuación	R <sup>2</sup>	Vida útil (días)
RAM	PMB	I	$\gamma=4,60+0,32x$	0,87 (p<0,001)	0,3
		S	$\gamma=4,14+0,25x$	0,89 (p<0,001)	2,2
	PMA	I	$\gamma=3,75+0,26x$	0,71 (p<0,001)	3,6
		S	$\gamma=3,02+0,32x$	0,88 (p<0,001)	5,2
CT	PMB	I	$\gamma=0,70+0,50x$	0,83 (p<0,001)	1,98
		S	$\gamma=0,28+0,23x$	0,65 (p<0,001)	6,1
	PMA	I	$\gamma=0,38+0,23x$	0,40 (p<0,05)	5,6
		S	$\gamma=-0,42+0,26x$	0,45 (p<0,05)	8

RAM: Recuentos aerobios mesófilos, CT: Coliformes totales, PMB: pasteurización media baja, PMA: pasteurización media alta, ATCT: alta temperaturas corto tiempo. I: anaquel inferior, S: anaquel superior.

Para todos los casos estudiados, los coeficientes de regresión de la relación RAM vs días de conservación, fueron mayores a 0,7 y estadísticamente muy significativos ( $p < 0,001$ ), indicando muy buen ajuste del modelo. Mediante la ecuación obtenida en cada situación, se realizó el cálculo del día en que la leche alcanzó el valor límite exigido por el CAA, considerando este, como el tiempo de vida útil del producto. La leche PMB no superó las 24h en el anaquel inferior (AI) y los 2 días en anaquel superior (AS), mientras que para PMA la vida útil llegó a los 3 días en AI y a los 5 días en AS, siendo este último el tiempo recomendados por el CAA para leche tratada mediante pasteurización baja, en condiciones óptimas de conservación ( $T^{\circ} 6 - 8^{\circ}C$ ).

La relación CT vs días, fue estadísticamente muy significativa ( $p < 0,001$ ) en PMB (AI y AS), mientras que en PMA la relación fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), con coeficientes de regresión más bajos que para PMB, esto podría atribuirse a que no se encontraron CT al inicio de la vida útil, y consecuentemente su aparición posterior fue lenta. La leche tratada PMB y conservada en AI, mostró vida útil de 2 días, en las demás situaciones, la vida útil de las leches pasteurizadas superó los 5 días.

Algunos autores comprobaron que la vida útil es mayor cuando la leche se pasteuriza, dentro del rango aconsejable, a menor temperatura, debido a que a medida que aumenta la temperatura, disminuye la actividad antibacteriana natural residual del sistema de lactoperoxidasa (Lewis, 2002; Martin y col., 2012), y la afectividad de compuestos antimicrobianos y producción de factores de crecimiento (Vatne y Castberg, 1991). Ranieri y col. (2009), encontraron que la población microbiana era menor en leche pasteurizada calentada a  $60^{\circ}C$  seguida de un tratamiento térmico a  $72,9^{\circ}C / 25$  segundos respecto del tratamiento a  $85,2^{\circ}C / 25$  segundos. Asimismo, Martin y col. (2012), comprobaron que la pasteurización de leche a temperatura  $76,1^{\circ}C$  frente a  $79,4^{\circ}C$ , por igual periodo de tiempo, indujo un recuento bacteriano significativamente más bajo (log ufc/mL) en leche pasteurizada (1,39 vs 1,58), comportamiento que se mantuvo (3,74 vs. 4,82 respectivamente), incluso después de un almacenamiento posterior al procesamiento de 21 días a  $6^{\circ}C$ . En este estudio, se observó que el tratamiento PMA obtuvo mejores resultados que PMB, incluso la vida útil alcanzada fue mayor en el primero. La destrucción completa de la enzima lactoperoxidasa en la leche se produce a  $80^{\circ}C / 15$  segundos (Griffiths, 1986), asimismo Marin y col. (2003), reportaron que la retención de la actividad lactoperoxidasa hasta del 90%, se logra a

72°C / 2 min y hasta el 36% a 76°C / 40 segundos; se podría plantear según estos rangos de temperatura y tiempo, que la leche obtenida por PMA retuvo parte de la actividad peroxidasa, la que frente a poblaciones baja de microorganismos pudo haber sido efectiva. Esta hipótesis requeriría de ensayos específicos para su verificación. Asimismo, según Ranieri y col. (2009), las bacterias psicrotolerantes formadoras de endosporas presente en la leche crecen más efectivamente en la leche pasteurizada y se consideran como un obstáculo clave para extender la vida útil del producto más allá de los 14 días (Meer y col., 1991; Fromm y Boor, 2004; Durak y col., 2006). De acuerdo a Coghill y Juffs (1979), la temperatura óptima para la germinación de esporas es de 65-75°C ; y una elevada temperatura de pasteurización de 80-90°C, da lugar a una disminución en la vida útil de la leche atribuible al estímulo del crecimiento de las esporas y a la disminución de la afectividad de compuestos antimicrobianos (Vatne y Castberg, 1991), razones por las cuales se puede considerar que las condiciones del tratamiento térmico PMA fueron las ideales para prolongar la vida útil del producto.

La temperatura de almacenamiento tiene influencia en la vida útil microbiológica de la leche pasteurizada (Petrus y col., 2010), por lo que es otro factor a tener en cuenta cuando se analiza la vida útil de un producto. La leche pasteurizada refrigerada tiene una vida útil de aproximadamente 10-20 días cuando se almacena a 6,1°C (Labuza, 1982). Burdova y col. (2002), demostró una disminución en la vida útil de la leche pasteurizada entera de 31 a 11 días y de la leche descremada pasteurizada de 32,57 a 10,71 días con una elevación de la temperatura de almacenamiento de 4 a 10°C. Este comportamiento se debe a la mayor actividad proteolítica y lipolítica de los microorganismos psicrotóxicos, después de 2-3 días a 10°C en contraste con 4-6 días a 4°C. Schroder y col. (1982), notaron una disminución en la vida útil de la leche pasteurizada comercial de 13 a 5 días, con una elevación en la temperatura de almacenamiento de 5 a 11°C. En el presente estudio, con ambos indicadores (RAM y CT) se demostró que la vida útil de la leche pasteurizada por PMA y PMB, se prolonga si las condiciones de conservación son las óptimas coincidiendo con los anteriores investigadores.

El análisis de vida útil de un producto debe considerar el factor microbiológico y sensorial. La aceptación por parte del consumidor del producto a lo largo de su vida útil cumple un rol importante, puesto que va a determinar el consumo del mismo. Es

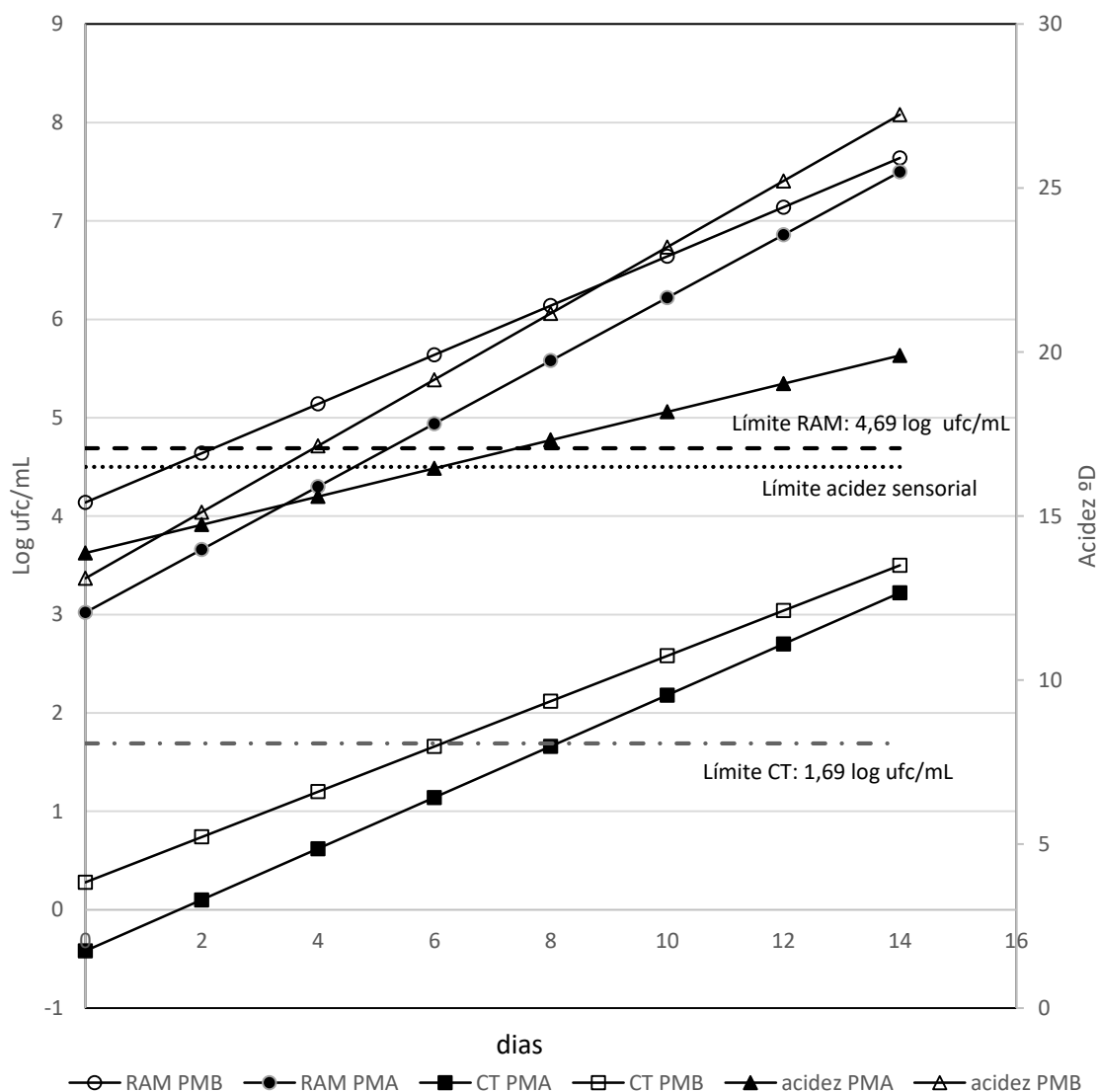
fundamental sumar evaluaciones sensoriales a las de estabilidad fisicoquímicas y microbiológicas (Hough, 2003; Calle, 2006), para la determinación de vida útil de un alimento. En la leche caprina pasteurizada mediante los tratamientos PMA y PMB, en condiciones recomendadas de conservación ( $T^{\circ} 6 - 8^{\circ}C$ ), se analizó conjuntamente la vida útil microbiológica y sensorial, mediante RAM y CT y acidez como indicadores microbiológicos y sensorial, respectivamente.

Como ya se mencionó, se consideraron para el análisis de la vida útil microbiológica, los valores límites exigidos por el CAA para RAM y CT; por otro lado, para el análisis de la vida útil sensorial se tomó el *punto de corte sensorial*, definido como el valor de acidez a partir del cual el consumidor comienza a percibir un cambio en el sabor en relación al producto fresco.

Chavez y col. (2009), propusieron mediante un estudio de vida útil en leche caprina del biotipo Saanen, tratada térmicamente ( $72^{\circ}C$ , 19 segundos), valores de 13,87 a  $16,47^{\circ}D$  como rango de corte para acidez. Para este estudio, se consideró el valor máximo del rango, puesto que los valores de acidez de la leche pasteurizada a tiempo inicial se encontraron entre 13,72 y  $13,91^{\circ}D$ .

La figura 2.4.3, muestra los cambios a lo largo del tiempo de RAM, CT y acidez, al aplicar y graficar las ecuaciones de la Tabla 2.4.3, los límites del CAA para cada variable, y el límite de acidez sensorial medido para leche caprina.

Cuando el tratamiento térmico fue PMB, la variable que alcanzó en primer término el límite establecido fue RAM a los 2 días, mientras que el límite de detección de acidez, se alcanzó entre los 3 y 4 días. Para el tratamiento PMA se observó un patrón similar, es decir, primero se alcanzó el límite microbiológico y luego el sensorial. CT para ambos casos, resulta una variable que no incidió en el análisis de vida útil, por alcanzar posteriormente su límite de control. Por lo tanto, para el tratamiento PMA se estableció la vida útil del producto a los 5 días, mientras que para PMB a los 2 días.



**Figura 2.4.3.** Vida útil microbiológica y sensorial de leche caprina pasteurizada, en condiciones recomendada de conservación. Rectas ajustadas a la relación RAM, CT y Acidez vs tiempo.

#### 2.4.4 Persistencia de microorganismos patógenos específicos, según tratamiento térmico aplicado

Con la finalidad de conocer el riesgo sobre persistencia de microorganismos patógenos en leche tratada térmicamente, se analizó la presencia de los siguientes microorganismos específicos: *Listeria sp.*, *S. aureus*, *Salmonella sp.* y *E. coli*, en las leches crudas utilizadas para los ensayos PMA y PMB, y la persistencia de estos microorganismos posteriormente al tratamiento térmico aplicado.

En la tabla 2.4.4, se puede observar la presencia de *Salmonella sp.* y *E. coli*, en la leche cruda destinada al tratamiento PMB, asimismo la leche destinada al tratamiento

PMA tuvo presencia de *S. aureus*, *Salmonella* sp. y *E. coli*. Después de aplicado cada tratamiento térmico, no se observaron estos microorganismos en las leches pasteurizadas, tampoco transcurridos los 14 días en heladera. Es decir que el riesgo sobre persistencia de microorganismos patógenos en leche tratada térmicamente por pasteurización media y conservada en heladera a 6°C fue nulo, siendo las condiciones operadas, efectivas para eliminar estos microorganismos patógenos.

**Tabla 2.4.4.** Microorganismos patógenos específicos, en leche caprina cruda y tratada térmicamente según pasteurización media baja y pasteurización media alta.

Temperatura de pasteurización	Leche	<i>Listeria</i> sp.	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>E. coli</i> (ufc/mL)
PMB	Cruda	Negativo	-	Presencia	1,3x10 <sup>1</sup>
	Pasteurizada (T=0)	Negativo	-	Ausencia	<1
	Pasteurizada (T=14)	Negativo	-	Ausencia	<1
PMA	Cruda	Negativo	Presencia	Presencia	1,2x10 <sup>2</sup>
	Pasteurizada (T=0)	Negativo	Ausencia	Ausencia	<1
	Pasteurizada (T=14)	Negativo	Ausencia	Ausencia	<1

PMB: pasteurización media baja, PMA: pasteurización media alta.

#### 2.4.5 Pasteurización ATCT

Se realizó un análisis de la vida útil microbiológica y sensorial de la leche caprina obtenida a partir del tratamiento ATCT, envasada y conservada en heladera durante 35 días para tal fin. RAM y CT fueron tomados como indicadores microbiológicos y acidez como indicador sensorial.

Los valores de RAM en la leche ATCT inmediatamente envasada, se encontraron entre 1 y 2 log ufc/mL, valor que se mantuvo constante aproximadamente hasta los 5 días y posteriormente comenzó a aumentar.

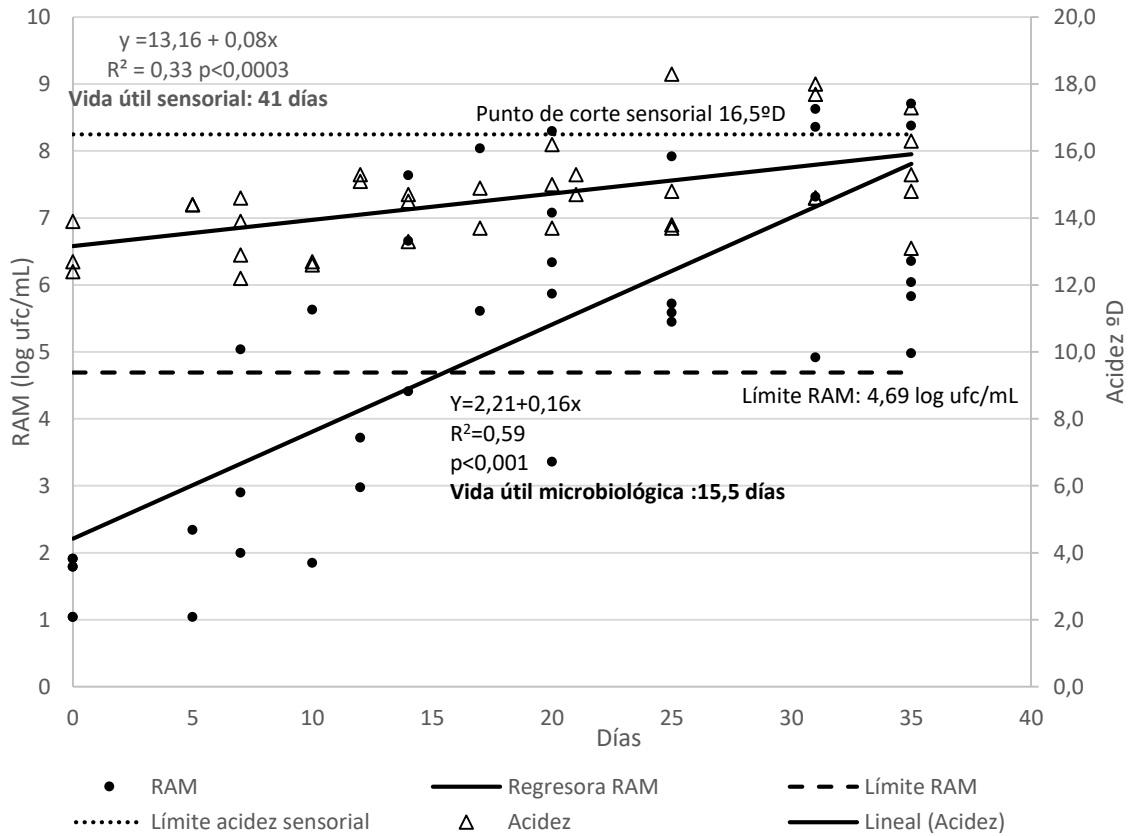


La pasteurización high temperatura short time (HTST alta temperatura corto tiempo) mata el 99,999% de patógenos (FDA, 2009) y es eficaz para reducir la población viable de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (4 - 5 log), pero no es efectiva para destruir las bacterias formadoras de esporas (Tomasula y col., 2011). En estudios realizados por Pholisa y col. (2005), donde se aplicó pasteurización low temperatura long time (bajas temperaturas bajos tiempos LTLT- 63°C 40min) y HTST (90°C 10 min) a cepas de *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Pseudomonas putida*, una levadura lipolítica (G1) y una cepa de referencia *Bacillus coagulans*, observaron que solo la cepa de *Bacillus cereus* sobrevivió a la pasteurización LTLT y al tratamiento de pasteurización HTST. La pasteurización puede inducir a la germinación de esporas al eliminar la microbiota competidora (Granum y Lund, 1997) y las esporas psicrotróficas germinarán y crecerán durante el almacenamiento refrigerado (Kramer y Gilbert, 1989). Sutherland y col. (1996), mostraron que, según la temperatura de crecimiento, las cepas de *Bacillus cereus* pueden ser divididos en dos grupos: como psicrotróficos (crecen a 5°C y reaccionan rápidamente a 10°C) y mesófilos (no crece por debajo de 8°C y solo crece lentamente a 10°C). La temperatura utilizada en este tratamiento térmico es alta por lo que se considera que la microbiota vegetativa es eliminada, por lo tanto, el crecimiento microbiano posterior a los 5 días pudo deberse a los microorganismos germinados a partir de esporas que sobrevivieron a dicho tratamiento térmico.

Estudios realizados por Ranieri y col. (2009), indicaron que en leche pasteurizada y conservada a 6°C, predomina el género *Bacillus* (> 85%) hasta los 7 días, seguido de un cambio por el género *Paenibacillus* (92%) hasta los 21 días; o microorganismos que contaminan la leche posterior al proceso de pasteurización durante el envasado. Según la ecuación obtenida por el modelo de regresión lineal simple, se estimó la vida útil de la leche ATCT en 15,5 días (Fig. 2.4.4), momento a partir del cual alcanzó el límite permitido por el CAA para leche pasteurizada.

Durante el tiempo que duró el estudio de vida útil del producto de leche caprina ATCT, no se detectó la presencia de CT razón por la cual no se incluyó este parámetro en la Figura 2.4.4. El análisis de la vida útil sensorial, se realizó teniendo como parámetro de comparación el punto de corte sensorial obtenido en leche caprina pasteurizada por pasteurización media (Chávez y col., 2009), puesto que no se encontraron referencia de

este límite en leche caprina ATCT. La acidez varía lentamente a lo largo del tiempo, por lo que la vida útil sensorial se estimó igual a 41 días. Considerando ambos resultados, este producto no debe ser consumido después de los 15,5 días, conservado en cadena de frío.



**Figura 2.4.4.** Vida útil microbiológica y sensorial de leche caprina ATCT (altas temperaturas cortos tiempos). Rectas ajustadas a la relación RAM (recuento de aerobios mesófilos) vs tiempo y acidez vs tiempo.

## 2.5 Conclusiones

- Los indicadores microbiológicos seleccionados permitieron verificar la eficiencia del tratamiento térmico y estimar la vida útil de la leche caprina tratada térmicamente mediante pasteurización media y ATCT.
- RAM, no es un indicador concluyente, porque incluye BAL, se recomienda utilizar como indicadores microbiológicos a RAM y CT.
- Los indicadores permitieron verificar que las condiciones recomendadas de heladera (<8°C), son las adecuadas para conservar los alimentos.
- Incluir el análisis de *Bacillus* sp. a las leches ATCT es necesario para ampliar el análisis de la vida útil de la leche caprina pasteurizada.
- La calidad de la leche cruda es importante y condiciona la carga inicial posterior a cualquier tratamiento térmico.
- El análisis conjunto de indicadores sensoriales y microbiológicos son importantes para estimar la vida útil de la leche tratada térmicamente.
- Los resultados de este estudio ilustran claramente que los diferentes métodos de tratamientos térmicos juegan un papel importante en la supervivencia/destrucción de las poblaciones microbianas.

## Capítulo Nº3: Potencial de la microbiota láctica natural de la leche caprina como indicador de denominación de origen (D.O.)

### 3. 1. Introducción

Las bacterias lácticas (BAL), representan la microbiota principal de la leche, la cual es esencial para la fabricación de productos lácteos fermentados, tales como queso, yogur, entre otros (Reviriego, 2009).

En la leche cruda de cabra, las BAL, juegan un papel importante en las características sensoriales y de textura de los quesos (Delgado y col., 2011; Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis, 2011). Es el caso de los quesos de cabra artesanales del norte argentino, los cuales se elaboran de acuerdo a la tradición familiar de cada productor, con leche cruda recién ordeñada, sin el agregado de cultivos iniciadores ni adjuntos (Chavez y col., 2011; Palladino y col., 2012), cuyas propiedades sensoriales típicas, se deben principalmente a la microbiota láctica natural aportada por la leche cruda y el cuajo caprino artesanal (Chavez, 2014). Asimismo, en muchas regiones europeas con actividad caprina, como en nuestro país, la leche es procesada en la propia granja, sin ningún tratamiento que controle la microbiota nativa (Oliszewski y col., 2006; Pirisi y col., 2007; Medina y col., 2011). Según Scintu y Piredda (2007), en tales condiciones de procesamiento, la microbiota en la leche cruda es una expresión de la diversidad de microorganismos del ecosistema local, que tienen un marcado impacto en las características del producto final.

Estas características, en la Comunidad Europea, están protegidas por la legislación sobre Denominación de Origen (DO) e Identidad Geográficas (IG). Estas designaciones constituyen un elemento para la protección de la biodiversidad de un territorio (geológico, climático), plantas, animales y microorganismos; y las prácticas y sistemas de producción, vinculados a la historia y la cultura local.

Varios autores han demostrado la alta diversidad microbiológica producida en la leche durante la lactancia, y sumado a esto, las diferentes características de la producción primaria y el territorio (Macedo y col., 1993, 2004; Pérez Elortondo y col., 1998; Medina y col., 2001; Nikolaou y col., 2002; Scintu y col., 2004).

La microbiota láctica de la leche cruda de cabra incluye diferentes géneros, tales como lactococos, lactobacilos y enterococos (Badis y col., 2004; Delavenne y col., 2012; McInnis y col., 2015; Tormo y col., 2015). Estos microorganismos, tienen actividades enzimáticas que les permiten producir compuestos de flavor a partir del metabolismo de la lactosa, el citrato, de las proteínas y los lípidos en el queso (Medina y col., 2011), generando compuestos como acetoina, acetato, diacetilo, acetaldehído, péptidos, aminoácidos y ácidos grasos volátiles (McSweeney y Sousa, 2000; Macedo y col., 2004; Marilley y Casey, 2004; Medina y col., 2011), así como compuestos antimicrobianos (etanol, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas), exopolisacáridos y diversas enzimas (Reviriego Herráez, 2009).

Las BAL autóctonas aislados de leche cruda o quesos elaborados con leche cruda, son frecuentemente asociadas con perfiles volátiles complejos. Lo interesante de estas bacterias, son sus propiedades metabólicas mediante las cuales generan diversos productos que contribuyen al aroma, textura, conservación y valor nutritivo de una gran variedad de alimentos fermentados (Kleerebezem y Hugenholtz, 2003). Si bien el nivel final y la proporción de estos productos metabólicos dependen de la especie, de la composición química del sustrato y de las condiciones que imperan durante la fermentación, la biodiversidad de las cepas involucradas en el proceso de fabricación de queso y en la preparación de otros productos lácteos, es la base de la tipicidad y singularidad de los productos (Scintu y Piredda, 2007).

Existen numerosos estudios sobre la microbiota láctica de leche (Medina y col., 2011; Oliszewski y col., 2006; Badis y col., 2004) y quesos de cabra (Samelis y col., 2011; Dolci y col., 2008; Oliszewski y col., 2006; Marino y col., 2003), pero no se han realizado estudios sobre las BAL de leche caprina asociada a la zona de procedencia en el noroeste argentino. A razón de la importancia de la actividad quesera en el NOA, resulta relevante la caracterización, identificación y la exploración del potencial tecnológico de las BAL en zonas queseras de Salta, con la finalidad de conocer la diversidad microbológica, su potencial tecnológico, y de existir, su diferenciación según la zona de procedencia. Así mismo, al ser empleadas como cultivos iniciadores y/o adjuntos, observar si pueden otorgar características de flavor particulares de la región de la cual son nativas.

### 3.2 Objetivo

Investigar el potencial de la microbiota láctica natural de la leche caprina como indicador de denominación de origen (D.O.).

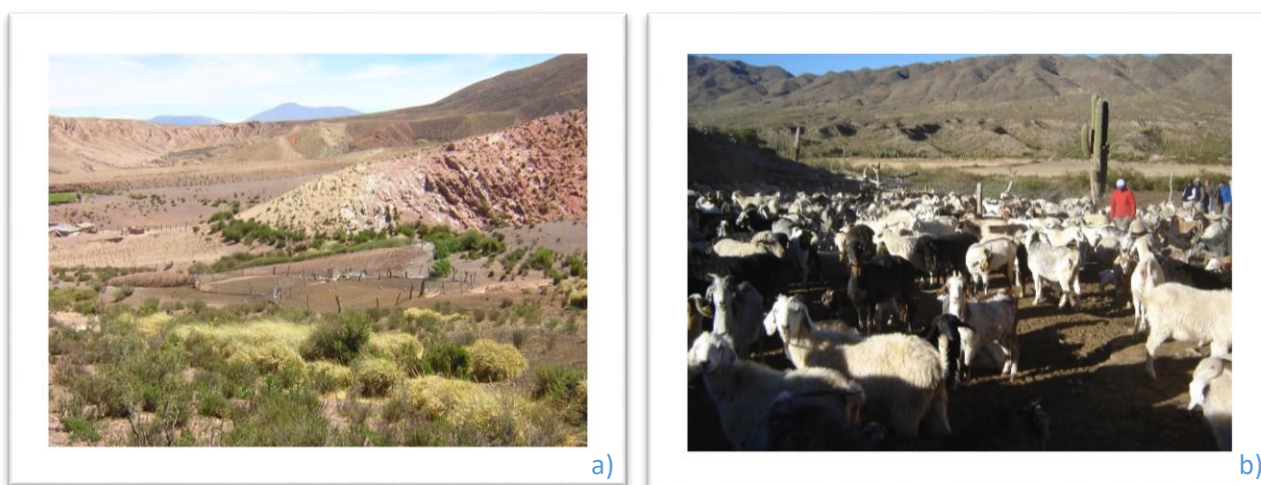
### 3.3 Materiales y métodos

#### 3.3.1 Lugar de muestreo

Se seleccionaron dos ecosistemas claramente diferentes de la provincia de Salta-Argentina:

**Valle de Amblayo**, ubicada en la región ecogeográfica de Valles Áridos y Quebradas, aproximadamente a 2600 msnm, con escasa precipitación y gran amplitud térmica durante el día, donde la provisión de energía y agua es escasa (Figuras 3.3.1 a y b).

**Valle de Lerma**, ubicada en la región ecogeográfica de Valles Templados, entre 1100 y 1200 msnm, con lluvias que alcanzan los 850 mm/año; la disponibilidad de caminos, agua y energía eléctrica es fundamental para lograr y sostener el desarrollo (Figura 3.3.2 a y b).



**Figura 3.3.1.** Valle de Amblayo. a) Descripción de la zona. b) Corral caprino.

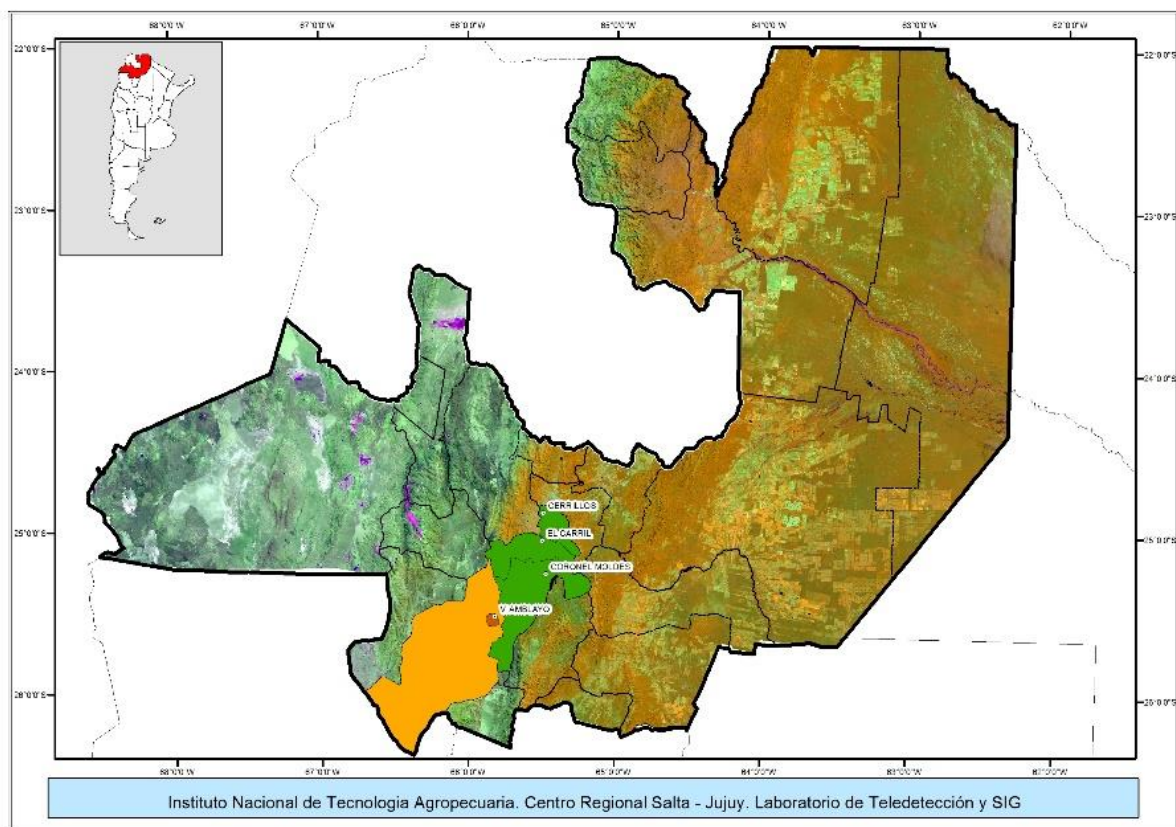


**Figura 3.3.2.** Valle de Lerma. a) Descripción de la zona. b) Corral caprino.

### 3.3.2 Muestras

Para el aislamiento y caracterización de las BAL, se seleccionaron tres tambos por ecosistema como unidad de muestreo. En Valle de Lerma se localizaron en Cerrillos, Moldes y el Carril. En Valle de Amblayo, se localizaron en las zonas de: Río Salado, La Junta y Valle de Tonco (Figura 3.3.1). Las muestras de leche caprina fueron compuestas, conformadas por la totalidad de los ordeños individuales. La toma de las mismas se realizó durante dos años consecutivos, en los meses de agosto y setiembre en el primer año, y mayo y junio en el segundo año. Conformando un total de 24 muestras.

Las muestras se colocaron en frascos estériles, se conservaron en frío (4°C) y se remitieron al laboratorio para su análisis en forma inmediata.



**Figura 3.3.3.** Ubicación de las zonas en estudio en Valle de Amblayo (naranja) y Valle de Lerma (verde).

### 3.3.3 Análisis de calidad de la leche caprina

#### 3.3.3.1 Calidad higiénica

Las evaluaciones de microorganismos indicadores de calidad, se realizaron sobre las muestras de leche caprina cruda, según las directrices del Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2006). Las determinaciones realizadas fueron: Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM), el método utilizado es el recuento total en placa (en agar PCA), Coliformes totales (CT), recuento directo en placa (en agar bilis rojo violeta). También se analizó la presencia de patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria sp.* (ICMSF, 2006). El Conteo de Células Somáticas (CCS) se obtuvo por el método de microscopía fluorescente por citometría de flujo (cel/mL, Fossomatic), ISO 13366-2:2006 (IDF 148-2:2006).



### 3.3.3.2 Calidad fisicoquímica

Los análisis fisicoquímicos: pH, acidez y lipólisis, se realizaron en la leche caprina según los procedimientos descritos en el capítulo 1.

Los análisis fisicoquímicos: Sólidos totales (g%), Proteínas totales (g%), Grasa (g%) y Lactosa (g%), se realizaron según los procedimientos descritos en el capítulo 2.

### 3.3.4 Análisis Microbiológicos

#### 3.3.4.1 Aislamiento de bacterias lácticas

El aislamiento de BAL a partir de leche fluida de cabra se realizó en los siguientes medios de cultivo: M17 (Terzaghi y Sandine, 1975) (Biokar), selectivo para *Lactococcus*, MRS (De Man y col., 1960) (Biokar), selectivo para *Lactobacillus* y MSS (Audisio, 1999; Audisio y col., 2005), selectivo para *Streptococcus*.

Se homogenizaron 10 mL de leche cruda en 90 mL de agua peptonada estéril 0,1% (p/v) para obtener una dilución 1:10. Se realizaron diluciones decimales sucesivas con agua peptonada estéril 0,1% (p/v). Se plaquearon por duplicados con siembra en superficie, alícuotas de 0,1 mL en los medios específicos. Las placas de M17 y MRS fueron incubadas a 37°C en condiciones de microaerofilia (presión de O<sub>2</sub> del 7% y de CO<sub>2</sub> del 14%, v/v) durante 24, 48 (luego del cual se realizó el recuento de los microorganismos) y 72 h; las placas de MSS se incubaron en condiciones de aerobiosis a igual temperatura y tiempo.

#### Selección de colonias

De cada placa, correspondiente a la dilución en la que se obtuvieron entre 30 a 300 colonias perfectamente separadas, se seleccionaron aquellas que fueran circulares, pequeñas, con bordes definidos, blancas o cremas, chatas o lenticulares.

Las colonias fueron sembradas en caldo M17, MRS o BHI (Brain Heart Infusion) según el agar del cual provenían (M17, Rogosa, MSS respectivamente). La incubación se realizó a 37°C por 24 y 48 h. Verificado el crecimiento, para lograr una buena activación

de las células antes de iniciar el proceso de identificación, se procedió a realizar un nuevo repique (inóculo 2%, v/v) que se incubó a 37°C por 24 h.

### 3.3.4.2 Identificación de bacterias lácticas

#### Caracterización primaria de bacterias lácticas

Se realizó la caracterización de los aislamientos en base a los procedimientos descritos por Bergey's Manual of Determinative Microbiology (1994). Se evaluó: morfología y movilidad celular, coloración de Gram, actividad catalasa y actividad nitrato reductasa.

- Morfología y movilidad celular

Se realizaron observaciones a partir de preparados frescos en microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x). Se determinó la pureza del cultivo, la morfología coco o bacilo y la movilidad celular.

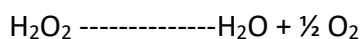
- Coloración de Gram

Se utilizaron los reactivos de Gram de Britania, el procedimiento se realizó según las instrucciones del proveedor. Los preparados se observaron al microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x).

- Actividad catalasa

La catalasa es una enzima que se halla presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos, y descompone el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) desprendiendo oxígeno. Las BAL son catalasa (-), excepto algunas especies del género *Pediococcus*.

La actividad catalasa se determinó por la adición de gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10 volúmenes (uso medicinal) sobre una alícuota del cultivo. El desprendimiento de burbujas de gas (oxígeno), fue considerado como indicador de reacción positiva.



- Actividad nitrato reductasa

Se inocularon 60 µL de cultivo en caldo nitrato para obtener una concentración del 2% (v/v) y se incubó a 37°C durante 7 días. Luego del período de incubación, se tomó 100 µL de este cultivo al que se le agregaron 100 µL de los reactivos A (1 g de ácido sulfanílico en 100 mL de ácido acético 5N) y B (1 g de α naftol en etanol 95%, v/v) respectivamente. Al cabo de unos segundos se determinó el viraje de color del medio de incoloro a rojizo.

Con estas pruebas se identificaron como posibles BAL, las que respondieron a las siguientes características:

- Cocos o bacilos.
- Gram (+).
- Actividad catalasa negativa (-).
- Actividad nitrato reductasa negativa (-).

#### **3.3.4.3 Conservación de Bacterias lácticas**

Para conservar las BAL, 5 mL de cada cultivo crecido toda la noche se centrifugó a 9000 rpm durante 15 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante. El pellet fue diluido con 1 mL de caldo MRS, M17 y BHI (según agar del que provino la cepa), adicionado con glicerol al 20% (v/v) como crioprotector. Se conservaron en crioviales en nitrógeno líquido a -196°C.

#### **3.3.4.4 Caracterización tecnológica (Etapa exploratoria)**

Con la finalidad de estudiar el potencial tecnológico y la inocuidad de las bacterias aisladas, para posteriormente realizar una selección primaria de los aislamientos, se procedió a analizar las BAL mediante pruebas bioquímicas y de caracterización de factores de virulencia, las mismas se efectuaron sobre 90 aislamientos del total caracterizado como BAL.

Se comprobó que todas las bacterias tuvieron crecimiento óptimo en caldo BHI, por lo que se optó por este medio de cultivo para realizar las pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas y alta concentración de sal.

- Crecimiento a diferentes temperaturas

Se inoculó 100 µL de cultivo activo en 5 mL de BHI (Britania). Los mismos se expusieron a temperaturas de 4°C, 37°C y 45°C por un período de 24 y 48 h (los expuestos a 37° y 45°C) y 10 días (los expuestos a 4°C). El crecimiento de las bacterias se siguió por la aparición de turbidez en el medio.

- Crecimiento de las BAL en presencia de 6,5% (p/v) de NaCl

Se inoculó 100 µL de cultivo activo en 5 mL de BHI con NaCl 6,5% (p/v). Los cultivos se incubaron a 37°C, por un período de 24 y 48 h. El crecimiento de las bacterias tolerantes a altas concentraciones de sal se determinó por la aparición de turbidez en el medio de cultivo.

- Capacidad de acidificación en leche azul de metileno

Se centrifugaron 5 mL de un cultivo activo a 3100 rpm, durante 15 min. El pellet celular se lavó con solución fisiológica (0,85%, p/v; NaCl) y luego se resuspendió en 5 mL de la misma solución. Se inocularon 60 µL del cultivo lavado, en 3 mL de leche con azul de metileno (0,3%, p/v). El cultivo se incubó a 37°C y se observaron los cambios (viraje de color y formación de coágulo) a las 8, 16, 24 y 48 h. Aquellas BAL que produjeron el viraje del color del medio azul a celeste (debido a la reducción del indicador azul de metileno) a las 8 o 16 h, fueron caracterizadas como acidificantes rápidas, y las que lo produjeron después de las 24 o 48 h fueron consideradas acidificantes lentas.

- Fermentación de citrato

Se tomó una alícuota del cultivo activo, y se sembró por estriado en medio diferencial agar citrato de calcio. Luego las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Las BAL que fermentan el citrato de calcio, originan halos claros alrededor de la colonia (Galeslod y col., 1961). Tabla 3.3.1.

**Tabla 3.3.1.** Fermentación de citrato, según la formación de halo claro en medio diferencial agar citrato de calcio.

Fermentación del citrato	Formación de halo
Citrato (-)	Ausencia de halo
Citrato medio (Cm 24 h)	Formación de halo claro débil
Citrato medio (Cm 48 h)	Formación de halo débil claro a las 48 h
Citrato fuerte a las 24 h (Cf)	Formación de halo claro intenso

- Producción de diacetilo y acetoina

Se inocularon 20 µL de un cultivo en fase exponencial en 2 mL de LDR (leche descremada reconstituida) al 10% (p/v), y se incubó durante 24 h a 37°C. Posteriormente se agregaron 500 µL de solución α-naftol (0,5%, p/v; en alcohol absoluto) y 200 µL de solución KOH-creatina (KOH al 40%, p/v; en agua + 0,3 g de creatina). Se homogenizó en agitador durante 10 segundos y se dejó reposar 10 min. Al cabo de este tiempo se observó la ausencia o presencia de una banda rosa en la parte superior del medio, siendo la intensidad del color proporcional a la cantidad de diacetilo formado (IDF 1997; Almeida Junior y col., 2015). (Tabla 3.3.2).

**Tabla 3.3.2.** Producción de diacetilo-acetoina, según la ausencia o presencia de una banda rosa en la parte superior del medio de cultivo.

Formación de diacetilo-acetoina	Formación de banda
Diacetilo-acetoina nulo (-)	Ausencia de banda rosa
Diacetilo-acetoina débil (Dd)	Formación de banda rosa débil
Diacetilo-acetoina medio (Dm)	Formación de banda rosa
Diacetilo-acetoina fuerte (Df)	Formación de banda rosa intensa

- Formación de coágulo

Se inocularon 20 µL de un cultivo en fase exponencial en 2 mL de LDR (leche descremada reconstituida) al 10%, y se incubó durante 24 h a 37°C. Se observó la formación a las 8, 16, 24 y 48 h.

### 3.3.4.5 Pruebas de Inocuidad

En base a los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas, se realizó una selección de 60 cepas de bacterias lácticas, que tuvo como criterio escoger aquellas BAL que mostraran algún potencial tecnológico. Sobre las mismas se procedió a realizar pruebas de inocuidad.

- Determinación de actividad hemolítica

Para la prueba de hemólisis, cultivos activos de las BAL se sembraron en placas de agar Columbia con el agregado de 5% (v/v) de sangre ovina (Laborkit, Argentina) y se incubaron durante 48 h a 37°C. La reacción hemolítica se evaluó observando tanto la hidrólisis parcial de los glóbulos rojos, por la producción de una zona verde ( $\alpha$ -hemólisis), así como la hidrólisis total de los glóbulos rojos que produce una zona clara alrededor de la colonia ( $\beta$ -hemólisis) o ninguna reacción ( $\gamma$ -hemólisis) (Almeida y col., 2015).

- Determinación de actividad gelatinasa

Cultivos frescos de la cepa en estudio se inocularon en agar Todd-Hewitt (Britania, Argentina), suplementado con gelatina (30 g/L), y se incubaron durante 48 h a 37°C. A continuación, la superficie de las placas fue cubierta con la solución de revelado (15%, v/v; HgCl<sub>2</sub> en HCl 20%, v/v) (Pangallo y col., 2008) y fueron llevadas a 8°C. La pérdida de turbidez alrededor de las colonias se interpreta como actividad gelatinasa positiva.

- Susceptibilidad a vancomicina

Se estudiaron 4 concentraciones del antibiótico: 35, 5, 2,5, y 1,2  $\mu$ g/mL. Se realizó una siembra en césped al 1% en medio Muller Hilton agar (Britania). Luego se colocaron 20  $\mu$ L de cada dilución de vancomicina en perforaciones del medio agarizado. Las placas se incubaron a 37°C y al cabo de las 16, 20, 24 y 48 h se observaron presencia/ausencia de halos de inhibición.

La susceptibilidad a vancomicina según la CIM requerida por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 2001) (EEUU) se determinó según la Tabla 3.3.3.

**Tabla 3.3.3.** Categorías de susceptibilidad a vancomicina para *Enterococcus* spp. según la CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Susceptibilidad a vancomicina	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )
Bacterias resistentes a vancomicina	CIM > 32
Bacterias susceptibles a vancomicina	CIM < 4

### 3.3.5 Caracterización molecular y tecnológica de las cepas

Se seleccionaron en total 40 cepas de BAL según pruebas bioquímicas y de inocuidad. Estas fueron tipificadas mediante pruebas moleculares y analizado su potencial tecnológico, susceptibilidad a antibióticos y análisis de su potencial antimicrobiano. Para todos los casos las pruebas se hicieron por triplicado.

#### 3.3.5.1 Caracterización molecular

##### Extracción de ADN a partir de cultivos puros

El ADN genómico total se obtuvo a partir de un cultivo puro de 24 h en caldo BHI por lisis alcalina de acuerdo a Pospiech y Neumann, 1995.

El pellet se recuperó por centrifugación durante 10 min, a 3100 rpm a temperatura ambiente, fue resuspendido en 500  $\mu\text{L}$  de buffer SET (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5). Se adicionó 50  $\mu\text{L}$  de lisozima (1 mg/mL) y se incubó a 37°C. Al cabo de 1 h se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de SDS al 10% (v/v) y 28  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (0,5 mg/mL). Luego se incubó durante 2 h a 55°C y se adicionaron en frío y bajo campana, 60  $\mu\text{L}$  de solución de acetato de potasio 3 M y 650  $\mu\text{L}$  de cloroformo. Al cabo de 30 min a temperatura ambiente, la muestra se centrifugó durante 10 min, a 13000 rpm a 4°C, la fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf con el fin de precipitar el ADN y se agregó 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Se centrifugó nuevamente (10 min, a 13000 rpm a 4°C), se

descartó el sobrenadante y el ADN se lavó con 500 µL de etanol 70%. Finalmente, el tubo se dejó secar a temperatura ambiente para luego re suspender el pellet en 50 µL de agua de PCR (agua destilada esterilizada).

La calidad y cantidad del ADN extraído se estimaron en un gel de agarosa 0,8% (p/v), utilizando como estándar interno un marcador molecular de 100 - 1000 pb (InBio, Tandil, Argentina). El gel se tiñó con GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) durante 30 min y luego se visualizó en el transiluminador de luz UV (UVP Model M-20, Inc. Upland, CA).

#### Amplificación del gen ARNr 16S

Se realizó la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S utilizando dos oligonucleótidos S-D-Bact -0008-a-S-20 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y S-D-Bact-1495-a-A-20 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3' (Daffonchio y col., 1998).

La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 25 µL que contenía 1,5 µL del ADN genómico (15-30 ng de ADN bacteriano), 0,5 µL de *Taq* polimerasa (2,5 U - Promega), 2,5 µL de buffer STR (1X - Promega), 2 µL de cada cebador (0,16 µM - Genbiotech SRL Buenos Aires, Argentina) y 16,5 µL de agua para PCR. La amplificación de ADN se realizó en un termociclador Eppendorf Master Cycle Gradient (Hamburgo, Alemania), programado con una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 50°C durante 45 segundos y 72°C durante 45 segundos, y una extensión final de 72°C durante 10 min (Hebbert y col., 2000).

Una alícuota de 7 µL del producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, p/v; a 90 V en buffer TBE 1X durante 1 h a temperatura ambiente. Los geles se tiñeron con GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, EE. UU.) y los fragmentos se visualizaron en un transiluminador de luz U.V. (UVP Model M-20, INC. Upland, EEUU). El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de ADN de 100 a 1000 pb (pares de bases) (Highway-Inbio, Tandil, Argentina).

Los productos purificados se secuenciaron en ambas direcciones (forward y reverse) utilizando los cebadores S-D-Bact -0008-a-S-20 y S-D-Bact-1495-a-A-20, en el secuenciador 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) en el Instituto de



Biotecnología del INTA-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Castelar, Buenos Aires, Argentina).

#### Análisis de las secuencias de ADN

Las secuencias de ADN (forward y reverse) de cada bacteria, fueron alineadas usando Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) y luego se ajustaron manualmente con BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999). Los aislados fueron identificados mediante la utilización de la herramienta de búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) comparándolos con secuencias del gen ARNr 16S de diferentes especies bacterianas disponibles en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias que mostraron más del 99% de similitud fueron consideradas como pertenecientes a la misma especie (Altschul y col., 1997).

Las secuencias se enviaron al GenBank en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y se obtuvieron los números de acceso.

#### **3.3.5.1 Diversidad genética de las cepas (perfiles RAPD-PCR)**

Se analizaron las 40 cepas mediante la técnica RAPD-PCR, (Random Amplified Polymorphic DNA) (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col., 1990). Este método permite generar un patrón de bandas característico para cada cepa. Y de esta manera analizar la diversidad microbiana más allá del nivel de la especie (Randazzo y col., 2009), es decir, establecer grupos diferentes y diferenciar aquellos que podrían representar cepas con alta similitud.

La amplificación se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L; como templado se utilizó 1  $\mu$ L de ADN total de cada cepa (entre 30 y 50 ng), 0,5  $\mu$ L de dNTPs (200  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ L de *Taq* Polimerasa (2,5 U), 2,5  $\mu$ L de buffer (1X) y 2,5  $\mu$ L de  $Cl_2Mg$  (1,5 mM). En cuatro reacciones independientes, se incluyeron 1,25  $\mu$ L de los siguientes primers (10  $\mu$ M): B06 (5'-TGCTCTGCCC-3'), B07 (5'-GGTGACGCAG- 3'), B08 (5'-GTCCACACGG-3') y B10 (5'-CTGCTGGGAC-3'). El método utilizado es el modificado por Binetti y col. (2007), donde se utilizan cuatro cebadores para aumentar la sensibilidad y la reproducibilidad de la técnica (Tailliez y col., 1998). La amplificación de ADN se realizó utilizando un termociclador Eppendorf Master Cycle Gradient (Hamburgo, Alemania). Las condiciones

de la reacción tras un paso de desnaturalización inicial a 94° C durante 5 min fueron las siguientes: 30 ciclos con un paso de desnaturalización (94° C durante 1 min), hibridación (36°C durante 2 min) y extensión (72°C durante 2 min), seguidos de un paso de extensión final a 72°C durante 7 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%. En el gel se sembraron 5 µL de cada muestra junto a 2 µL de los marcadores 100-1000 pb y 1kb (INBIO, Tandil, Argentina). Los productos de reacción fueron teñidos con GelRed™ y visualizados en transiluminador UV.

#### Construcción de la matriz básica de datos

En primer lugar, se definieron las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) como cada uno de los 40 aislados de bacterias lácticas. En segundo lugar, se definieron los caracteres, como cualquier propiedad que varía entre las OTUs. A partir de lo observado en las amplificaciones con los 4 cebadores de todos los aislados se construyó la matriz básica de datos (MBD) (Sneath y Sokal, 1973). Esta es una matriz  $n \times t$  donde las  $n$  filas representan las bandas (caracteres) y las  $t$  columnas representan los genotipos de las bacterias lácticas. Los datos de la MBD son datos de tipo binario o doble estado. Para cada cebador se consideró presencia (1) y ausencia (0) de bandas.

#### Construcción de la matriz de similitud

A partir de los datos de la MBD, se cuantificó la similitud entre los genotipos y se construyó una matriz de similitud entre los distintos OTUs aplicando el coeficiente de asociación de Dice (Dice, 1945; Nei y Li, 1979). Este coeficiente mide las coincidencias y diferencias entre los caracteres de ambos genotipos (Legendre y Legendre, 1983), confiriéndole mayor peso a las coincidencias.

El coeficiente de Dice se expresa de la siguiente manera:  $S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$  (Dice, 1945; Nei y Li, 1979), donde  $S_{ij}$  es la similitud entre dos individuos,  $i$  y  $j$ ;  $a$  es el número de bandas presentes en ambos  $i$  y  $j$ ;  $b$  es el número de bandas presentes en  $i$  y ausentes en  $j$  y  $c$  es el número de bandas presentes en  $j$  y ausentes en  $i$ . Los valores de similitud oscilan entre 1 y 0, que equivalen a la máxima y mínima similitud, respectivamente.

Las matrices de similitud se generaron utilizando el módulo SimQual del programa NTSYS-pc ver.2.0 (Rohlf, 1998).

### Análisis de agrupamientos

A fin de permitir el reconocimiento de las relaciones entre la totalidad de las OTU, se analizó la matriz de similitud con la técnica de UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*).

La estructura obtenida a través del análisis de agrupamiento se representó gráficamente mediante un dendrograma que muestra la relación de similitud entre las OTUs. La comparación de la diversidad genética por zona se realizó en base a la identificación de genotipos moleculares considerando un valor de similitud del 80% (Giraffa y col., 2004; Rosseti y col., 2004; Psony y col., 2006). Para evaluar la medida en que el dendrograma representa los valores de la matriz de similitud, se obtuvo el coeficiente de correlación cofenética (CCC). Para ello se empleó el programa MXCOMP de NTSYS-pc ver. 2.0 para calcular la correlación cofenética existente entre la matriz de valores cofenéticos y la correspondiente matriz de similitud, mediante el coeficiente de correlación momento-producto ( $r$ ) y la prueba de Mantel (estadístico  $Z$ ), que sirven para medir el grado de relación que existe entre las matrices comparadas (Mantel, 1967). Generalmente los valores obtenidos oscilan entre 0,6 y 0,95, de modo que valores superiores a 0,8 indican una escasa distorsión o una buena representación de la matriz de similitud por parte del dendrograma (Sneath y Sokal, 1973).

### **3.3.6 Susceptibilidad a antibióticos**

#### Método de difusión en discos

Se realizó de acuerdo con las indicaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (EEUU). Se utilizó el método de difusión en disco, empleando discos (Britania Argentina) conteniendo los antibióticos: ampicilina (AMP 10  $\mu$ g), cloranfenicol (CHP 30  $\mu$ g), clindamicina (CLI 2  $\mu$ g), gentamicina (GEN 10  $\mu$ g), tetraciclina (TET 30  $\mu$ g), vancomicina (VAN 30  $\mu$ g) y penicilina G (PEN 10 UI). Cultivos activos de las BAL, crecidos en caldo BHI, se diluyeron hasta alcanzar un valor de 0.5 en la escala de McFarland (aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/mL) y fueron estriados en agar Mueller-Hinton (Britania, Argentina). Los diámetros de los halos de inhibición se midieron en las placas, después de una incubación de 16 h. a 37°C. Los resultados de

inhibición fueron evaluados considerando los puntos de cortes recomendados por la agencia NCCLS (NCCLS, 2007). Tabla 3.3.4.

**Tabla 3.3.4.** Puntos de cortes recomendados por la agencia NCCLS según el diámetro de inhibición.

Antibióticos	Diámetro de la zona de inhibición (mm)		
	R	I	S
AMP (10 µg)	≤16	-	≥17
TET (30 µg)	≤14	15-18	≥19
GEN (10 µg)	≤12	13-14	≥15
PEN (10 U)	≤14	-	≥15
CHP (30 µg)	≤12	13-17	≥18
VAN (30 µg)	-	-	≥15

AMP: ampicilina, TET: tetraciclina, GEN: gentamicina, PEN: penicilina, CHP: cloranfenicol, VAN: vancomicina. R: resistente, I: intermedio, S: sensible.

#### Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los antibióticos que comúnmente se utilizan en infecciones intrahospitalarias causadas por enterococos (Ocaña, 2009). Para ello se usaron los antibióticos comerciales de grado farmacéutico de: vancomicina (1000 mg), ampicilina (1000 mg) y gentamicina (500 mg). Cada antibiótico fue re suspendido en un volumen adecuado de agua destilada de manera de tener una concentración final de 200 mg/mL, que fue considerada la solución madre de cada antibiótico. Estas suspensiones se emplearon dentro de las 24 h de haber sido preparadas y se conservaron durante ese período a 8°C. Para realizar la MIC se prepararon diluciones de 20 mg/mL a 1,2 µg/mL. Los resultados de inhibición fueron evaluados de acuerdo a las MIC recomendadas por la agencia NCCLS (NCCLS, 2002). Tabla 3.3.5.

**Tabla 3.3.5.** Categorías de susceptibilidad a ampicilina, vancomicina y gentamicina para *Enterococcus* spp.

Antibiótico	MIC (µg/mL)	
	R (resistente)	S (sensible)
AMP	> 16	< 8
VAN	> 32	< 4
GEN	>500	<500

MIC: concentración mínima inhibitoria. AMP: ampicilina. GEN: gentamicina. VAN: vancomicina

### 3.3.7 Actividad Antimicrobiana

Los sobrenadantes libres de células (SLC) de cada cepa se recuperaron por centrifugación (5.000 g, 20 min, 25°C) de cultivos frescos de 24 h de incubación en el medio de cultivo BHI a 37°C, se ajustó a pH 6,0 con NaOH 2N estéril. Luego, fueron esterilizados por filtración (0,45 µm) y se mantuvieron a 8°C hasta el momento de ser utilizados.

#### Detección de actividad antimicrobiana

Se analizó la producción de sustancias antimicrobianas en los SLC de las cepas estudiadas frente a cepas de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp y *Eschericia coli* como bacterias indicadoras, mediante la técnica de difusión en agar con modificaciones descritas por Audisio y col. (2005). Brevemente, 20 µL de los SLC en estudio se sembraron en pocitos de 5 mm de diámetro realizados en placas con agar BHI inoculadas con aproximadamente 10<sup>7</sup> ufc/mL de la cepa indicadora. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 - 6 h para permitir la difusión del antimicrobiano (Adbel-Bar y col., 1987; Lewus y Montville, 1991), y luego de incubarlas a 30°C durante 12-24 h, se examinó la presencia/ausencia de halos de inhibición.

### 3.3.8 Formulación de fermentos

Para formular el fermento destinado a la elaboración de un queso caprino semiduro, se seleccionaron tres cepas por zona de estudio, para esto se tuvo en cuenta los resultados obtenidos a partir de la caracterización tecnológica, molecular y de inocuidad realizada a las 40 cepas.

Los criterios utilizados para la selección de las cepas fueron: compatibilidad entre las cepas que forman el fermento, acidificantes rápidas en tina, con potencial tecnológico evaluando la capacidad de fermentar el citrato y producir diacetilo.

#### Compatibilidad entre cepas

Para determinar la compatibilidad entre las cepas seleccionadas, se utilizó el método de difusión en agar. Se sembraron cajas con BHI agar con cultivos de las cepas crecidas durante 24 h, luego de una pre incubación de 1 h a 30°C se hicieron pocillos en el agar de las placas y se llenaron con 50 µL del sobrenadante libre de células del cultivo de las cepas a ensayar. Las placas fueron incubadas por 24 h a 37°C. La compatibilidad se comprobó con la ausencia de halos de inhibición alrededor de los pocillos.

#### Análisis del fermento

Se inoculó al 2% (v/v) (concentración final de  $10^8$  ufc/mL) leche descremada reconstituida (LDR) con las cepas seleccionadas y combinadas por zona.

La leche inoculada, se incubó a 37°C, durante 140 h (leche fermento). A tiempo 0, 24, 48, 72, 80 y 140 h se tomaron muestras, en las cuales se analizó: pH, acidez en leche, formación de coágulo, actividad lipolítica, actividad proteolítica y crecimiento de BAL.

#### Actividad proteolítica

Se realizó la medición de nitrógeno soluble en leche, la técnica utilizada fue una adaptación de la técnica de fraccionamiento de nitrógeno utilizada en queso (Kuchroo y Fox, 1982. Capítulo 4).

Se pesó en vaso de precipitado 10 mL de leche fermento y se agregó 80 mL de agua destilada. A la solución obtenida se le midió el pH, posteriormente se la acidificó con HCl 0,1N hasta alcanzar un pH de 4,6. Se trasvasó la solución acidificada a tubo falcon y se centrifugó por 10 min. A 3000 g. Se filtró el sobrenadante en elermeyer y se enrasó con agua destilada a 100 mL. Se tomó una alícuota de 5 mL y sobre la misma se determinó nitrógeno total por Kjeldah.

Con los resultados obtenidos como nitrógeno soluble en pH 4,6, se calculó el grado de avance (GA), definido como:

$$GA = \frac{(CF - CI)}{CI} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

CF: concentración final de nitrógeno soluble (fermento t=144 h)

CI: concentración inicial de nitrógeno soluble (fermento t=0 h)

#### Actividad lipolítica

Se determinó lipólisis en los fermentos según la técnica de análisis de lipólisis en leche descrita en el Capítulo 1.

La actividad lipolítica se observó, analizando los resultados obtenidos en cada punto de muestreo.

#### **3.3.9. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando el programa InfoStat (Di Rienzo y col., 2017). Se comparó las variables que caracterizan la calidad de leche caprina: microbiológicas (RAM, CT), sanitaria (CCS) y físico químicas (pH, acidez, lipólisis, sólidos totales, proteínas totales, grasa y lactosa), mediante un modelo lineal mixto; se incluyó el efecto de la zona (Valle de Amblayo y Valle de Lerma). La variabilidad entre

tambos fue contemplada como un efecto aleatorio. Se realizó una prueba de comparación de medias con LSD de Fisher.

Se empleó el Análisis de Componentes Principales (ACP) para detectar las variables que tuvieron mayor peso en la diferenciación de zona. Se realizó un Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM) para relacionar las características tecnológicas de las BAL con la zona de procedencia.

Se analizó la resistencia de las cepas cuyos géneros se encontraron en Valle de Amblayo y Valle de Lerma, a los antibióticos ampicilina, aentamicina, vancomicina y penicilina con diferentes concentraciones; para ello se ajustó un modelo lineal general y mixto para el efecto de zona, antibiótico, cepa y sus interacciones. Se realizó una prueba de comparación de medias con LSD de Fisher.

Se estudió la asociación de las características tecnológicas (Capacidad de acidificación, formación de coagulo, utilización de citrato y producción de diacetilo) a través de tablas de contingencia a dos vías de clasificación. La significancia estadística se determinó con el estadístico chi cuadrado de Pearson ( $p < 0,05$ ).



### 3.4 Resultados y Discusión

#### 3.4.1 Caracterización microbiológica, sanitaria y fisicoquímica de la leche de cabra

Se analizó las características microbiológicas (RAM y CT), sanitaria (Conteo de células somáticas CCS) y fisicoquímicas (pH, Acidez °D, Sólidos totales (ST), Proteínas totales, Lipólisis, Grasa y Lactosa) de la leche caprina según zonas de procedencia: Valle de Amblayo (Amb) y Valle de Lerma (VL).

Los valores promedios de RAM por zona, superan los límites propuestos por el CAA (500000 ufc/mL equivalente a 5,7 log ufc/mL), y coinciden con los obtenidos en sistemas caprinos del noroeste argentino (Chavez y col., 2011). Para CT, el valor promedio por zona estuvo entre 2,83 y 2,92 log ufc/mL. El CAA no proporciona un límite para este parámetro en leche caprina cruda, no obstante, en el capítulo 1 de esta tesis se propone 2,6 log ufc/mL como límite. Este valor se obtuvo en base a los recuentos de CT incluidos en 146 muestras de leche cuyos valores de RAM no superaban los valores exigidos por el CAA. Por otro lado, los resultados son satisfactorios si los comparamos con estudios realizados en Malasia, Grecia y Portugal (Morgan y col., 2003; Chye y col., 2004; Kondyli y col., 2012) donde muestran recuentos en el orden de  $10^4$  -  $10^7$  (equivalente a 4 y 7 log ufc/mL) para leche cruda caprina. El conteo de células somáticas respondió al límite establecido por el CCA (1500000 cél/mL equivalente a 6,18 log cel/mL) en ambas zonas. Las características microbiológicas (RAM y CT) y sanitaria (CCS) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre zonas.

Los parámetros fisicoquímicos se encuentran dentro de los rangos esperados para leche caprina (Tabla 3.4.1). Los valores de acidez, proteínas, grasa y consecuentemente sólidos totales fueron más altos en leches de Amb que de VL mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), esto sucede por un efecto de raza ya que, en Amb predomina la raza criolla, mientras que en VL predomina la raza Saanen.

**Tabla 3.4.1.** Comparación de la calidad microbiológica, sanitaria y fisicoquímica de leches caprinas de las zonas de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.

Características microbiológicas, sanitarias y físico químicas	Zona				Valor de referencia
	Amb		VL		
RAM (log ufc/mL)	6,73	a	6,54	a	5,9 log ufc/mL (CAA)
CT (log ufc/mL)	2,92	a	2,83	a	2,6 log ufc/mL (Cap. 1)
CCS (log cél/mL)	5,83	a	5,99	a	6,18 log cél/mL (CAA)
pH	6,73	a	6,69	a	6,57-6,96 (CAA)
Acidez °D	16,51	a	14,89	a	14-22°D (CAA)
Sólidos totales ( g%)	16,44	a	12,32	b	Mín. 9 g% (CAA)
Proteínas totales (g%)	4,89	a	3,88	b	Mín 2,8 g% (CAA)
Lipólisis (µeq/mL)	2,11	a	1,73	a	1,87 µeq/mL <sup>a</sup> (Morgan, 2001)
Grasa (g%)	7,15	a	4,08	b	Mín. 3,0 g% (CAA)
Lactosa (g%)	3,39	b	4,01	a	Mín. 3 g% (CAA)

Amb: Valle de Amblayo. VL: Valle de Lerma.

Medias ajustadas con un modelo lineal mixtos con efecto aleatorio de tambo

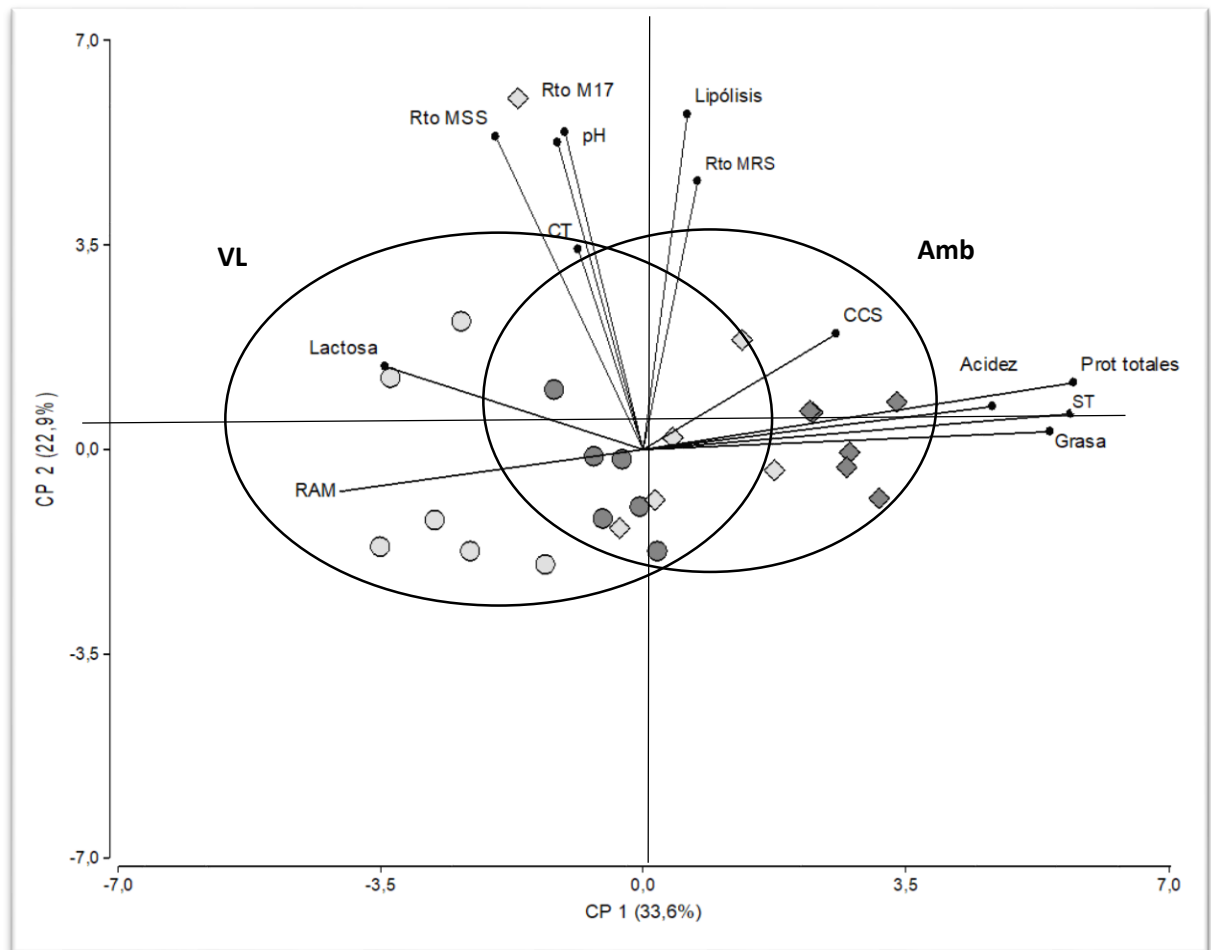
Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (valor  $p < 0,05$ ) entre zonas.

<sup>a</sup> Valor de referencia 1,97 gAO/100 g MG, transformado según equivalencia 1 meq/100 g de MG corresponde a 0,28 g de AO (Meffe, 1994). Calculada en base a grasa 2,69% y densidad 1,026 g/mL.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para las zonas Amb y VL teniendo en cuenta las características microbiológicas (RAM, CT, recuento de BAL en MRS, MSS y M17), sanitaria (CCS) y físicos-químicas (pH, acidez, sólidos totales, proteínas totales, lipólisis, grasa, lactosa).

El porcentaje de variación total explicado por las dos componentes principales del ACP fue del 56,5%. El componente 1 (CP1) explica el 33% de la variabilidad. Las variables fisicoquímicas: acidez, proteínas totales, grasa y sólidos totales presentaron valores más altos en la zona Amb. Mientras que la lactosa y RAM fueron más elevados en VL. Además, la mayor variabilidad se observó entre las muestras de otoño de Amb, con valores más altos en CCS, leches más ácidas, con mayor contenido de grasa y sólidos totales, pero con menores valores en lactosa y RAM. Las muestras procedentes de VL en primavera tuvieron mayor contenido de lactosa y valores más altos en RAM, así mismo

fueron leches menos ácidas, con menor cantidad de proteínas totales, grasas y sólidos totales (debido a la correlación negativa entre estas últimas variables y las variables lactosa y RAM). Las variables pH y lipólisis, así como las microbiológicas: de BAL y CT no tienen incidencia sobre la CP1 ya que la proyección sobre el eje es muy próxima a cero (Figura 3.4.1).



**Figura 3.4.1.** Análisis de componentes principales (CP) para las leches caprinas de las zonas de Valle de Amblayo y Valle de Lerma durante primavera y otoño, sobre las variables microbiológicas, sanitarias y físico-químicas.

El color gris oscuro representa las muestras tomadas en Valles de Amblayo, el color gris claro las muestra tomadas en Valle de Lerma; los símbolos representan la estación del año, círculos primavera (1º año de muestreo) y rombos otoño (2º año de muestreo). ST: sólidos totales. Rto MSS, M17, MRS: recuento de BAL en diferentes medios de cultivo.

### 3.4.2 Análisis Microbiológicos

#### 3.4.2.1 Aislamiento e identificación de bacterias lácticas

Se aislaron 535 bacterias durante los dos años de muestreo, de las cuales el 49,5% coincidieron con las características primarias de bacterias lácticas: morfología (coco, bacilos), movilidad negativa, coloración Gram positiva, actividad catalasa negativa y actividad nitrato reductasa negativa. De estas, el 26,3% se aislaron durante el primer año y el 23,2% restantes en el segundo año (Tabla 3.4.2). Todos los aislamientos tuvieron una morfología correspondiente con cocos.

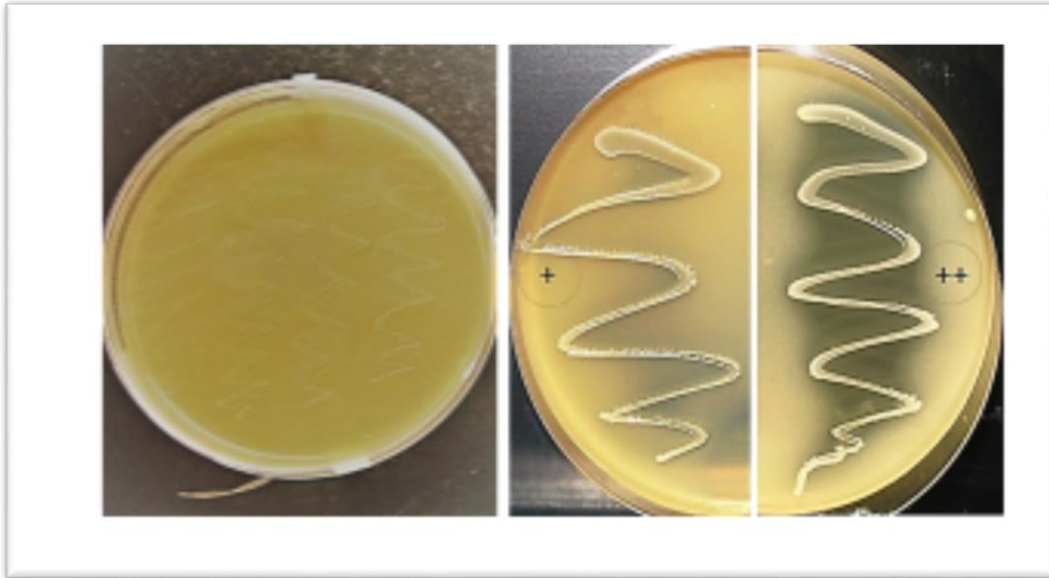
**Tabla 3.4.2.** Número de bacteria aislada y número de bacterias lácticas resultantes del total de los aislamientos.

Zona	Primer año		Segundo año		Total	
	Nº de bacterias aisladas	Nº BAL	Nº de bacterias aisladas	Nº BAL	Nº de bacterias aisladas	Nº BAL
<b>Amb</b>	115	77	151	81	266	158
<b>VL</b>	175	64	94	43	269	107
<b>Total</b>	290	141(26,3%)	245	124(23,2%)	535	265(49,5%)

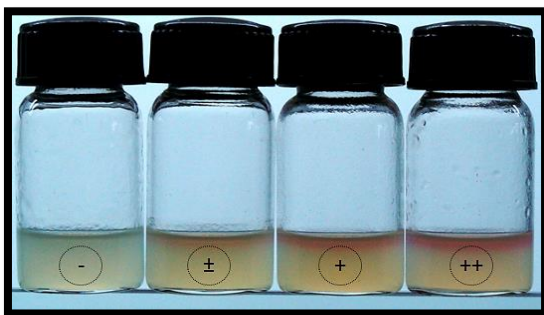
Amb: Valle de Amblayo. VL; Valle de Lerma

#### 3.4.2.2 Pruebas Tecnológicas (Etapa exploratoria)

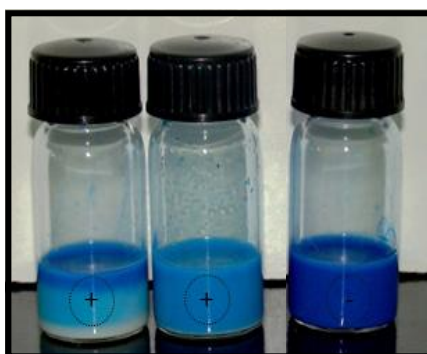
Luego de aplicar las pruebas de identificación primaria de BAL, se seleccionaron al azar 90 BAL, en las cuales se evaluaron diferentes pruebas tecnológicas (utilización de citrato, producción de diacetoil-acetoina, prueba de acidificantes rápidas, formación de coágulo, crecimiento a 45°C, crecimiento con ClNa 6,5%) (Figura 3.4.2).



Placas con medio citrato de calcio agar, las cuales muestran las diferentes intensidades de fermentación de citrato que produjeron las BAL. Fermentación de citrato nula (-), fermentación de citrato media (+), y fermentación de citrato fuerte (++)



Intensidad de la síntesis de diacetilo y acetoina que produjeron las BAL. Síntesis nula de diacetilo-acetoina (-), síntesis media 48h (±), síntesis media 24h (+) y síntesis fuerte (++)

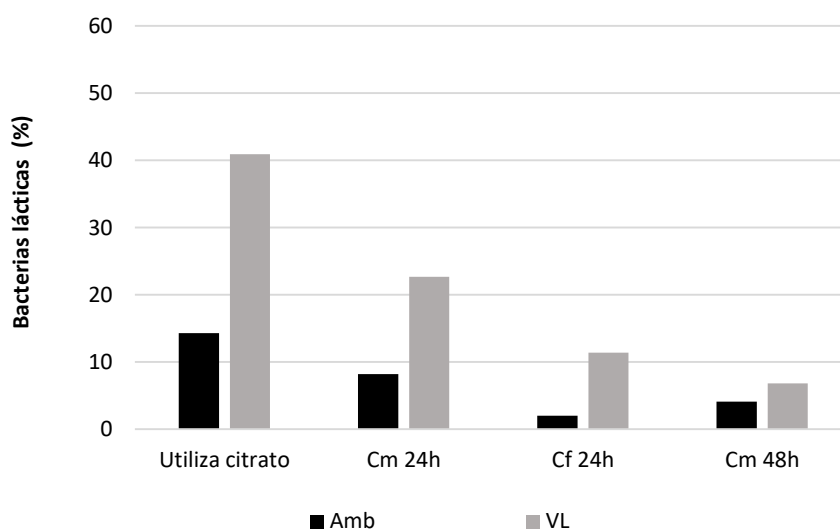


Capacidad acidificante de las BAL en medio leche-azul de metileno: acidificación positiva (+) y acidificación negativa (-)

**Figura 3.4.2.** Pruebas tecnológicas evaluadas en las 90 BAL.

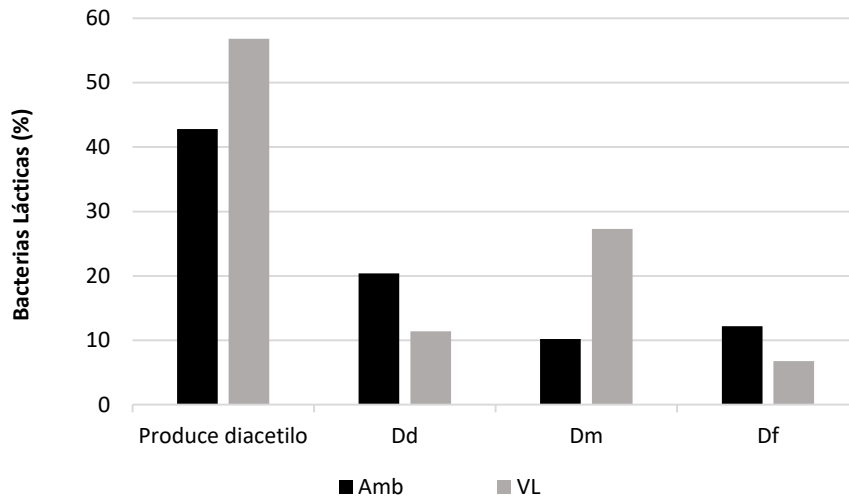
La capacidad de fermentar citrato, se observó en un mayor porcentaje en BAL de VL (40,9%), de las cuales el 11,4% mostró una fermentación fuerte y el 22,7% una fermentación media a las 24 h, mientras que el 6,8% fermentó citrato a las 48 h de incubación. En Amb, el 14,3% de las BAL fueron capaces de fermentar el citrato, de las

cuales, el 2% mostró una fermentación fuerte y el 8,2% una fermentación media a las 24 h, mientras que el 4,1% restante fermentó el citrato a las 48 h (Fig. 3.4.3). El metabolismo del citrato y el piruvato son características tecnológicas buscadas en las BAL. El citrato en la leche es metabolizado por muchas especies de BAL en compuestos de aroma tales como acetato, acetaldehído y diacetilo (Giraffa, 2003, Medina 2011).



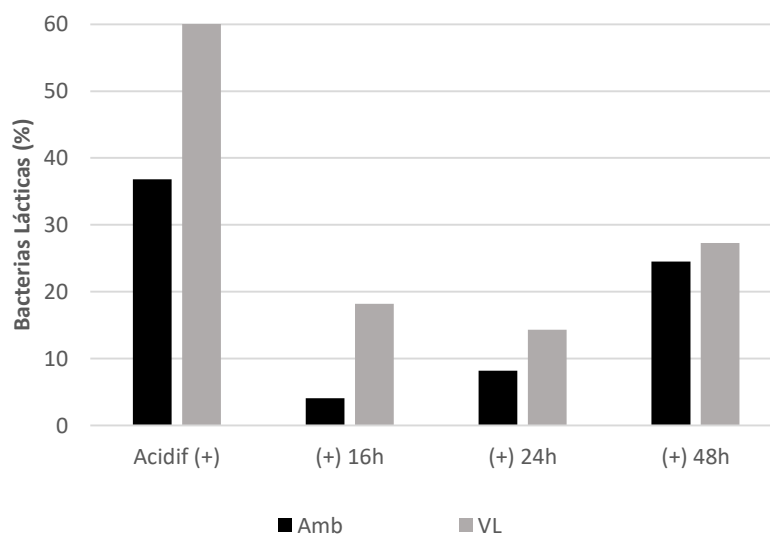
**Figura 3.4.3.** Capacidad de utilizar citrato de BAL aisladas de leche caprina de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.  
Cm: citrato medio. Cf: citrato fuerte.

Al igual que la capacidad de fermentar citrato, la producción de diacetilo se observó en mayor porcentaje en VL (56,8%) de las cuales el 6,8% tuvo una producción fuerte, el 27,3% una producción media y el 11,4% una producción débil. En Amb el 42,8% de las BAL presentaron producción de estos compuestos en diferentes intensidades: 12,2% una producción fuerte, 10,2% producción media y el 20,4% producción débil (Fig. 3.4.4). En estudios similares realizados por Nieto y col. (2011), en 50 BAL aisladas a partir de leche cruda de cabra, la producción de diacetilo para todos los casos fue débil. En el presente estudio la presencia de BAL con capacidad de producir diacetilo fuerte y medio es valioso, puesto que contribuye directamente a la formación de sabor (Rincon-Delgadillo y col., 2012). Asimismo, la producción de este compuesto (2,3-butanediona), es una característica de mucho interés en la industria láctea (Marilley y Casey, 2004).



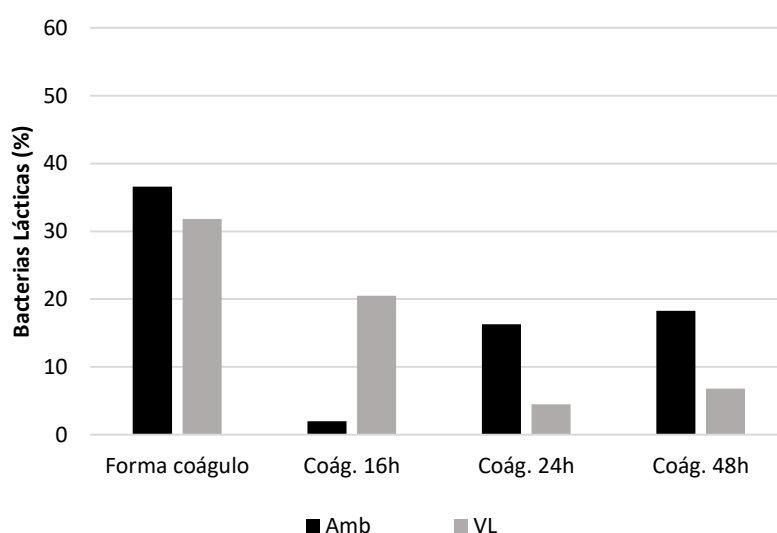
**Figura 3.4.4.** Síntesis de diacetilo y acetoina de BAL aisladas de leche caprina de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.  
Dd: diacetilo débil. Dm: diacetilo medio. Df: diacetilo fuerte.

El 36,8% de las BAL provenientes de Amb y el 61,4% de las BAL provenientes de VL mostraron capacidad acidificante. Ninguna de las cepas analizadas mostró viraje de color a las 8h, entonces se caracterizó como acidificantes rápidas solo aquellas que mostraron acidificación positiva a las 16h. Correspondieron a esta clasificación el 4,1% de las BAL aisladas de Amb y el 18,2% de las de VL, mientras que el 8,2 y 2,5% (Valle de Amblayo) y el 14,3 y 27,3% (Valle de Lerma), resultaron ser acidificantes lentas con resultados positivos a las 24 y 48h respectivamente (Fig.3.4.5).



**Figura. 3.4.5.** Capacidad acidificante de BAL aisladas de leche caprina de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.

La capacidad de coagulación de la leche, se considera un criterio de selección de cultivos lácticos muy importante (Oliszewski y col., 2006), puesto que es un indicador de la capacidad de producir ácido láctico, que contribuye a la coagulación de la caseína láctea (Cosalta y col., 1995). El 37% de las BAL provenientes de Amb y el 32% de las BAL provenientes de VL mostraron capacidad para formar coágulo. En Amb la mayoría de las BAL formaron coágulo entre las 24 y 48 h (16,3 y 18,3% respectivamente), mientras que las cepas de VL el 20,5% de las BAL formaron coágulo a las 16 h (Fig 3.4.6), estos valores son bajos si los comparamos con los obtenidos por Picon y col. (2016), donde el 44% de la población de enterococos aislados a partir de queso de cabra fresco (un día de maduración) coagularon la leche a las 24 h. La capacidad de acidificar la leche no es una característica propia de todas las BAL, ya que se ha reportado que, en general, los enterococos presentan baja capacidad de acidificación en leche (Giraffa, 2003).

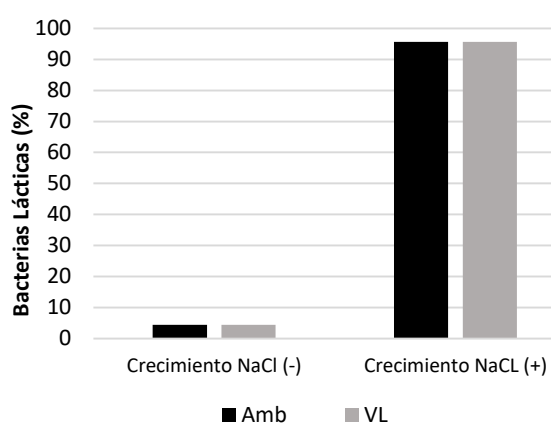


**Fig. 3.4.6** Capacidad de coagulación de BAL aisladas de leche caprina de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.

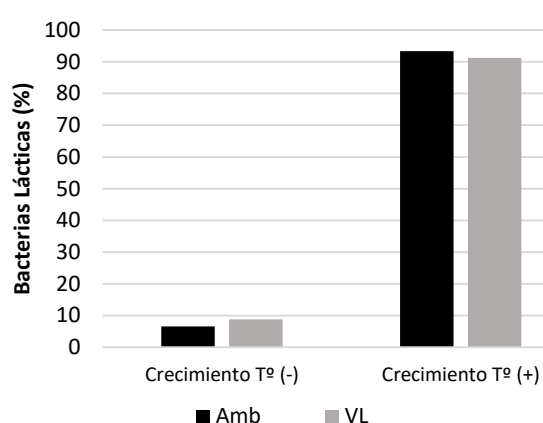
Con respecto a la tolerancia al estrés salino, más del 90% de las BAL aisladas fueron capaces de desarrollar con altas concentraciones de sal (6,5% g/ml ClNa) y a temperatura de 45°C para ambas zonas en estudio (Fig. 3.4.7 y 3.4.8). Estos resultados se consideran de interés desde el punto de vista tecnológico, puesto que para la aplicación industrial de BAL como cultivo iniciador en el queso, estos microorganismos deben ser capaces de tolerar condiciones estresantes como la acidez, la temperatura, la sal y la liofilización (Penna y col., 2014). La característica halotolerante de las BAL varía



según el género y la cepa, en general los enterococos toleran altas concentraciones de sal. Asimismo, se han descrito en la literatura diferentes especies de *Lactobacillus* sp. tolerantes a concentraciones de 4 y 6,5% de NaCl (Ferrari y col., 2016). Silva y col. (2015), obtuvieron BAL aisladas de queso mozzarella que crecieron a 4% de NaCl, mientras que *E. faecalis*, *Lactobacillus garvieae*, *Lactococcus lactis*, y *Streptococcus thermophilus* mostraron ausencia de crecimiento a 6,5 y 10% de NaCl.

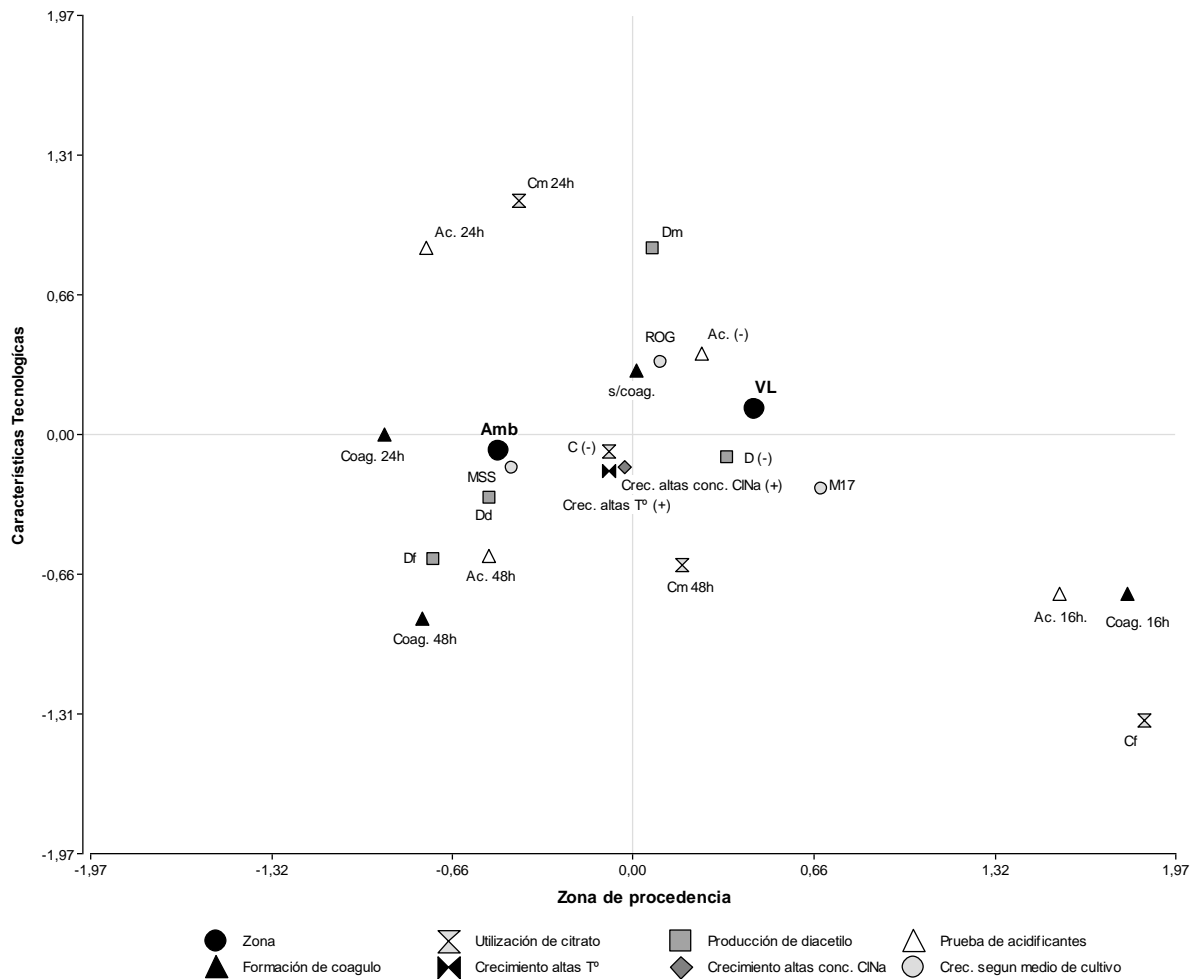


**Fig. 3.4.7.** Crecimiento de BAL a alta concentración de ClNa aisladas de leche caprina de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.



**Fig. 3.4.8.** Crecimiento a alta temperatura (45°C) de BAL aisladas de leche caprina de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.

El análisis de correspondencia múltiple (Fig. 3.4.9), permitió relacionar las características tecnológicas de las BAL aisladas según la zona de procedencia (representando el 24% de la variabilidad total). Las cepas aisladas de Amb, en general de MSS, son productoras fuertes de diacetilo, acidificantes medias, forman coágulo entre las 24 y 48 h y utilizan citrato a las 24 h. Las cepas aisladas de VL principalmente de M17, producen diacetilo a las 24 h, en su mayoría son acidificantes rápidas (16 h), forman coágulo a las 16 h y metabolizan fuertemente citrato a las 24 h.



**Figura 3.4.9.** Análisis de correspondencia múltiple. Características tecnológicas de las BAL relacionadas a la zona de procedencia.

La utilización de citrato, la producción de diacetilo-acetoina, el tiempo de acidificación y la formación de coágulo, fueron propiedades relevantes al momento de seleccionar las bacterias para los siguientes ensayos. Dado que la mayoría de las bacterias analizadas mostraron crecimiento a altas concentraciones de sal, así como a alta temperatura, estas no fueron características decisivas al momento de la selección.

### 3.4.3 Análisis de Inocuidad

Las pruebas de inocuidad se realizaron sobre 60 BAL. El grupo de análisis estuvo conformado por 30 BAL por zona (Valle de Amblayo y Valle Lerma), la selección se hizo según los resultados de las pruebas bioquímicas, optando por aquellas que mostraran algún potencial tecnológico (Tabla 3.4.3).

**Tabla 3.4.3.** Características tecnológicas de las 60 BAL.

BAL	Valle de Amblayo				BAL	Valle de Lerma			
	citrato	coágulo	diacetilo	acidificante		citrato	coágulo	diacetilo	acidificante
F1	0	0	1	3	A42	1	1	0	1
F3	0	2	0	0	B1	0	0	0	1
F5	0	2	1	0	B3	1	1	2	0
F7	2	1	1	3	B24	0	1	2	0
F8	0	1	1	3	B25	0	1	0	0
F11	0	2	3	3	B26	0	1	0	0
F25	0	0	1	0	B27	0	0	1	0
F28	0	0	1	3	B28	1	1	0	1
F29	0	1	1	3	B29	1	1	0	1
F30	0	2	1	3	B35	0	1	2	0
F33	0	1	3	3	B38	0	1	0	0
F46	0	1	1	2	B49	0	1	0	3
F53	0	2	1	3	B63	0	1	0	0
F59	0	0	0	3	B66	0	1	2	3
F66	0	0	0	3	H4	1	0	2	2
G3	0	2	1	2	H47	1	1	2	3
G5	0	2	2	0	H49	2	1	0	2
G10	0	2	3	0	H53	2	2	2	3
G25	0	1	1	3	H54	0	1	2	2
G38	3	0	0	0	H68	2	1	2	3
G46	1	0	2	0	I3	2	2	2	3
G49	0	1	2	3	I7	2	2	2	2
G50	0	1	0	0	I18	0	2	1	3
G52	0	1	0	0	I19	0	2	2	3
G53	0	1	0	0	I29	1	1	2	3
G54	2	1	0	0	I34	1	2	2	2
G56	0	1	0	0	I35	1	2	1	3
G72	1	1	0	2	I41	0	2	0	3
G73	1	1	0	0	I44	0	2	2	3
G113	1	1	2	3	I55	1	1	2	0

Acidificantes y coágulo: 0 (negativo), 1 (+ 16), 2 (+ 24h), 3 (+ 48h).

Citrato y diacetilo: 0 (negativo), 1 (+ fuerte), 2 (+ medio).

En Valle de Amblayo 3,3% de las BAL produjeron  $\beta$ -hemólisis y el 60% fueron resistentes a vancomicina; en Valle de Lerma el 1,6% de las BAL mostraron actividad  $\beta$ -hemolítica y resistencia a vancomicina. Todas las BAL fueron negativas a la prueba de actividad gelatinasa, lo que indica que estas bacterias no produjeron dicha enzima (Tabla 3.4.4).

**Tabla 3.4.4.** Pruebas de inocuidad realizadas en BAL aisladas de leche caprina de Valle de Amblayo y Valle de Lerma.

	Total de bacterias analizadas	Pruebas de Inocuidad			Total bacterias inocuas
		Actividad hemolítica ( $\beta$ -hemólisis)	Actividad Gelatinasa	Resistencia a Vancomicina	
Amb	30(100%)	2(3,3%)	0(0%)	18(60%)	12(40%)
VL	30(100%)	1(1,6%)	0(0%)	1(1,6%)	28 (93,3%)
Total	60(100%)	3 (5%)	0(0%)	19(31,6%)	40 (66,7)

Amb: Valle de Amblayo, VL: Valle de Lerma

De las BAL analizadas, se descartaron aquellas que podían representar algún daño para la salud, clasificándose como BAL inocuas aquellas que no presentaron actividad hemolítica ni gelatinasa y que fueron susceptibles al antibiótico vancomicina. Por lo tanto, correspondieron con esta clasificación: 12 BAL aisladas de Amb y 28 BAL aisladas de VL.

### 3.4.4 Caracterización molecular

#### 3.4.4.1 Identificación molecular de bacterias lácticas

Sobre el grupo de 40 BAL seleccionadas por los criterios antes mencionados, se realizó la identificación por secuenciación del fragmento 16S ARNr.

La amplificación de la región 16S ARNr produjo un único fragmento de ADN de 1500 pb aproximadamente, con un tamaño uniforme entre todos los aislados analizados. Los aislados tuvieron  $\geq 99\%$  de similitud en comparación con las secuencias disponibles en NCBI. Las secuencias de 16S ARNr de las 40 cepas se depositaron en GenBank (Tabla 3.4.5).

El análisis de la secuencia y la comparación de bases de datos permitió clasificar las BAL en dos géneros: *Enterococcus*, con seis especies: *E. faecium*, *E. lactis*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* y *E. hirae*; y *Lactococcus*, con una especie: *L. lactis*.

De las cepas nativas de Valle de Amblayo, *E. durans* fue la especie dominante (83%), también se encontró *E. faecium* (6,5%) y *E. lactis* (6,5%). De las cepas nativas de Valle de Lerma, el 50% fue *E. faecium*, seguido por *E. faecalis* (25%) y *E. durans* (11%), *E. casseliflavus* y *E. hirae* representaron el 3,5% cada uno, en esta zona también se encontró el género *Lactococcus* representando el 7% del total.

**Tabla 3.4.5.** Identidad determinada a través de la secuenciación del fragmento 16S de ARNr de las 40 cepas según zona de procedencia.

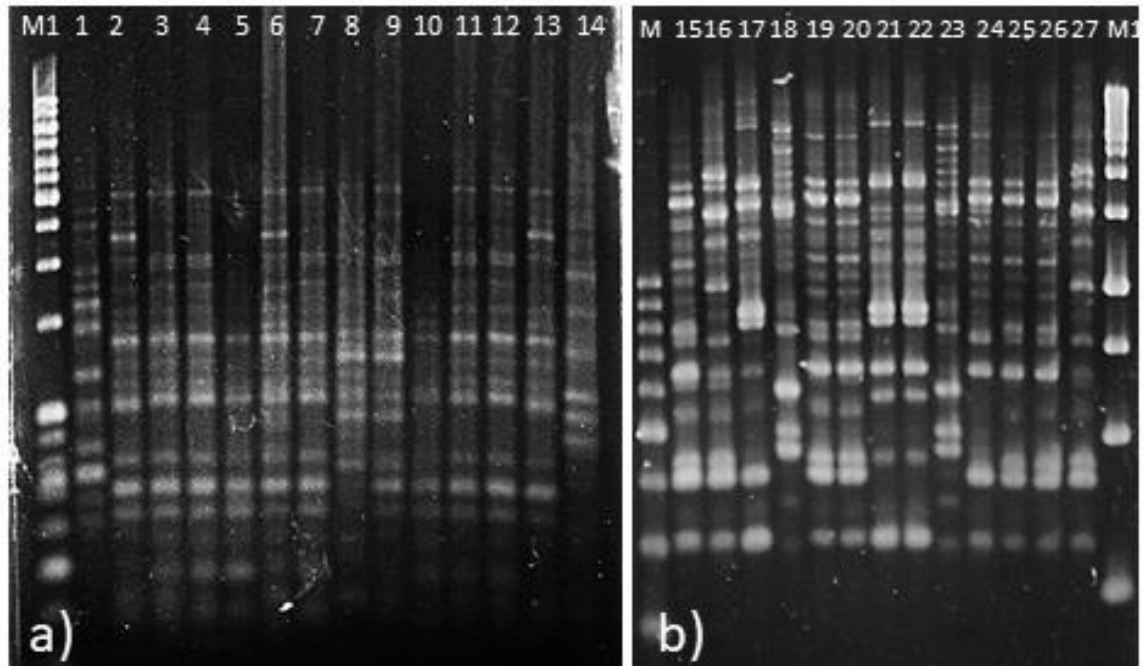
Zona de procedencia	Cepa	Identidad	% Identidad	Número de acceso
AMB	F7	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN563787
	F8	<i>Enterococcus lactis</i>	99	MN563788
	F29	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN563789
	F30	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN563790
	G25	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN563791
	G49	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN566934
	G50	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN566935
	G52	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN566936
	G53	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN566937
	G54	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN566938
	G56	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN566939
	G113	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN564917
VL	A42	<i>Enterococcus faecalis</i>	99	MN565265
	B1	<i>Enterococcus faecalis</i>	99	MN565266
	B3	<i>Enterococcus faecalis</i>	99	MN565267
	B24	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99	MN565268
	B25	<i>Enterococcus faecalis</i>	99	MN566927
	B26	<i>Lactococcus lactis</i>	99	MH745163
	B28	<i>Enterococcus faecalis</i>	99	MN566928
	B29	<i>Enterococcus faecalis</i>	99	MN566929
	B35	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN566930
	B38	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN566931
	B49	<i>Enterococcus hirae</i>	99	MN566932
	B63	<i>Lactococcus lactis</i>	99	MH745164
	B66	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN566933
	H47	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN564918
	H49	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN564919
	H53	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN564920
	H54	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN564921
	H68	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN564961
	I3	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN564962
	I7	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN564963
	I18	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN564964
	I19	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN564965
	I29	<i>Enterococcus durans</i>	99	MN565023
	I30	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN565024
I34	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN565025	
I35	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN565026	
I41	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN565027	
I44	<i>Enterococcus faecium</i>	99	MN565264	

La microbiota de la leche cruda caprina puede variar según la zona o el sistema productivo, y de esta manera incluir diferentes géneros de BAL, entre las que se encuentran cepas de lactococos, lactobacilos y enterococos (Badis y col., 2004; Delavenne y col., 2012; McInnis y col., 2015; Tormo y col., 2015). Las dos especies encontradas en esta tesis, son coincidentes con estudios realizados en Francia en leche caprina, aunque con proporciones diferentes: *Enterococcus* 38% (con especies dominantes *faecalis* y *faecium*) y *L. lactis* 62% (Tormo y col., 2015). Por otro lado, las BAL aisladas de leche y quesos de cabra en diferentes regiones de Argentina fueron: lactobacilos (60%), enterococos (35%) y pediococos (5%) (Medina y col., 2011). Así mismo la microbiota encontrada a partir de 150 aislados realizados en leches cruda de cabra en Argelia, fue diferente, con cinco géneros: *Lactobacillus* (50,63%), *Lactococcus* (25,94%), *Streptococcus* (14,56%), *Leuconostoc* (7,59%) y *Pediococcus* (1,26%) (Badis y col. 2004).

En esta tesis, en ambas zonas de estudio el género predominante fue *Enterococcus*. Este género es frecuentemente aislado de quesos elaborados con leche cruda y su contribución fue reconocida en las características del sabor, por lo que su presencia en las leches caprinas analizadas podía relacionarse con las características típicas de los quesos de la región.

#### **3.4.4.2 Diversidad genética**

En la figura 3.4.10, se observan los perfiles de bandas obtenidos por la técnica de RAPD-PCR y en la figura 3.4.11 el dendograma generado en base a los perfiles de las 40 cepas.



**Figura 3.4.10.** Electroforesis en gel de agarosa (1%) mostrando perfiles de fragmentos amplificados empleando los primers RAPD a) B06 y b) B08. Cepas: 1(B63), 2 (B66), 3 (G50), 4 (G52), 5 (G53), 6 (G54), 7 (G56), 8 (F7), 9 (F8), 10 (F29), 11 (F30), 12 (G25), 13 (G113), 14 (H47), 15 (H49), 16 (H53), 17 (H54), 18 (H68), 19 (I3), 20 (I7), 21 (I18), 22 (I19), 23 (I29), 24 (I30), 25 (I34), 26 (I35), 27 (I41). M: Marcador de peso molecular 100-1000 pb; M1 1Kb DNA ladder (INBIO, Tandil Argentina).

El bajo valor de similitud observado (aprox. 30%) sugiere la existencia de una amplia heterogeneidad en la muestra de las 40 cepas analizadas.

Con un nivel de similitud del 40%, se definieron dos grandes grupos: el grupo A: conformado en su mayoría por cepas de las especies *E. faecalis* y *E. durans* y el grupo B: conformado en su mayoría por *E. faecium*.

Las cepas de *E. durans* se agruparon en un mismo cluster, a excepción de B38 y H47. Dentro del mismo las cepas se agruparon según su origen, se observaron dos subgrupos con una similitud del 67%, uno formado por todas las cepas de *E. durans* de Valle de Amblayo y otro formado por las cepas H68 e I29 de Valle de Lerma.

Todas las cepas de *E. faecalis* fueron de VL y se agruparon en un mismo cluster con una similitud del 80%.

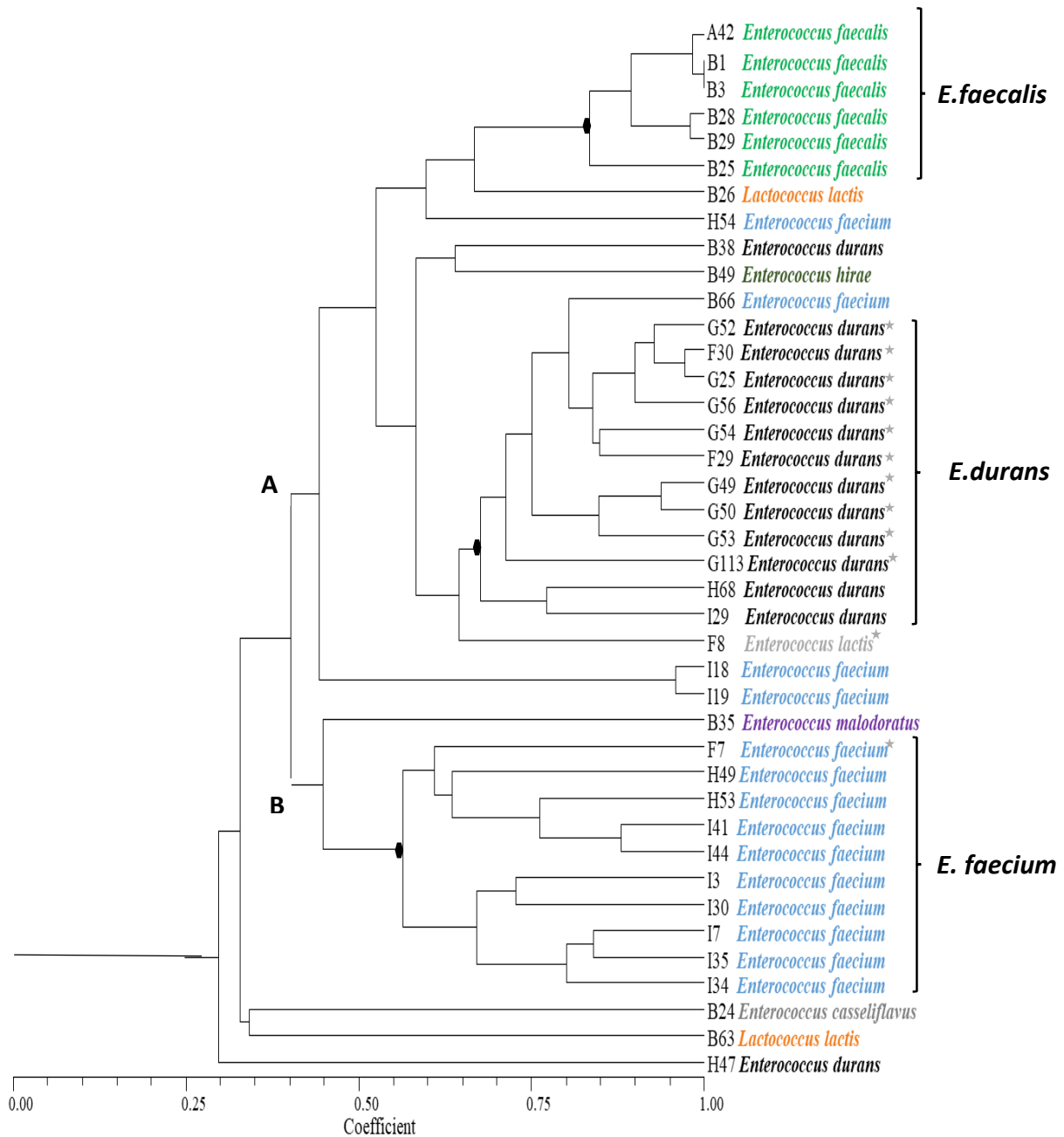
En el grupo B la mayoría de las cepas de *E. faecium* (71%), se agruparon en un cluster con una similitud del 57%. Dentro del mismo se observaron dos subgrupos, mostrando la existencia de variabilidad genética entre las cepas analizadas. La única

cepa de *E. faecium* proveniente de Amb (F7) se incluyó en el primer subgrupo con una similitud genética del 60% con las cepas de VL. Las cepas H54, B66, I18 e I19 mostraron una baja similitud genética con el resto de las cepas de *E. faecium* y se agruparon en el cluster A.

Las dos cepas de *L. lactis*, fueron de VL, y mostraron muy baja similitud genética entre ellas. La cepa B26 se asoció al cluster de *E. faecalis* con un 65% de similitud, mientras que la cepa B63 formó un cluster independiente junto a *E. casseliflavus*, por fuera de los grupos mayores A y B.



★



**Fig. 3.4.11.** Dendrograma basado en los patrones de bandas (fingerprint) RAPD de cepas de *Enterococcus* spp. Y *Lactococcus* sp. Aplicando el coeficiente de correlación de Dice (coeficiente de correlación cofenética: 0,9).

Los nodos marcados (●) señala los cluster que se mencionan en el texto.

Con asterisco se marcan las especies de Valle de Amblayo.

Se analizó la variabilidad genética por zona de las especies predominantes (*E. faecalis*, *E. faecium* y *E. durans*), medida como la relación entre el número de genotipos moleculares definidos en base a un 80% de similitud y el número de cepas (Nieto y col., 2009). En VL la variabilidad genética para las especies *E. durans* y *E. faecium* fue mucho mayor que para *E. faecalis*. El valor de variabilidad genética de *E. durans* fue de 1 (4

genotipos/4 cepas), mientras que *E. faecium* obtuvo un valor de 0,8, con 14 cepas agrupadas en 11 genotipos diferentes. Finalmente, *E. faecalis* con 6 cepas distribuidas en dos genotipos mostró un valor de variabilidad genética igual a 0,3.

*E. durans* de Amb, obtuvo un valor de variabilidad genética de 0,3, con 10 cepas agrupadas en 3 genotipos; lo cual resultó un valor mucho más bajo al observado para esa especie en VL (1).

Según Nieto y col. (2011), la presencia de grupos de microorganismos coincidentes dentro de una zona de producción, permite afirmar que son parte de una microbiota endémica bien adaptada no solo a las condiciones de elaboración utilizadas en las lecherías, sino también a las condiciones ecológicas del área de producción específica. Asimismo, los ecosistemas diferentes pueden influir en la diversidad de especies microbiana. En el presente estudio, la zona de producción del Valle de Amblayo, donde la variabilidad genética fue menor que la de Valle de Lerma, sigue un sistema de producción quesera tradicional transmitido de generación en generación donde la introducción de nuevas tecnologías fue muy reciente (aproximadamente hace 15 años) y de manera lenta, con la introducción de material genético (nuevos biotipos lecheros, implantación de pasturas), control sanitario de animales, introducción del cuajo químico, etc.. Por el contrario, en Valle de Lerma, al estar más cercana a las zonas urbanas, presenta mayor diferencia poblacional y heterogeneidad productiva, lo que trae aparejado la introducción de nuevas tecnologías, que comienza desde la producción primaria. Las características socio-productivas también son diferentes entre ambas zonas. Por último, la temperatura y humedad de cada zona, son factores importantes que intervienen en las características de sus ecosistemas. Todas estas, son razones que podrían explicar la diversidad genética de cada zona.

#### **3.4.5 Susceptibilidad de las Bacterias lácticas frente a diversos antibióticos**

Una de las características más importantes para la evaluación de los enterococos es su susceptibilidad a diferentes antibióticos. En este estudio, se probaron las 40 cepas de BAL con 6 antibióticos diferentes utilizando el método de difusión en disco de acuerdo con los estándares interpretativos del diámetro de la zona de inhibición para

*Enterococcus* spp. (NCCLS, 2002). Mediante un antibiograma se analizó la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos ampicilina, tetraciclina, gentamicina, penicilina, cloranfenicol y vancomicina (Tabla 3.4.6).

Todas las cepas probadas resultaron sensibles a vancomicina y gentamicina, así también mostraron sensibilidad o sensibilidad intermedia a tetraciclina. En cepas provenientes de Amb, se observaron 3 BAL resistentes a ampicilina y 1 BAL resistente a penicilina; en VL, 2 BAL mostraron resistencia: B29 a cloranfenicol y B35 a ampicilina y penicilina. La mayor resistencia a antibióticos observada se dio en la especie *E. durans* (3), mientras que de *E. faecium* y *E. faecalis*, una cepa de cada especie mostro resistencia. Estos resultados estuvieron acordes con estudios realizados en quesos europeos, donde Teuber y col. (1999), determinaron que la incidencia de resistencia a la vancomicina entre los aislamientos de enterococos eran bajas (4%), mientras que la resistencia a otros antibióticos usados varió entre el 7% y el 80%. De acuerdo a Giraffa y col. (2002) y Amaral y col. (2017), los enterococos son susceptibles a diferentes antibióticos y en diferente proporción. Por ejemplo, Franz y col. (2001), al analizar *E. faecalis* aislados principalmente de quesos, encontraron que todas las cepas fueron susceptibles a la vancomicina, pero en su mayoría resistentes a cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina, gentamicina, penicilina y ampicilina. Por el contrario, Canisek y col. (2005), trabajando sobre la misma especie encontraron que los 90 enterococos estudiados eran resistentes únicamente a clindamicina. Asimismo, Giraffa y col. (2002), mencionaron a *E. faecium*, como una especie especialmente resistente a glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina). Por otro lado, Pieniz y col. (2015) y Amaral y col. (2017), en estudios realizados con diferentes cepas de *E. durans*, observaron que todas las cepas analizadas fueron susceptibles a los antibióticos antes mencionados.

**Tabla 3.4.6.** Perfil de antibiograma de las bacterias lácticas estudiadas según zona de procedencia.

Zona	BAL (Identificación)	Antibióticos					
		AMP (10 µg)	TET (30 µg)	GEN (10µg)	PEN (10 U)	CHP (30 µg)	VAN (30 µg)
Amb	<i>Enterococcus faecium</i> F7	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterococcus lactis</i> F8	S	S	S	S	I	S
	<i>Enterococcus durans</i> F29	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterococcus durans</i> F30	S	S	S	S	S	S
	<i>Enterococcus durans</i> G25	S	S	S	R	S	S
	<i>Enterococcus durans</i> G49	S	I	S	S	I	S
	<i>Enterococcus durans</i> G50	S	S	S	S	I	S
	<i>Enterococcus durans</i> G52	S	S	S	S	I	S
	<i>Enterococcus durans</i> G53	R	S	S	S	I	S
	<i>Enterococcus durans</i> G54	R	I	S	R	I	S
	<i>Enterococcus durans</i> G56	R	I	S	S	S	S
	<i>Enterococcus durans</i> G113	S	S	S	S	S	S
	VL	<i>Enterococcus faecalis</i> A42	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i> B1		S	S	S	S	I	S
<i>Enterococcus faecalis</i> B3		S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus</i> B24		S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i> B25		S	S	S	S	I	S
<i>Lactococcus lactis</i> B26		S	I	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i> B28		S	S	S	S	I	S
<i>Enterococcus faecalis</i> B29		S	I	S	S	R	S
<i>Enterococcus faecium</i> B35		R	S	S	R	S	S
<i>Enterococcus durans</i> B38		S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus hirae</i> B49		S	I	S	S	I	S
<i>Lactococcus lactis</i> B63		S	ND	S	S	ND	S
<i>Enterococcus faecium</i> B66		S	I	S	S	I	S
<i>Enterococcus durans</i> H47		S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecium</i> H49		S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecium</i> H53		S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecium</i> H54		S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus durans</i> H68		S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecium</i> I3		S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecium</i> I7		S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecium</i> I18		S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecium</i> I19	S	S	S	S	S	S	
<i>Enterococcus durans</i> I29	S	S	S	S	S	S	
<i>Enterococcus faecium</i> I30	S	S	S	S	S	S	
<i>Enterococcus faecium</i> I34	S	S	S	S	S	S	
<i>Enterococcus faecium</i> I35	S	S	S	S	S	S	
<i>Enterococcus faecium</i> I41	S	S	S	S	S	S	
<i>Enterococcus faecium</i> I44	S	S	S	S	S	S	

AMP: ampicilina TET: tetraciclina GEN: gentamicina PEN: penicilina CHP: cloranfenicol VAN: vancomicina S: sensible, I: intermedio, R: resistente, N/D no determinado

En la Tabla 3.4.7 se observa el número de BAL susceptibles a los antibióticos analizados y número de BAL susceptibles según cantidad de antibióticos analizados. Como susceptibles se clasificó aquellas cepas con sensibilidad o sensibilidad intermedia al antibiótico.

El 85 % de las BAL estudiadas mostraron inhibición a los antibióticos ensayados. El 100% de las BAL fueron susceptibles a por lo menos 4 antibióticos. El patrón de

susceptibilidad a los antibióticos de las BAL fue alto, comparado con los obtenidos por Almeida Junior y col. (2015), quienes mostraron que las BAL aisladas de leche caprina de zonas semiáridas de Brasil obtuvieron un patrón de susceptibilidad del 54%. Todas las BAL analizadas fueron sensibles a gentamicina y vancomicina y 39 lo fueron a tetraciclina y cloranfenicol. El 93% de las BAL de VL mostraron un porcentaje de susceptibilidad más alto a un mayor número de antibióticos, comparadas con las BAL de Amb (67%). Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Nieto y col. (2011), quienes observaron en 140 cepas de *Enterococcus*, que el 100% de los aislamientos fueron susceptibles a los antibióticos clínicamente importantes como la ampicilina, la penicilina y la gentamicina, mientras que entre el 96 y 98% fueron susceptibles a cloranfenicol, levofloxacina, vancomicina, teicoplanina, nitrofurantoína y estreptomina.

**Tabla 3.4.7.** Número de BAL susceptibles a los antibióticos analizados y número de BAL susceptibles según cantidad de antibióticos analizados.

Susceptibilidad a antibióticos		Nº de BAL (Amb n=12, VL n=28)		
Antibióticos	Amb	VL	Total (n=40)	
AMP (10 µg)	9	27	36	
TET (30 µg)	12	27	39	
GEN (10µg)	12	28	40	
PEN (10 U)	10	27	37	
CHP (30 µg)	12	27	39	
VAN (30 µg)	12	28	40	
Susceptibilidad al número de antibióticos				
6	8	26	34	
5	3	1	4	
4	1	1	2	
3	0	0	0	
2	0	0	0	
1	0	0	0	
0	0	0	0	

AMP: ampicilina. TET: tetraciclina. GEN: gentamicina. PEN: penicilina. CHP: cloranfenicol. VAN: vancomicina

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las 40 BAL frente a ampicilina, vancomicina y gentamicina (Tabla 3.4.8). La selección de estos antibióticos se hizo en base a los mecanismos de acción descritos según Yao y Marketing (1999): la ampicilina como representante de los  $\beta$ -lactámicos; la vancomicina, como agente

antimicrobiano que actúan en la síntesis de la pared celular sin  $\beta$ -lactama; y la gentamicina como agente antimicrobiano que inhiben la síntesis de proteínas.

La Tabla 3.4.9, muestra los valores establecidos por la NCCLS (2002) para clasificar cada cepa como sensible o resistente a estos antibióticos según su MIC.

Las MIC frente a ampicilina fueron significativas, con valores en general menores a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . B35 (*E. faecium*) fue la única cepa que mostro resistencia, puesto que no formó halo frente a este antibiótico en ninguna de las concentraciones probadas (resultados que coincide con el antibiograma), asimismo esta cepa mostro sensibilidad moderada frente a vancomicina por ser su MIC mayor a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por esta razón no sería una cepa apta para ser utilizada en un fermento. Según el antibiograma, las cepas G53, G54 y G56 (todas *E. durans*), fueron resistentes a la ampicilina, sin embargo, al analizarlas a través de las diferentes diluciones del antibiótico, mostraron inhibirse a la menor concentración probada. Diez cepas mostraron una sensibilidad moderada frente a vancomicina, 2 correspondientes a Amb y 8 a VL. *E. faecium*, fue la especie con el mayor número de cepas inhibidas a la menor concentración de este antibiótico. Todas las cepas de Amb resultaron sensibles a gentamicina, con una MIC menor a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y en VL con una MIC menor a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; siendo *E. durans* la especie más sensible a este antibiótico por su menor valor de MIC.

**Tabla 3.4.8.** Concentración mínima inhibitoria (MIC) frente a ampicilina, vancomicina y gentamicina.

Zona	Cepa	Ampicilina µg/mL	Vancomicina µg/mL	Gentamicina µg/mL	
Amb	<i>Enterococcus faecium</i>	F7	4	5	50
	<i>Enterococcus lactis</i>	F8	4	1,2	20
	<i>Enterococcus durans</i>	F29	2	1,2	20
	<i>Enterococcus durans</i>	F30	2	2,5	20
	<i>Enterococcus durans</i>	G25	4	2,5	20
	<i>Enterococcus durans</i>	G49	2	2,5	20
	<i>Enterococcus durans</i>	G50	4	1,2	20
	<i>Enterococcus durans</i>	G52	4	2,5	50
	<i>Enterococcus durans</i>	G53	2	2,5	20
	<i>Enterococcus durans</i>	G54	2	5	20
	<i>Enterococcus durans</i>	G56	2	2,5	20
	<i>Enterococcus durans</i>	G113	2	1,2	50
	VL	<i>Enterococcus faecalis</i>	A42	2	2,5
<i>Enterococcus faecalis</i>		B1	2	2,5	100
<i>Enterococcus faecalis</i>		B3	2	5	50
<i>Enterococcus casseliflavus</i>		B24	3	1,2	50
<i>Enterococcus faecalis</i>		B25	4	2,5	50
<i>Lactococcus lactis</i>		B26	2	5	50
<i>Enterococcus faecalis</i>		B28	4	5	50
<i>Enterococcus faecalis</i>		B29	4	5	100
<i>Enterococcus faecium</i>		B35	SN	5	20
<i>Enterococcus durans</i>		B38	2	1,2	20
<i>Enterococcus hirae</i>		B49	2	2,5	50
<i>Lactococcus lactis</i>		B63	2	5	20
<i>Enterococcus faecium</i>		B66	2	1,2	20
<i>Enterococcus durans</i>		H47	2	1,2	20
<i>Enterococcus faecium</i>		H49	6	1,2	20
<i>Enterococcus faecium</i>		H53	2	1,2	100
<i>Enterococcus faecium</i>		H54	2	1,2	50
<i>Enterococcus durans</i>		H68	4	1,2	50
<i>Enterococcus faecium</i>		I3	4	1,2	50
<i>Enterococcus faecium</i>		I7	6	1,2	50
<i>Enterococcus faecium</i>		I18	4	2,5	50
<i>Enterococcus faecium</i>		I19	2	2,5	50
<i>Enterococcus durans</i>		I29	4	1,2	50
<i>Enterococcus faecium</i>		I30	4	1,2	50
<i>Enterococcus faecium</i>		I34	4	10	100
<i>Enterococcus faecium</i>		I35	4	1,2	100
<i>Enterococcus faecium</i>	I41	2	1,2	100	
<i>Enterococcus faecium</i>	I44	4	10	100	

SN: sensibilidad negativa

**Tabla 3.4.9.** Categorías de susceptibilidad a ampicilina, vancomicina y gentamicina para *Enterococcus* spp.

Antibiótico	MIC (µg/mL)	
	R (resistente)	S (sensible)
Ampicilina	> 16	< 8
Vancomicina	> 32	< 4
Gentamicina	>500	<500

NCCLS, 2001.

Según Celso y col. (2006), la sensibilidad de las bacterias lácticas a los antibióticos comúnmente usados en los tratamientos de infecciones en humanos, hace que su presencia sea segura en el ambiente intestinal. Sin embargo, en *Enterococcus* esta situación aún es controvertida, considerando los estudios sobre los determinantes de los factores de virulencia que se han realizado en *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. durans* (aislados de alimentos), los que indicaron que estos podrían estar asociados con infecciones nosocomiales enterocócicas y podrían albergar genes de resistencia a antibióticos (Giraffa 2002; Semedo y col., 2003; Favaro y col., 2014). En la actualidad, es común encontrarse con microorganismos que presentan genes de resistencia a algún antibiótico, un ejemplo es la resistencia presentada por *Enterococcus* spp. A vancomicina con los genes Van que fue reportada por primera vez en *Enterococcus* spp. Y posteriormente en *Staphylococcus aureus* (Zhang y col., 2009). Si bien una resistencia intrínseca es común en todo microorganismo, la resistencia adquirida resulta ser un grave problema para la sociedad en general (Giraffa, 2002). El estudio para establecer los niveles de susceptibilidad de BAL a diversos antibióticos, es un requisito importante dentro de los estudios de factores de virulencia que se realizan con la finalidad de estudiar la seguridad de la bacteria. Si bien una prueba fenotípica no puede garantizar la ausencia de genes de resistencia transferibles, aumentará la probabilidad de su ausencia. Con el uso de métodos genéticos, es posible detectar genes conocidos que confieran resistencia a diferentes antibióticos, y así diferenciar la resistencia transferible putativa de la resistencia natural. Sumar estos estudios a las bacterias analizadas, sería necesario en caso de utilizarlas en la elaboración de alimentos.

Se analizó la resistencia de *E. faecium* y *E. durans* de Amb y VL a diferentes concentraciones de los antibióticos ampicilina, gentamicina y vancomicina.



A altas concentraciones, todos los antibióticos mostraron tener el mismo efecto inhibitorio frente a las cepas *E. faecium* y *E. durans*. A bajas concentraciones se encontraron las diferencias significativas (Tabla 3.4.10.).

Danielsen y Wind (2003), reportaron en estudios de susceptibilidad a antibióticos realizados con diferentes especies de *Lactobacillus*, que el nivel de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos depende de la especie. Según lo observado por otros autores, las propiedades tecnológicas y la resistencia a los antibióticos son características dependientes de la cepa (Ambadoyiannis y col., 2004; Psoni y col., 2006; Franciosi y col., 2009). En el presente estudio, las cepas que mostraron mayor inhibición frente a los tres antibióticos estudiados fueron las nativas de la zona de Valle de Amblayo (mayor valor promedio en el diámetro del halo de inhibición). La ampicilina fue el antibiótico que mayor efecto tuvo a bajas concentraciones. A la mínima concentración probada, vancomicina afectó de manera similar a las cepas de ambas zonas, mostrando halos cuya zona de inhibición en promedio fueron entre 5,4 y 5,8 mm. Los resultados obtenidos se ajustan a lo señalado por Canisek y col. (2005), quienes postulan que no hay un patrón que permita clasificar los enterococos por su susceptibilidad, y sugiere que la resistencia a los mismos está en relación a la cepa, la región o el origen.

**Tabla 3.4.10** Resistencia a las menores concentraciones de antibióticos (ampicilina, gentamicina y vancomicina) de las cepas *E. faecium* y *E. durans*, según zona de procedencia. Valores promedios del diámetro del halo de inhibición (mm).

Antibióticos	Zona	
	Amb	VL
Ampicilina (2 µg g/mL)	8,5 ± 0,2 a	5,74 ± 0,16 c
Gentamicina (20 µg /mL)	7,36 ± 0,2 b	4,14 ± 0,16 d
Vancomicina (2,5ug/mL )	5,82 ± 0,2 c	5,42 ± 0,16 c

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,5$ ) entre columnas y filas.

Los *Enterococcus* spp. Son bacterias lácticas (BAL) cuyo hábitat natural es el tracto gastrointestinal de humanos y animales. También se encuentran naturalmente en los vegetales y en otros alimentos. Tienen características específicas, como la capacidad de sobrevivir en condiciones adversas y de mantener la viabilidad después del calentamiento.

Debido a esta tolerancia, *Enterococcus* spp. Parece tener una aplicación potencial en varios sistemas alimentarios. Algunas evidencias sugieren que los enterococos podrían tener aplicaciones potenciales en el procesamiento de ciertos productos lácteos fermentados (Giraffa, 2003). De hecho, muchos quesos europeos utilizan enterococos como fermento láctico. Asimismo, varios estudios han evaluado la funcionalidad tecnológica de *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. durans* en combinación con especies mesófilas y termófilas (Oumer et al., 2001; Sarantinopoulos et al., 2002). La presencia de microbiota enterocócica agregada durante la maduración afecta positivamente el sabor, el aroma, el color, la estructura y el perfil sensorial general de los diferentes tipos de queso. La influencia positiva de los enterococos en los productos lácteos parece ser debido a su actividad lipolítica, la utilización de citrato y la producción de compuestos aromáticos volátiles. Los enterococos también tienen la capacidad de sobrevivir a condiciones ambientales adversas, como pH extremo, temperaturas y salinidad. En consecuencia, se han utilizado como componentes de los cultivos iniciadores de queso (Giraffa, 2003). Silva y col. (2015), concluyeron que estos microorganismos garantizan la producción de una gran cantidad de ácido láctico (3572 mg/L en un periodo de fermentación de 6h), lo que contribuye a la rápida acidificación de la leche y la producción de varios compuestos de sabor y textura. Además, los enterococos pueden producir péptidos antibacterianos (bacteriocinas), en general llamadas enterocinas, que pueden mejorar la vida útil y la seguridad de los productos (Schirru y col., 2012; Todorov y col., 2014; Favaro y col., 2014).

Por otro lado, la aparición de muchos enterococos resistentes a los glucopéptidos y otros antibióticos y el descubrimiento de los rasgos de virulencia en los aislamientos tanto clínicos como transmitidos por los alimentos plantean la presencia de enterococos en los alimentos como cuestionables. Según Nieto y col. (2011), a pesar de la alta frecuencia de aislamiento de cepas portadoras de genes de virulencia observada en la bibliografía, vale la pena resaltar que son parte del microbiota presente espontáneamente en los quesos que se venden en el mercado, y que se consumen sin ningún riesgo aparente para los consumidores.

Por lo antes dicho, el uso de *Enterococcus* spp como cultivos iniciadores o adjuntos presenta muchas ventajas y algunas desventajas. Para esta tesis en particular, el uso de las cepas de *Enterococcus* en la elaboración de un fermento para producción

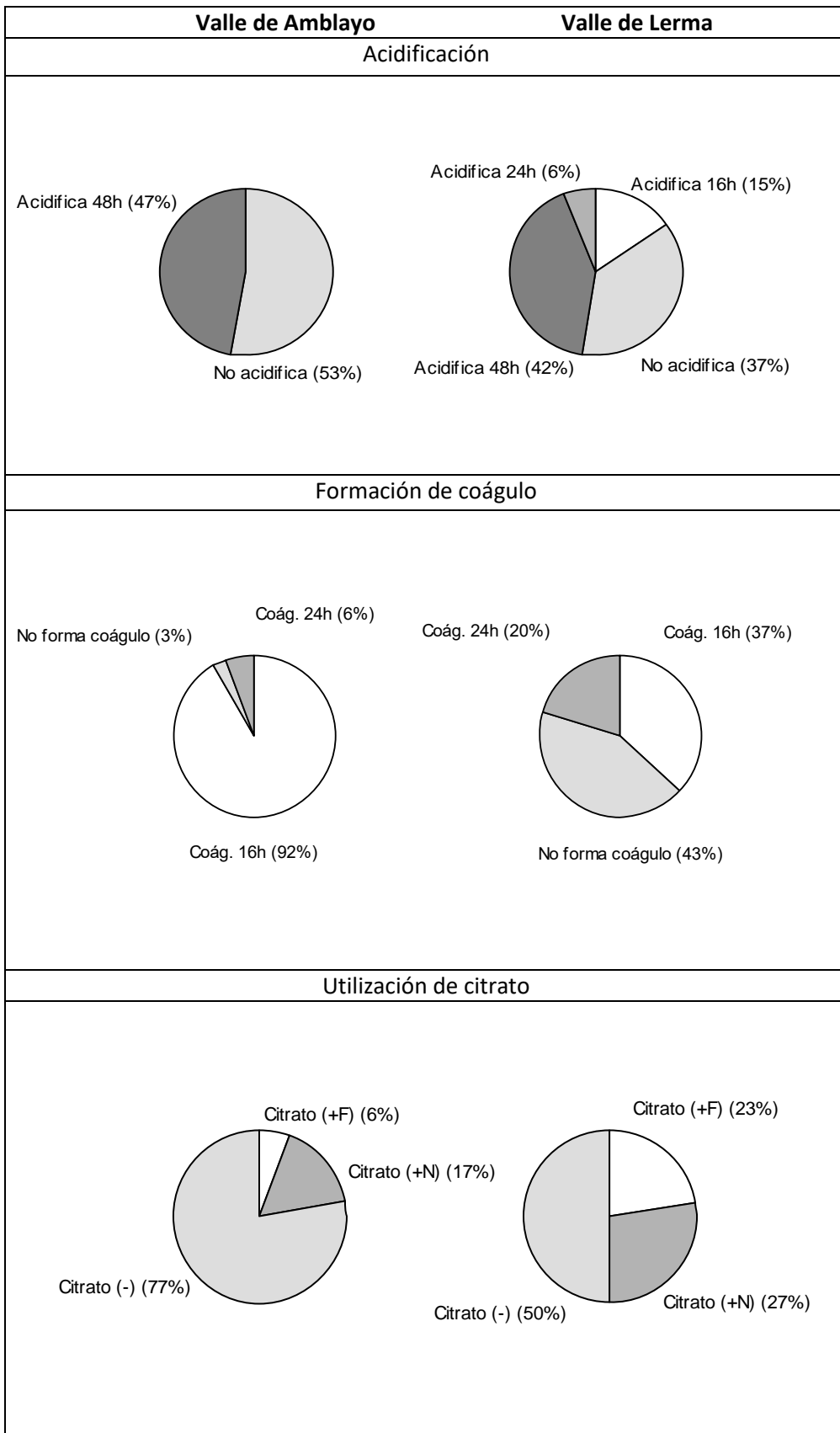
de quesos caprino, tuvo como finalidad estudiar el potencial de la microbiota láctica natural de la leche caprina como indicador de diferenciación territorial, marcada por características particulares en la producción de compuestos que confieran aroma y sabor o en la inhibición de microorganismos patógenos. La utilización de enterococos en fermentos lácticos debe estar precedida de muchos estudios que garanticen la inocuidad de los mismos, por lo que estudios más profundos sobre los factores de virulencia, sobre todo desde el punto de vista genético, serían promisorios para su uso como fermento lácteo.

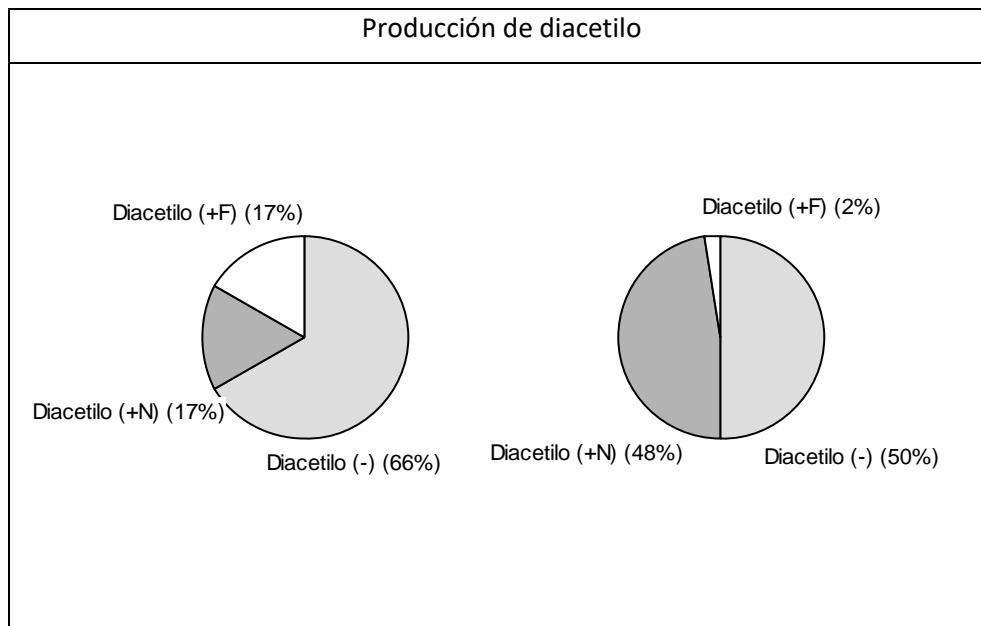
#### **3.4.5.1 Características tecnológicas de las cepas según zona de procedencia**

Se estudió la asociación entre las características tecnológicas (acidificación, formación de coágulo, utilización de citrato y producción de diacetilo) y la zona de procedencia a través de tablas de contingencia a dos vías de clasificación y se determinó la significancia estadística con el estadístico chi cuadrado de Pearson (Figura 3.4.12).

En Amb, el 53% de las cepas no fueron acidificantes y el 47% restante fueron acidificantes lentas. No obstante, el 91% coaguló la leche a las 16 h y el 8% a las 24 h. El 23% de las cepas utilizaron citrato, de las cuales el 6% formaron un halo muy importante. El 34% de las cepas produjo diacetilo, en diferente intensidad. En VL, el 37% de las cepas no fueron acidificantes, el 42% tuvo una acidificación lenta, a diferencia de Amb, el 15% mostró una acidificación rápida. El 43% de las cepas no coaguló la leche, el 37% coaguló la leche a las 16 h y el 20% a las 24h. Un 50% de las cepas utilizó citrato, de las cuales el 23% formaron un halo muy importante. El 50% de las cepas produjeron diacetilo de las cuales el 23% lo hizo con mayor intensidad.

Para los cuatro parámetros en estudio se comprobó una asociación estadísticamente significativa (valor  $p < 0,05$ ), con la zona de procedencia, siendo las cepas de Valle de Lerma más acidificantes, aunque con menos posibilidad de formar coágulo, y con mayor probabilidad de producir compuestos de flavor mediante su capacidad para utilizar citrato y producir diacetilo.





**Figura 3.4.12.** Características tecnológicas de las cepas según zona de procedencia. Positivo normal (+N), positivo fuerte (+F), no produce diacetilo o no fermenta citrato (-).

### 3.4.5.2 Análisis del espectro antimicrobiano

Se analizó el potencial antimicrobiano de las 40 cepas en estudio frente a 4 patógenos: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* sp. (Tabla 3.4.11).

El estudio reveló que seis cepas: dos de Amb (G113 y F29 ambas *E. durans*) y cuatro de VL (H49, H53, H54 e I19, todas *E. faecium*) mostraron tener efecto inhibitor frente a diferentes patógenos evaluados, siendo *L. monocytogenes* el patógeno más sensible. En Amb, la cepa G113 mostro inhibir dos patógenos: *Bacillus cereus* y *L. monocytogenes*, mientras que F29 inhibió solamente a *Salmonella* sp. En VL las 4 cepas inhibieron *L. monocytogenes*.

Las bacterias Gram positivas a la cual pertenecen 3 de los patógenos estudiados, son más sensibles al espectro de acción de las bacterias lácticas. No obstante, se encontró que las BAL también mostraron capacidad para inhibir bacterias Gram negativas (Almeida, 2015). Similar situación se observó en esta tesis donde F29 inhibió a una Gram negativa como lo es *Salmonella* sp.

**Tabla 3.4.11** Cepas con propiedades antimicrobianas según patógeno seleccionado

Patógenos	Bacteria Lácticas					
	Valle de Amblayo		Valle de Lerma			
	F29	G113	H49	H53	H54	I19
	<i>E. durans</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> sp	+	-	-	-	-	-

La presencia de cepas con propiedades antimicrobianas es de gran interés, sobre todo en la región de Valle de Amblayo, donde los quesos de cabra son elaborados a partir de leche cruda, por lo que la presencia de esta microbiota podría estar ejerciendo un rol importante en el control de la calidad microbiológica. El potencial antimicrobiano observado en las cepas, amerita estudios mas detallados de las sustancias antimicrobianas

### 3.4.6 Diseño del Fermento Láctico

Para esta tesis, la selección de las cepas destinadas a formular el fermento para la elaboración de un queso caprino semiduro, se realizó en base a los resultados obtenidos a partir de la caracterización tecnológica (bioquímicas y de inocuidad) y molecular realizada a las 40 cepas.

Se seleccionaron seis cepas (tres por zona de estudio), que utilizan citrato y/o producen diacetilo, que coagulan la leche entre 16 y 24 h, y en algunos casos productoras de sustancias de inhibición frente a patógenos, asimismo se tuvo en cuenta que las especies pertenecieran a genotipos diferentes, puesto que con un perfil de similitud mayor al 91% se pueden considerar genotípicamente cercanas y posiblemente idénticas (Psoni y col., 2006). Se seleccionaron cepas con potencial metabólico para formular un fermento, con el cual se pudiera elaborar un queso caprino semiduro, con

caracteres sensoriales típicos de la zona y propiedades funcionales deseables. La caracterización de las cepas se muestra en la Tabla 3.4.12.

**Tabla 3.4.12.** Cepas seleccionadas de las zonas de Valle de Amblayo y Valle de Lerma para la formulación del fermento láctico.

Zona	Cepas	Citrato	Diacetilo	Tiempo de coagulación	Acidificación	Propiedades antimicrobianas
Amb	<i>Enterococcus faecium</i> (F7)	Positivo (+)	Positivo (+)	17h	48h	No revelada
	<i>Enterococcus durans</i> (F29)	Negativo	Positivo (+)	24h	48h	Inhibición a <i>Salmonella</i> sp.
	<i>Enterococcus durans</i> (G113)	Positivo (++)	Positivo (+)	24h	48h	Inhibición a <i>B. cereus</i>
VL	<i>Enterococcus durans</i> (H68)	Positivo (+)	Positivo (+)	17h	16h	No revelada
	<i>Enterococcus faecium</i> (I19)	Negativo	Positivo (+)	24h	24h	Inhibición a <i>L. monocytogenes</i>
	<i>Enterococcus faecium</i> (I35)	Positivo (++)	Positivo (++)	No coaguló a las 24h.	48h	No revelada

Los signos positivos indican si la utilización del citrato y producción de diacetilo fue fuerte (++) o normal (+).

Antes de la formulación de los fermentos, se comprobó la compatibilidad de las cepas seleccionadas mediante la ausencia de halo de inhibición entre las cepas ensayadas según zona de procedencia.

Los fermentos formulados utilizando todas las combinaciones posibles entre cepas de la misma zona se describen en la Tabla 3.4.13.

**Tabla 3.4.13.** Fermentos formulados según zona de procedencia

Fermentos	
Zona	Cepas
Valle de Amblayo	F7-F29
	F7-G113
	F29-G113
	F7-F29-G113
Valle de Lerma	H68-I35
	H68-I19
	I19-I35
	H68-I19-I35

#### 3.4.6.1 Análisis de los fermentos

Se analizaron las curvas correspondientes al crecimiento microbiano, la actividad acidificante y la actividad lipolítica (Figuras 3.4.13 a 3.4.20), así también el avance de la actividad proteolítica (Tabla 3.4.18) de cada uno de los fermentos formulados.

##### Crecimiento microbiano

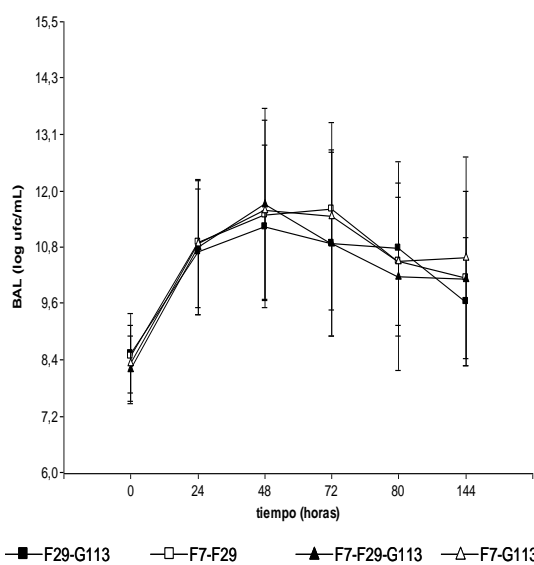
A las 24h de incubación se observó un crecimiento de microorganismos de aproximadamente dos órdenes (promedio de 7,7 a 10,1 unidades logarítmicas) en los cuatro fermentos Amb, este comportamiento continuó hasta las 48h, momento a partir del cual las poblaciones comenzaron a disminuir. A las 24h, los fermentos VL mostraron algunas diferencias. H68-I35 fue el fermento que mostró mayor crecimiento microbiano, comportamiento que se mantuvo hasta las 48h, posteriormente la población de microorganismos disminuyó en 1,5 órdenes hacia las 144h. A las 48h, H68-I19 alcanzó al fermento H68-I35, continuando su aumento hasta las 72h con valores cercanos a los 13 log ufc/mL. En general, las combinaciones de Amb alcanzaron valores promedios más altos que las de VL a las 24h, no obstante, a las 48h los valores más altos fueron alcanzados por las combinaciones de VL (Figura 3.4.13 y 3.4.14).



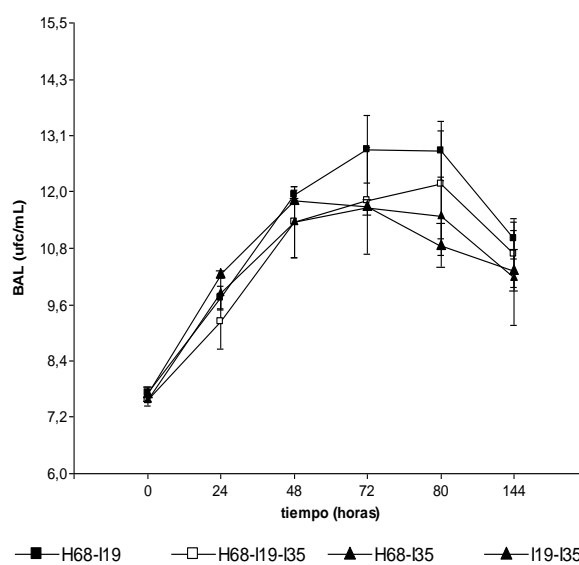
### Actividad acidificante

Los fermentos de ambas zonas mostraron un notable descenso de pH hasta las 24h. A las 48 y 72h el descenso continuó, pero de manera más lenta, posteriormente tendió a mantenerse constante.

A las 24h de incubación, el descenso de pH alcanzado por todos los fermentos, en Amb no superó los 5 órdenes, a las 48h se observó un pH entre 4,9 y 4,7. Entre las combinaciones de VL, H68-I19 y H68-I35 fueron las que mayor descenso de pH mostraron a las 24h de incubación, comportamiento que se siguió hacia las 48h. En todas las combinaciones, se observaron pH entre 4,9 y 4,6 siendo el más bajo alcanzado por las combinaciones H68-I35 y H68-I19. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las zonas ni entre las combinaciones por zona en ninguno de los tiempos probados (Figura 3.4.15 y 3.4.16).



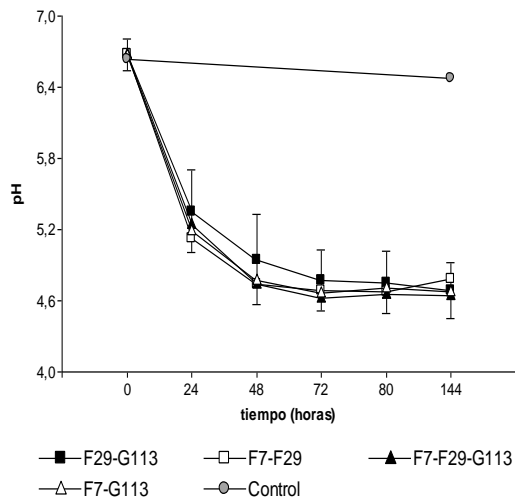
■ F29-G113    □ F7-F29    ▲ F7-F29-G113    △ F7-G113



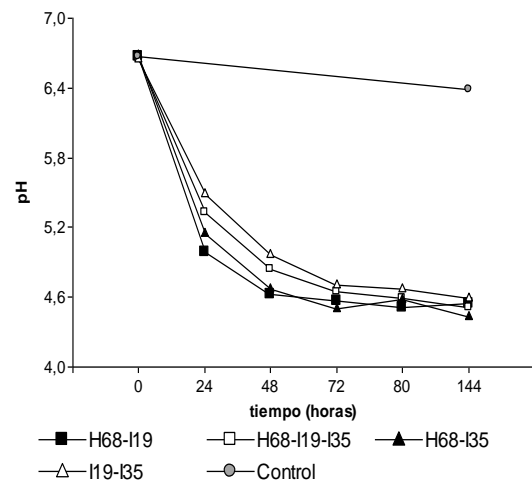
■ H68-I19    □ H68-I19-I35    ▲ H68-I35    △ I19-I35

**Figura 3.4.13** Curvas del crecimiento microbiano de los fermentos de Valle de Amblayo incubados durante 144h.

**Figura 3.4.14** Curvas del crecimiento microbiano de los fermentos de Valle de Lerma incubados durante 144 h.



**Figura 3.4.15.** Cambios de pH de los fermentos de Valle de Amblayo durante 144h de incubación. Control: leche sin inocular

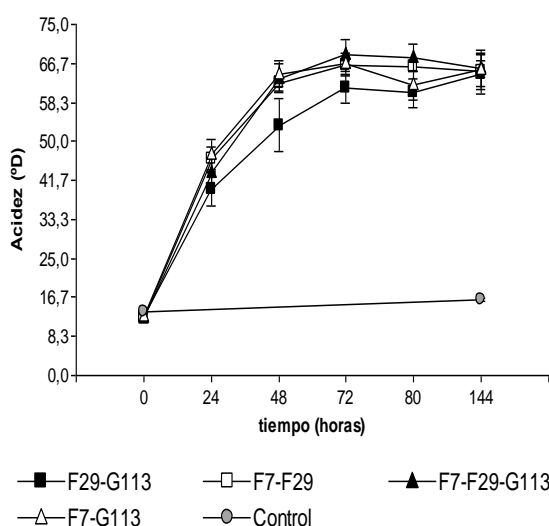


**Figura 3.4.16.** Cambios de pH de los fermentos de Valle de Lerma durante 144h de incubación. Control: leche sin inocular

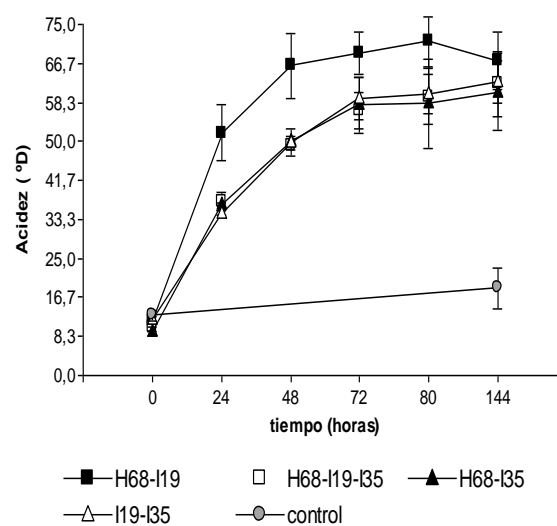
Los enterococos, en general, exhibieron baja capacidad de acidificar la leche. En estudios realizados con cepas de enterococos aisladas de queso muzzarella, se demostró que el pH de la leche después de las 24 h de inoculación, no bajó más de 5,5 (Giraffa, 2003). Investigaciones en enterococos de origen lácteo confirmaron la pobre capacidad acidificante de estos microorganismos en la leche, mostrando un pH por debajo de 5,0–5,2 después de 16–24 h de incubación a 37 °C (Andrighetto y col., 2001; Durlu-Ozkaya y col., 2001; Sarantinopoulos y col., 2001). Asimismo, Psoni y col. (2006), con cepas de enterococos aisladas de quesos elaborados con leche cruda de cabra, obtuvieron valores de pH entre 5,40 y 5,03 luego de 24 h de incubación. Los  $\Delta$ pH a las 24 h de incubación, entre los fermentos de Amb oscilaron entre 1,3 y 1,6; y en los de VL, entre 1,1 y 1,7. Según la clasificación de Nieto y col. (2009), sobre la capacidad de reducir el pH de la leche después de 24 h, estas combinaciones de cepas se podrían clasificar en dos grupos: con una capacidad de *acidificación intermedia* (delta de pH que oscila entre 1,5 y 2 y una *baja capacidad acidificantes* (delta de pH menor a 1,5). En el primer caso, corresponderían de Valle de Amblayo las combinaciones F7-F29 y F7-G113, y de Valle de Lerma las combinaciones H68-I35 y H68-I19; en el segundo caso todas las combinaciones restantes. Cabe aclarar que en ninguno de los casos la capacidad acidificante fue menor a 1,1. Estos resultados son alentadores considerando los obtenidos por Psoni y col.

(2006), donde la totalidad de cepas de enterococos aislados de quesos de cabra obtuvieron  $\Delta$ pH entre 0,4 y 0,8.

A las 24 h, la acidez titulable ( $^{\circ}$ D), fue baja para todas las combinaciones ( $<55^{\circ}$ D). Olszewski y col. (2006), obtuvieron valores similares en 37 cepas de *E. faecium* aisladas de leche y queso de cabra del noroeste argentino. Considerando los bajos valores de acidez alcanzado a las 24 h, las cepas tuvieron la particularidad de coagular la leche en este período. Los fermentos que acidificaron con mayor rapidez a las 24 h fueron: F7-F29 y F7-G113 de Amb y H68-I19 de VL. La actividad acidificante se observó aproximadamente hasta las 72h, posteriormente hacia las 144h los cambios en la acidez de la leche fueron menores. En general las combinaciones de Amb fueron más acidificantes que las de VL (Figura 3.4.17 y 3.4.18).



**Figura 3.4.17.** Cambios de acidez de los fermentos de Valle de Amblayo durante 144h de incubación.



**Figura 3.4.18.** Cambios de acidez de los fermentos de Valle de Lerma durante 144h de incubación.

### Lipólisis

La lipólisis es un proceso importante principalmente en la maduración del queso debido a su papel en el desarrollo del sabor y la textura final del producto (Morandi y col., 2006). Esto se logra mediante la hidrólisis enzimática de triglicéridos a ácidos grasos que pueden ser precursores de compuestos de sabor tales como metilcetonas, alcoholes secundarios, ésteres y lactonas. La lipólisis no está directamente involucrada en la

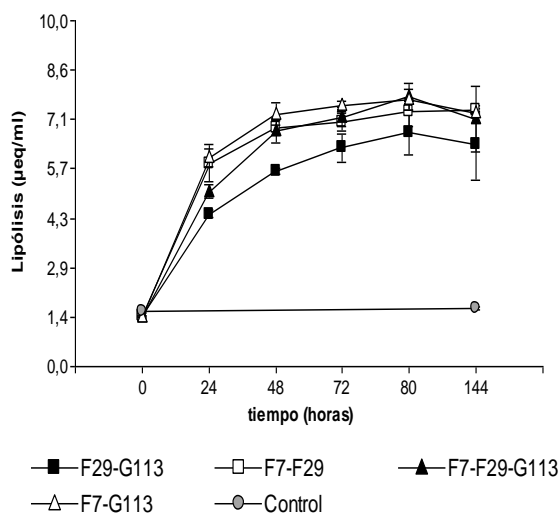
reología del queso, sin embargo, los glicéridos parciales son compuestos activos que influyen en la organización molecular, de ahí que tenga efecto sobre la textura del queso (Giraffa y col., 2003).

Todos los fermentos mostraron actividad lipolítica. Esta actividad se mantuvo en aumento hasta las 144h en el fermento F7-F29 de Valle de Amblayo, y en los fermentos I19-I35, H68-I35 y H68-I35-I19 de Valle de Lerma. En las restantes combinaciones, este comportamiento se observó hasta las 80h.

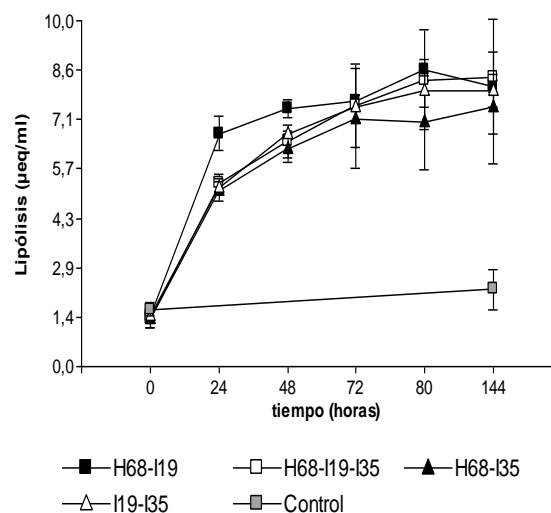
Entre los fermentos de Valle de Amblayo, F7-G113 y F7-F29, fueron los que mayor actividad lipolítica tuvieron a las 24h diferenciándose estadísticamente de los fermentos F7-F29-G113 y de F29-G113. El fermento F29-G113 fue el que menor actividad mostró durante las 144h, mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto a las demás combinaciones (Fig. 3.4.19).

En Valle de Lerma, el fermento H68-I19, mostró mayor actividad lipolítica durante las primeras 24h, siendo las diferencias estadísticamente significativas con respecto a los demás fermentos. En general los fermentos de esta zona tuvieron un comportamiento similar (Fig. 3.4.20).

Los enterococos tienen en general una actividad lipolítica baja (Suzzi y col., 2000; Aspri, 2017), aunque entre las bacterias lácticas, son los que usualmente mayor actividad lipolítica presentan. Algunos estudios que analizaron la hidrólisis de triglicéridos de lácteos por enterococos, señalaron a *E. faecalis* como la especie más lipolítica, seguida por *E. faecium* y *E. durans* en menor medida (Sarantinopoulos y col., 2001; Durlu-Ozkaya y col., 2001). Como se puede observar los fermentos que contenían las cepas F7 e I19 ambas *E. faecium*, son los que mayor actividad lipolítica mostraron (Fig. 3.4.19).



**Figura 3.4.19.** Actividad lipolítica de los fermentos de Valle de Amblayo durante 144h de incubación.



**Figura 3.4.20.** Actividad lipolítica de los fermentos de Valle de Lerma durante 144h de incubación.

### Actividad proteolítica

Aunque las BAL no se consideran bacterias fuertemente proteolíticas, su sistema proteolítico es esencial para el crecimiento óptimo en la leche y contribuye significativamente al desarrollo del sabor en los productos lácteos fermentados (López-Kleine y Monnet, 2011).

Se analizó la actividad proteolítica de los fermentos de Valle de Amblayo y Valle de Lerma durante 144 h. La misma se midió en GA (grado de avance) =  $(CF-CI) / CI * 100$  (Tabla 3.4.14).

Todas las combinaciones de cepas fueron capaces de hidrolizar la leche descremada en por lo menos 5 grados. Se observó mayor actividad proteolítica en las cepas de Valle de Amblayo que en las de Valle de Lerma. Para ambos casos las combinaciones de las tres cepas obtuvieron los valores más bajos en proteólisis. Suzzi y col. (2017), en estudios realizados con enterococos aislados de quesos caprinos italianos, obtuvieron una alta variabilidad en la actividad proteolítica entre cepas de *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* y *Enterococcus gallinarum*, siendo más relevante en *E. faecium*, resultados similares se obtuvieron con las cepas de Valle de Amblayo, donde las combinaciones con *E. faecium* mostraron mayor actividad proteolítica que con *E. durans*. Las cepas de Valle de Lerma revelaron una actividad proteolítica baja. Al respecto, los

datos contradictorios de la literatura sobre la proteólisis de la caseína en enterococos, indican una marcada variación de este rasgo fenotípico (Durlu-Ozkaya y col., 2001).

**Tabla 3.4.14.** Actividad proteolítica de las cepas combinadas por zona.

Fermento	Cepas	n	T=0	T=144	Grado de Avance (GA)
			NS pH 4,6	NS pH 4,6	
			VP±DE	VP±DE	
Valle de Amblayo	F29-G113	2	0,7±0,01	1,05±0,35	50
	F7-F29	2	0,7±0,01	1,1±0,16	57
	F7-G113	2	0,7±0,01	1,15±0,00	64
	F7-F29-G113	2	0,67±0,01	0,78±0,00	16
Valle de Lerma	H68-I19	3	0,58±0,00	0,62±0,05	7
	H68-I19-I35	3	0,58±0,00	0,61±0,12	5
	H68-I35	3	0,58±0,00	0,65±0,03	12
	I19-I35	3	0,58±0,00	0,63±0,03	9

NS: Nitrógeno soluble. VP: valor promedio. DE: desvío estándar.

### 3.4.7 Selección del fermento

Los iniciadores primarios están involucrados principalmente en la producción de ácido láctico a partir de la lactosa al comienzo de la producción de queso. Sin embargo, muchos de ellos también producen compuestos volátiles, por ejemplo, diacetilo a partir de citrato, que es un componente importante del sabor del queso fresco, CO<sub>2</sub> de la lactosa (especies heterofermentativas) y citrato (especies homofermentativas y heterofermentativas) que contribuyen a la textura de algunos quesos. Sus sistemas proteolíticos también están involucrados en el desarrollo del sabor y el aroma en quesos madurados, por estas razones algunos autores afirman que los enterococos se utilizan como *iniciadores adjuntos* en la fabricación de quesos (Centeno y col., 1999).

La propiedad más importante de los cultivos iniciadores es la producción de ácido durante la primera etapa de la elaboración de los quesos. Para esta función se consideran adecuadas aquellas bacterias que producen una cantidad suficiente de ácido como para reducir el pH de la leche a un valor inferior a 5,3 en un tiempo aproximado de 6 h de incubación a 30 - 37°C (Cogan y col., 1997). El descenso de pH contribuye a la expulsión del suero y reduce el contenido de humedad, factores que contribuyen a la formación de la cuajada y previenen además el desarrollo de la microbiota alterante (Cogan y col., 1997). Por lo tanto, el principal criterio para seleccionar las BAL de un cultivo iniciador es su capacidad de acidificación.

En base a los resultados obtenidos la capacidad de crecimiento para todas las combinaciones supera los 2 órdenes a las 24 h. Con respecto a la capacidad de acidificar la leche y de acuerdo al delta de pH obtenido, la primera selección de los fermentos fue: Valle de Amblayo F7-F29 y F7-G113 y Valle de Lerma: H68-I35 y H68-I19 cuyas capacidades de acidificación fueron intermedias.

Estos cultivos tienen como finalidad, impartir al queso características especiales de aroma, sabor y textura mediante la formación de compuestos que son típicos de cada variedad (Zalazar y col., 2006).

Muchos autores sugirieron que los enterococos juegan un papel importante en el desarrollo del sabor típico del queso, como resultado del metabolismo del citrato, la producción de diacetilo y en relación a sus actividades lipolíticas y proteolíticas (Cogan y col., 1997; Suzzi y col., 2000; Giraffa, 2003; Psoni y col., 2006; Martín-Platero y col., 2009). Por ejemplo, estudios realizados por Sarantinopoulos y col. (2002), hacen hincapié en la importancia tecnológica de cepas de *E. faecium* como cultivos adjuntos en la fabricación de queso Feta, por afectar positivamente el sabor, aroma, color y estructura de los quesos madurados. De la misma forma, en los estudios de Medina y col. (2012) y Oliszewski y col. (2013), donde se utilizó una cepa de *E. faecium* como cultivo adjunto autóctono, se observó un efecto significativo en los perfiles de lipólisis, proteólisis y compuestos volátiles durante la maduración de quesos de cabra semiduros. Asimismo, los resultados obtenidos por Mauro y col. (2001), del análisis sensorial de quesos de cabra elaborados con cepas de *E. durans* y *E. faecium* como cultivos adjuntos, mostraron cambios favorables en los perfiles microbiológicos y sensoriales, y además

obtuvieron las puntuaciones más altas en las pruebas de aceptabilidad (Medina y col., 2011).

La lipólisis resulta en la formación de ácidos grasos que ejercen un impacto directo en el flavor del queso, pero que además actúan como precursores de compuestos de aroma y sabor, tales como metilcetonas, alcoholes, y lactonas (McSweeney y Sousa, 2000; Smit y col., 2002). A partir de los resultados obtenidos, comparando cada una de las combinaciones con el control, se confirmó la actividad lipasa en las cepas combinadas de ambas zonas de estudio. Entre las combinaciones de Valle de Amblayo, F7-G113, fue la que mayor actividad lipolítica tuvo, mientras que entre las combinaciones de Valle de Lerma H68-I19 mostró su mayor actividad lipolítica a las 24h.

De acuerdo a la actividad proteolítica de las cepas combinadas de Valle de Amblayo se seleccionaron F7-F29 y F7-G113 por ser las que mayor grado de avance mostraron (GA). Todas las combinaciones de cepas de Valle de Lerma mostraron baja actividad proteolítica, por lo que este no sería un criterio que influya en la selección final del fermento, no obstante se seleccionaron H68-I35 y I19-I35 por ser los que mayor GA mostraron.

De acuerdo a las características antes mencionadas, se seleccionó por Valle de Amblayo la formulación: F7-G113. En Valle de Lerma fueron seleccionados los fermentos que mostraron potencial: H68-I35 y H68-I19. Para sumar a los criterios tecnológicos, del análisis de las características bioquímicas de cada cepa, la cepa I35 fue la que mayor fermentación de citrato y producción de diacetilo mostró, por lo que se optó por el fermento H68-I35 para la elaboración de queso (Figura 3.4.21).



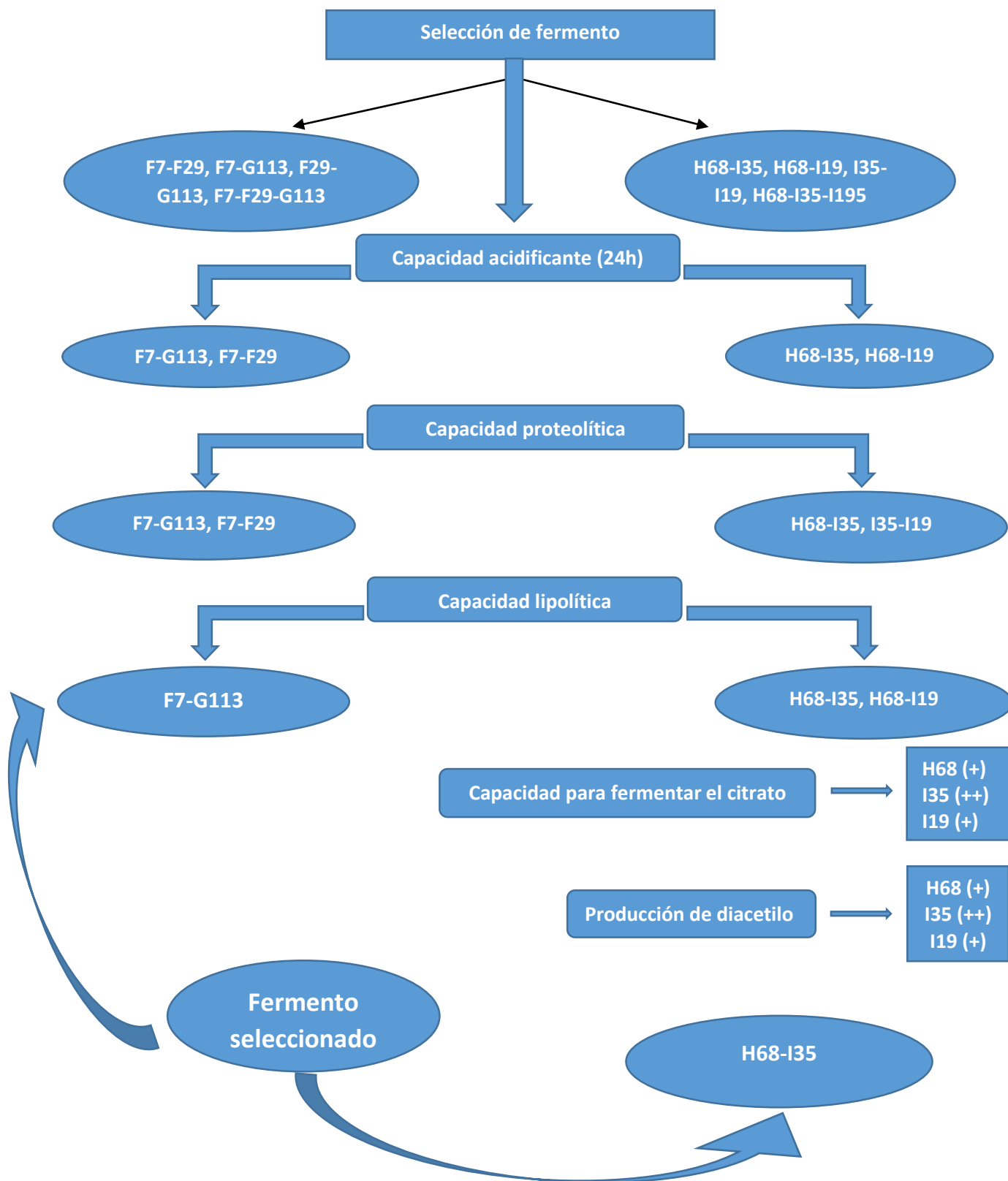


Figura 3.4.21. Esquema de los pasos seguidos para realizar la selección de los fermentos.

## Conclusiones

- Se pudo asociar las características tecnológicas de las cepas aisladas a la zona de procedencia de las mismas. Las cepas de Valle de Lerma mostraron ser más acidificantes que las de Valle de Amblayo, con una alta capacidad de fermentar el citrato. Las cepas de Valle de Amblayo, mostraron una alta capacidad para producir diacetilo.
- Las cepas de ambas zonas de estudio presentaron propiedades más relacionadas a la producción de compuestos de flavor que a la acidificación de la leche por lo que serían más apropiadas para su uso como cultivos adjuntos que como cultivos iniciadores primarios.
- Fue notable el alto porcentaje de cepas de Valle de Amblayo resistentes a vancomicina, aunque serían necesarios estudios genéticos complementarios para conocer si se trata de una resistencia intrínseca.
- Se encontró baja biodiversidad microbiológica en las muestras de leche, ya que solo se aislaron cepas pertenecientes a dos géneros de BAL. Sin embargo, se destaca la diversidad genotípica hallada dentro de la misma especie en las cepas de Valle de Lerma.
- Se encontraron seis cepas, dos de Amb correspondientes al género *E. durans* y cuatro de VL correspondientes al género *E. faecium*, que mostraron tener efecto inhibitorio frente a diferentes patógenos. En Amb, inhibieron a *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, y *Salmonella* sp. En VL todas inhibieron a *L. monocytogenes*.
- Se pudieron seleccionar dos fermentos para queso caprino pasta semidura, uno por cada zona de estudio. Estos fermentos obedecieron a un perfil tecnológico (producción de diacetilo, producción de acidez y fermentación de citrato) y efecto inhibitorio frente a patógenos.
- Finalmente, la presencia de cepas con características tecnológicas particulares procedentes de las zonas específicas de producción destaca la importancia de conservar y dar valor a las cepas con diferentes fenotipos y genotipos. La importancia de la protección de la microbiota natural de permanecer en el medio ambiente y en las zonas tradicionales de producción

se puede lograr en parte haciendo diferentes colecciones de cepas bacterianas (conservación ex situ), pero sobre todo alentando la producción local en las zonas, donde la cría de cabras son vocaciones tradicionales. Integrar y equilibrar tradición e innovación puede ser un recurso útil y otra fuente de biodiversidad (conservación de la biodiversidad in situ).

## Capítulo Nº4: Cepas lácticas de leche caprina con aptitud para transformación industrial

### 4.1 Introducción

El queso puede ser considerado básicamente un concentrado de caseínas y minerales como calcio y fósforo, con un contenido graso variable (Mahaut y col., 2003). Desde un punto de vista tecnológico, se lo puede definir como el producto fresco o maduro, sólido o semisólido, que resulta de la coagulación de la leche por acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, seguida del desuerado del coágulo obtenido o cuajada. La cuajada puede ser consumida como tal bajo la categoría de queso fresco o sufrir una maduración que conduce a una serie de transformaciones especialmente enzimáticas en las que se adquieren caracteres organolépticos específicos, constituyendo el queso maduro (Chamorro y Losada, 2002).

Actualmente, muchos quesos se elaboran con cultivos lácticos comerciales, que han sido aislados y seleccionados en función de la variedad, de las propiedades deseadas (producción de sabores/aromas/texturas, resistencia a los bacteriófagos, tolerancia a la sal, producción de bacteriocinas, etc.) y de la velocidad de producción de ácido láctico. En países como Italia, Francia y España (Scintu y Piredda, 2006) y en regiones del noroeste argentino (Chavez y col., 2018; Lopez y col., 2014), gran variedad de quesos artesanales se elabora empleando cultivos iniciadores que resultan de la acidificación espontánea de la leche, del suero de quesería de elaboraciones anteriores, o del cuajo natural, denominándose fermentos naturales de leche, de suero o de cuajo respectivamente. Estos cultivos poseen una rica microbiota, integrada por gran variedad de bacterias lácticas dominantes, constituyendo nichos ecológicos ricos en cepas de bacterias lácticas salvajes.

Las bacterias lácticas (constituyentes de los cultivos lácticos o fermentos) 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, 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; y por último hidrolizando las proteínas y la grasa de la

leche, dando origen a la liberación de péptidos, aminoácidos y ácidos grasos volátiles (Eck, 1990; Farye y Fox, 1990; Stanley, 1998; McSweeney y Sousa, 2000; Moulay y col., 2006; Chaves-López y col., 2014, Zhang y col., 2018).

La función principal de las bacterias lácticas es la acidificación de la leche y sus derivados. Éstas 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, 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, ejerciendo así un mayor efecto conservante (Stanley, 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, entre los más importantes) que influyen en el sabor/aroma (González del Llano y col., 1995).

Durante la maduración de los quesos los eventos principales que se producen son la glicólisis, la proteólisis y la lipólisis, reacciones que influyen en la composición, aspecto, textura, sabor y aroma de los quesos. La glicólisis, es la fermentación de la 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 (Mc Sweeney y Sousa, 2000). La proteólisis, es la hidrólisis de la caseína, catalizada por enzimas del extracto coagulante (quimosina y pepsina), de la leche (plasmina, catepsina D), del fermento iniciador, de las bacterias lácticas que no pertenecen al fermento iniciador (NSLAB), del fermento secundario y por las proteinasas y/o peptidasas exógenas utilizadas para acelerar la maduración (McSweeney y Sousa, 2000). La lipólisis consiste en la liberación de ácidos grasos volátiles a partir de la grasa de la leche; particularmente la grasa de la leche de cabra y los productos principales de su degradación durante la maduración, es decir, ácidos grasos libres (AGL), que juegan un papel importante en el sabor característico de los quesos de cabra (Medina y Nuñez, 2004). Los ácidos grasos libres (AGL), también puede ser transformado por microorganismos a otros compuestos de sabor a menudo más potentes, que incluyen metil cetonas, lactonas, ésteres, alcoholes secundarios y aldehídos, que también influyen directamente en el sabor en diferentes quesos (Abeijon y col., 2009).

Los ácidos grasos volátiles sobre todo cuando están correctamente equilibrados con los productos de proteólisis u otras reacciones, contribuyen al sabor del queso, (Bosset y col., 1993; Rychlik y col., 1997). Sin embargo, una lipólisis extensa o no controlada, es considerada indeseable porque los niveles altos de ácidos grasos en quesos originan fenómenos de rancidez.

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, entre las barreras más importantes, todas aconteciendo en el interior del queso (Johnson y col., 1990; Medina y Núñez, 2004; Fox y col, 2017).

En los últimos años, mucha atención se ha centrado en los quesos artesanales de cabra por sus características sensoriales distintivas, que a menudo se correlacionan con las actividades enzimáticas de microorganismos autóctonos derivado de la leche y el ambiente. Entre ellos, los enterococos han sido reconocidos como una parte esencial de la población microbiana natural de muchos productos lácteos de cabra (Quigley y col., 2013; Mc Innis y col., 2015) donde a veces pueden prevalecer sobre lactobacilos y lactococos (Samelis y col., 2009; Vandera y col., 2018). Aunque la ocurrencia natural o incluso la prevalencia de ciertas especies de *Enterococcus*, principalmente *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. durans*, en los quesos tradicionalmente maduros ha sido reconocido desde mediados de los años 80, los enterococos todavía se perciben con mucho escepticismo con respecto a la inocuidad de los quesos (Ogier y Serror, 2008; Ribeiro y col., 2017). Por el contrario, la prevalencia en quesos fermentados naturalmente por especies o genotipos lácteos inofensivos, se ha asociado con varias actividades beneficiosas, tecnológicas y antagonistas *in vitro* e *in situ* (Sarantinopoulos y col., 2001; Giraffa, 2003; Ben Omar y col., 2004; Fortina y col., 2008; Giannou y col., 2009; Morandi y col., 2012).

El diseño de fermentos con propiedades tecnológicas que respondan a la composición fisicoquímica de la leche y a las condiciones de maduración (temperatura y humedad de la región) es necesario para la fabricación de queso artesanal. Aunque hay países europeos donde se usan desde hace años fermentos autóctonos para cada tipo de queso, en la Argentina los emprendimientos comerciales caprinos usan en su mayoría fermentos de origen bovino adquiridos en empresas especializadas del rubro (Oliszewski y col., 2014). Los quesos producidos en las regiones áridas de Salta están

elaborados con leche de cabra cruda, sin la adición de cultivos lácticos, por lo que la microbiota láctica en los quesos proviene de la leche y del cuajo natural que usan en sus elaboraciones. Por el contrario, la producción quesera en la región de Valle de Lerma se realiza en su mayoría con fermentos comerciales bovinos.

En algunos trabajos se aislaron e identificaron las cepas lácticas a partir de leches y/o quesos artesanales para conocer los microorganismos presentes y estudiar su multiplicación, supervivencia e implicancia en los procesos de elaboración y maduración de quesos (Medina y col., 2001; Caridi, 2003; Picon y col., 2019). En otros trabajos el objetivo de la caracterización tecnológica de las cepas fue el de incluirlas posteriormente en el diseño de los fermentos iniciadores, posibilitando producciones industriales de quesos con características similares a los artesanales (Durlu-Ozkaya y col., 2001; Oliszewski y col., 2014, Meng y col., 2017). En el presente capítulo, la elaboración de fermentos lácticos utilizando microbiota nativa de dos zonas agroecológicas diferentes, se realizó con la finalidad de asociar las características tecnológicas de la microbiota láctica a las regiones de las cuales provenían, sumando de esta manera la posibilidad de su utilización como potencial herramienta de identificación de origen.

**4.2 Objetivo:** Evaluar el efecto de cepas seleccionadas en las características fisicoquímicas, bioquímicas y sensoriales de quesos artesanales.

### **4.3 Materiales y Métodos**

#### **4.3.1 Elaboración de los fermentos lácteos**

Se elaboraron dos fermentos: Fermento Valle de Amblayo (Amb) y Fermento Valle de Lerma (VL), denominados según la zona de procedencia de las cepas nativa.

Las cepas utilizadas en la elaboración del fermento fueron: F7-G113 (Amb) y H68-I35 (VL). Las mismas se seleccionaron de acuerdo a sus características tecnológicas, según los criterios mencionados en el Capítulo 3.

La preparación de los fermentos lácticos fue realizada de manera aséptica en cámara de flujo laminar. Se inoculó al 2% (v/v) (concentración final de  $10^8$  ufc/mL) leche en polvo descremada reconstituida (LDR, 10%, p/v) con cada cepa seleccionada por zona

en una proporción 1:1. Las botellas con LDR inoculada, se incubaron a 37°C durante 24 h. Al cabo del período transcurrido, se obtuvo un fermento lácteo con una concentración de microorganismos de  $10^9$  ufc/mL.

#### **4.3.2 Elaboración de queso caprino**

Los quesos caprinos se elaboraron en las instalaciones de la planta piloto de INTA Salta. La leche caprina utilizada en la elaboración de los quesos, provino del tambo experimental de la mencionada institución y fue tomada durante el segundo tercio de la lactancia. Se establecieron tres lotes (diferenciados por el período de recolección), considerando cada uno como la leche proveniente del ordeño realizado durante dos días, homogenizada en tanque de frío (4°C). Cada lote de 120 L (c/u), se dividió en bidones de 5 L, los cuales se congelaron hasta el momento de la elaboración.

Durante la elaboración de los quesos, se utilizó la tecnología quesera para queso pasta semi dura, salado con salmuera (18°Brix) (Meinardi y col., 1994; Zalazar y col., 1999).

Los quesos se elaboraron según tres tratamientos: quesos control, elaborados sin fermento (SF), quesos con fermento Valle de Lerma (VL) y quesos con fermento Valle de Amblayo (Amb), con tres repeticiones cada uno.

Cada elaboración se realizó en tina quesera (con camisa de agua), utilizando 35 litros de leche cruda, los cuales fueron tratados térmicamente a 63 - 65°C durante 30-32 min para su pasteurización, pasado este tiempo se atemperó en baño frío, hasta alcanzar los 35 - 37°C, en los tratamientos con fermento, se añadió el fermento láctico a una concentración del 1%, se mezcló para homogenizar en toda la leche y se dejó reposar durante 10 min. Posteriormente se agregó 17,5 mL de  $CaCl_2$  (Concentración de la solución madre 40% g/mL), pasado 10 min, se añadió el cuajo químico/industrial (40 mL / 100 L, marca Insulac) y se homogenizó. Se dejó reposar la leche con el coagulante añadido durante 17 - 26 min aproximadamente, hasta que se formó la cuajada. Seguidamente se procedió al corte de la cuajada con lira (corte manual), hasta obtener un grano de aproximadamente 0,7 centímetro. Se produjo el desuerado. La cuajada se colocó en moldes de 250 g y se prensó durante 18 h. Finalmente se procedió al salado de los quesos por inmersión en salmuera (18°Brix, durante 2 h a 13°C +/- 1 °C). Los



quesos se maduraron en cámara a 12°C y 75% de humedad relativa durante 40 días (Figura 4.3.1).

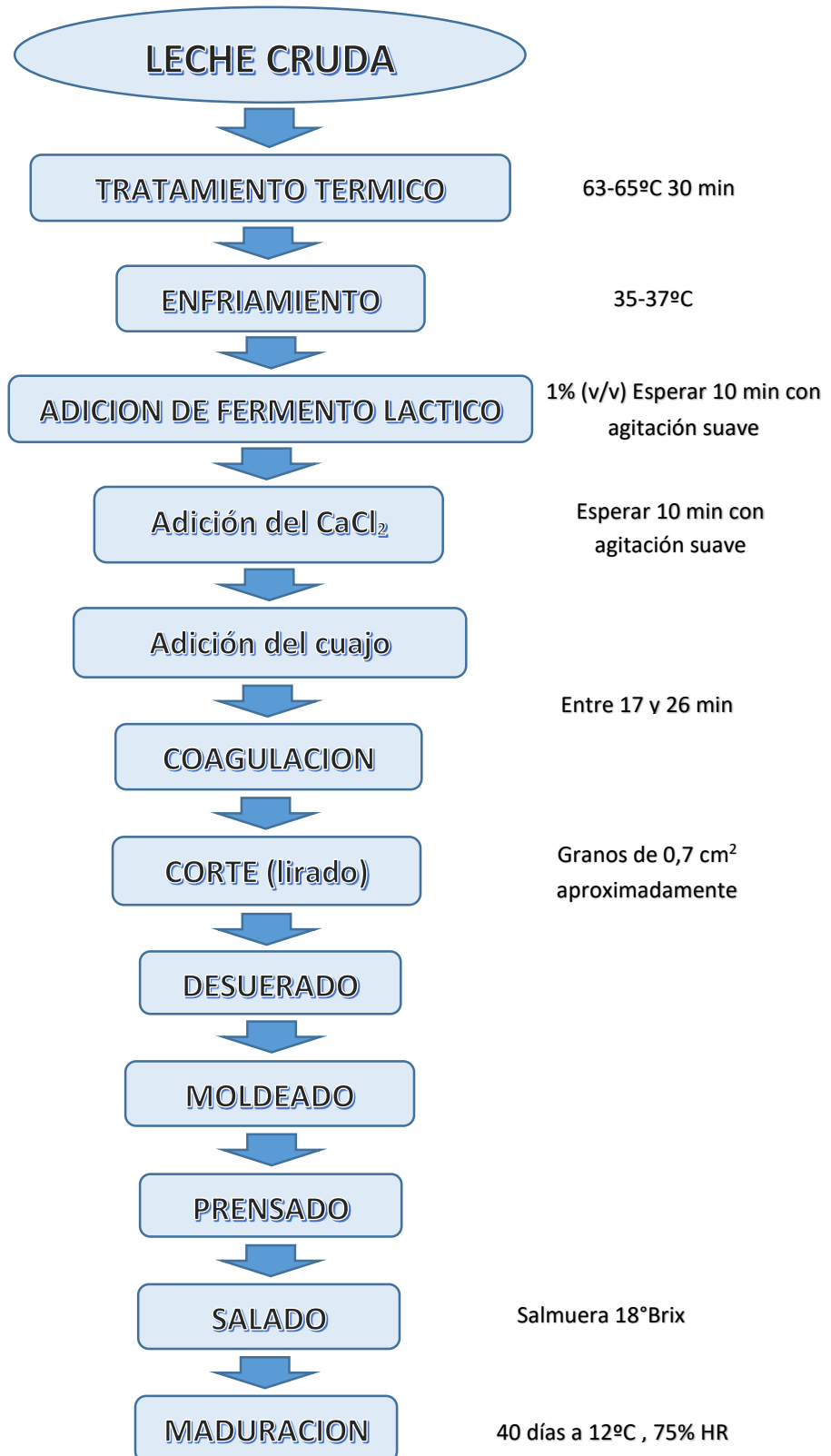


Figura 4.3.1. Protocolo utilizado en la elaboración de los quesos.

### 4.3.3. Toma de muestras

#### Muestras

Durante la elaboración de los quesos se realizó la toma de muestras en tres momentos: Leche cruda, leche tratada térmicamente (TT) y cuajada, las mismas se tomaron en condiciones de esterilidad y fueron llevadas inmediatamente al laboratorio para su análisis físico- químico (pH) y microbiológico (RAM, CT y BAL).

En quesos, las muestras se tomaron a tiempo 0 (al colocar los quesos en cámara de maduración) y 40 días de maduración, las mismas fueron envueltas en papel de aluminio e inmediatamente conservadas a -20°C hasta su análisis.

### 4.3.4. Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos realizados fueron: recuento de aerobios totales (RAM), coliformes totales (CT) y bacterias lácticas (BAL). Los mismos se realizaron en todas las muestras: Leche cruda, leche TT, cuajada, queso T0 y queso T40.

Las determinaciones de RAM y CT en leche se efectuaron según las descripciones realizadas en el Capítulo 1. La determinación de BAL se realizó en agar MRS según descripción realizada en el Capítulo 2.

#### Análisis microbiológicos en queso

Los quesos se descongelaron a 4°C aproximadamente durante 12 h. Se retiró una capa fina (0,5 cm) de una de las caras del queso y con un sacabocado estéril se tomó una muestra compuesta de diferentes lugares del queso de manera de obtener una muestra representativa.

#### - *Recuento de bacterias aerobias mesófilas (RAM)*

El método utilizado fue el recuento en placa (ICSMF 2000). Se tomaron 10 g de la muestra que fueron transferidas a 90 mL solución de citrato de sodio (2%, p/v), y posteriormente homogenizada. Se tomó 1 mL de la solución que fue colocada en tubos conteniendo 9 mL de agua peptonada (0,1%, p/v) para realizar las correspondientes diluciones. Finalmente se tomó 1 mL de cada dilución y se llevó a caja de Petri con el

agregado de 15 mL de medio de cultivo Agar Recuento en Placa (ARP). Luego de 72 h a 30°C se realizó el recuento de colonias.

- *Coliformes totales (CT)*

El método utilizado fue el recuento en placa (ICMF 2000). De los tubos de dilución utilizados en RAM, se tomó 1 mL (de las diluciones previamente definidas) y se llevó a caja de Petri con el agregado de 15 mL de medio de cultivo Agar Bilis Lactosa Rojo Neutro Cristal Violeta (ABLV). Luego de 24 h a 37°C se realizó el recuento de colonias.

- *Recuento de bacterias lácticas (BAL)*

Mediante el método de recuento en placa, en agar MRS (De Man y col., 1960) (Biokar). De los tubos de dilución utilizados en RAM, se tomó 1 mL y se llevó a caja de Petri con el agregado de 15 mL de medio de cultivo Agar MRS. Se incubó a 37°C durante 72 h en microaerofilia (presión de O<sub>2</sub> del 7% y de CO<sub>2</sub> del 14%, v/v).

#### **4.3.5 Análisis fisicoquímico y composición global de los quesos**

Los quesos se descongelaron a 4°C aproximadamente durante 12 h y luego 1 h a 20-25°C antes de iniciar su procesamiento. Se retiró una capa fina (0,5 cm) de todas las caras de los quesos de manera de obtener una muestra representativa del queso del modo en que es consumido usualmente, se procedió al rallado para su posterior análisis.

En las muestras de queso T0 y queso T40, se realizaron las siguientes determinaciones:

*Parámetros físicos – químicos:* pH, ClNa

*Composición global:* humedad, grasa, proteína total.

##### **4.3.5.1 Parámetros fisicoquímicos**

- *pH*

Se determinó empleando un pHmetro (OAKTON pH 510 series y electrodo Schott Z 509). Se pesó 10 g de cada muestra representativa del queso rallado y se colocó

en mortero con 10 mL de agua destilada para formar una pasta. Se midió el pH de esta pasta con electrodo a 21,0°C. Las mediciones se realizaron por triplicado.

- *Cloruro de sodio*

El contenido de cloruro de sodio en los quesos se determinó por potenciometría (IDF *Standard* 88A:1988, AOAC *Method* 983.14). Se colocaron 2 g de queso rallado en un vaso de precipitados de 150 mL, se agregaron 100 mL de una solución de ácido nítrico (conc. 1,5 mL/L de HNO<sub>3</sub>). Esta solución se calentó a 60°C por 1 h y se valoró con AgNO<sub>3</sub> 0,1N. El punto final se determina por potenciometría y se alcanza cuando se obtiene una diferencia de 255 mV entre el electrodo de plata y el electrodo de referencia (Fox 1963). El cálculo de NaCl se realizó según la siguiente ecuación (1).

$$NaCl (\%) = \frac{(mL AgNO_3 \times 0,588)}{\text{peso de la muestra (g)}} \quad (1)$$

#### 4.3.5.2 Composición global

- *Humedad en quesos*

Se pesó 2 g de cada muestra de queso en cápsulas que contenían 20 g de arena, previamente estufadas a (105°C) por una hora y media y puestas en desecador durante una hora. Se llevó las cápsulas con arena y queso a estufa a 102°C, durante 24 h. Posteriormente se retiraron de la estufa y se colocaron en desecador hasta temperatura ambiente (aproximadamente 1 h). Se pesó nuevamente la cápsula. El cálculo de humedad se realizó por diferencia de peso y se expresó en porcentaje. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

- *Determinación de grasa*

El método de determinación de la grasa en el queso consiste en la digestión parcial de los componentes del queso, excepto de la grasa, con ácido sulfúrico a alta temperatura (Norma IRAM 14003-8:2007, Determinación de grasa por Gerber).

Se colocó en un butirómetro 8,4 mL de ácido sulfúrico de Gerber, 3 mL de agua destilada a 60°C y 2 mL de alcohol isoamílico. Posteriormente se mezcló 2,5 g del queso rallado con el ácido por inversión del butirómetro. Se colocó el butirómetro en baño a 82°C. Luego se destapó el extremo del vástago y agregó agua destilada a 60°C hasta el extremo superior de la columna. Se llevó a centrifuga, durante 5 min a 1100-1300 rpm. Nuevamente se llevó a baño durante 3 min. Inmediatamente se leyó el valor de grasa en la escala, haciendo coincidir el extremo inferior de la columna de grasa con el cero de la escala. El valor leído en la escala graduada del butirómetro corresponde a la cantidad de grasa en gramos por cada cien gramos de queso. Las determinaciones se realizaron por duplicado (% CV<2%).

- *Proteínas totales*

El contenido de proteínas totales en los quesos se determinó mediante el método de Kjeldahl (FIL-IDF, 1993:20B). En un tubo de digestión se colocaron 0,3 g de queso, los catalizadores sulfato de potasio (3,5 g) y dióxido de titanio (100 mg) y ácido sulfúrico (10 mL). La digestión de la muestra se llevó a cabo en una unidad digestora (*Digestion System 6, 1007 Digester, Tekator, Suecia*) alcanzando una temperatura de 420°C. Se dió por finalizado el proceso de digestión cuando la muestra se tornó translúcida y límpida. El análisis del contenido de proteínas totales se realizó sobre el digerido mediante una destilación y posterior titulación. En primer lugar, se adicionó hidróxido de sodio, y luego se inició la destilación por arrastre con vapor de agua. El destilado se colectó en un erlenmeyer conteniendo ácido bórico y 4 gotas de solución indicadora de punto final, compuesta por azul de metileno (0,1%, p/v) y rojo de metilo (0,15%, p/v) en etanol al 96%. La destilación se realizó en un equipo *BÜCHI Distillation Unit B-324* (Suiza). Finalmente, las muestras destiladas y recogidas como borato de amonio se titularon con una solución valorada de ácido sulfúrico hasta el viraje del indicador de verde a fucsia. Para expresar el resultado en g% de proteínas totales, se multiplicó el valor obtenido de nitrógeno total por un factor igual a 6,38.

#### 4.3.6 Procesos asociados a la maduración de quesos

Durante la maduración del queso, la proteólisis y la lipólisis se encuentran entre los más importantes eventos que ocurren, y que conducen a la producción de compuestos volátiles (McSweeney y Sousa, 2000).

Para estudiar estos procesos, se analizaron las muestras de quesos T0 y T40 mediante los siguientes parámetros:

- *Proteólisis*: Electroforesis en gel de poliacrilamida (Urea-PAGE) de la fracción insoluble a pH 4,6, fraccionamiento nitrogenado, y perfiles peptídicos por RP-HPLC.
- *Lipólisis*: Perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa
- *Compuestos de aroma*: Nariz electrónica y determinación de compuestos volátiles por cromatografía gaseosa.

##### 4.3.6.1 Proteólisis

Dado que el proceso de proteólisis involucra varias etapas y distintos agentes proteolíticos, el mismo no puede ser descrito por un único parámetro. En efecto, un estudio detallado de los diferentes grados de proteólisis (primaria o secundaria) requiere de la aplicación de varias metodologías (Walstra y col., 1999; Sousa y col., 2001). La electroforesis de la fracción insoluble a pH 4,6 es la técnica generalmente utilizada para estudiar la proteólisis primaria, permitiendo reconocer las caseínas no degradadas. Por otro lado, la proteólisis secundaria suele describirse mediante la determinación del contenido de nitrógeno en fracciones del extracto de queso solubles en distintos medios, la obtención de los perfiles peptídicos por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), al igual que la cuantificación del contenido de aminoácidos libres totales e individuales (Grappin y Beuvier, 1997; Fox y McSweeney, 1998; Upadhyay y col., 2004).

La proteólisis se estudió en muestras de quesos a tiempo 0 y 40 días de maduración a través de electroforesis en gel de poliacrilamida (Urea-PAGE) de la fracción insoluble a pH 4,6, fraccionamiento nitrogenado, y RP-HPLC de los péptidos solubles.

- *Electroforesis (Urea-PAGE)*

En la técnica de urea-PAGE, la urea despliega parcialmente a las proteínas durante su proceso de solubilización. La técnica de ureaPAGE generalmente es usada sólo para la separación de las caseínas. El uso de urea brinda una buena solubilización de las proteínas hidrofóbicas de la micela de caseína. Las caseínas son luego resueltas de acuerdo a sus cargas y se pueden observar bandas bien separadas de las  $\alpha$ S1-,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseínas. Varios sistemas de buffer conteniendo urea han sido usados, incluyendo los buffers Tris-HCl/glicina y Tris-EDTA-borato a pH ácido, pero la técnica más común es el uso de buffers conteniendo urea a pH alcalino, como por ejemplo Tris-glicina (pH 8,9) conteniendo urea 6 M (Chevalier, 2011).

En el presente estudio, la obtención de los extractos de cada muestra y el análisis electroforético de los mismos se realizó según lo propuesto por Sihufe y col., 2010.

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida con agregado de urea, dado que ésta disocia las distintas caseínas de la micela, permitiendo la separación de las mismas según su carga y masa (Upadhyay y col., 2004).

El ensayo se realizó en una cuba vertical *Mini-Protean Tetra Cell* (BioRad Laboratories, California, Estados Unidos), con una fuente de poder PowerPac™ Basic (BioRad Laboratories, California, Estados Unidos). Se utilizó un sistema de gel discontinuo formado por dos geles: gel de poro grueso (1 vol B + 4 vol D + 1 vol E + 2 vol F) y gel de poro fino (4 vol A + 4 vol C + 8 vol G). Las soluciones A, B, C, D, E, F y G se describen en las tablas 4.3.1 y 4.3.2.

**Tabla 4.3.1.** Gel de poro grueso (Acrilamida 5%, p/v)

B pH 6,7	HCl 1 N (48 mL), Tris (5,98 g), TEMED (0,46 mL), urea (24 g) y H <sub>2</sub> O (hasta 100 mL).
D	Acrilamida (10 g), bis (2,5 g), urea (24 g), H <sub>2</sub> O (hasta 100 mL)
E	Riboflavina (0,04 g), urea (24 g), H <sub>2</sub> O (hasta 100 mL). Preparar el día de corrida
F	Urea 24 g, H <sub>2</sub> O (hasta 100 mL)

**Tabla 4.3.2.** Gel de poro fino (Acrilamida 7%, p/v)

A pH 8,9	HCl 1 N (24 mL), Tris (18,3 g), TEMED (0,115 mL), urea (24 g), H <sub>2</sub> O (hasta 100 mL)
C	Acrilamida (28 g), bis (0,735 g), urea (24 g), H <sub>2</sub> O (hasta 100 mL)
G	Persulfato (0,14 g), urea (24 g), H <sub>2</sub> O (hasta 100 mL)

Para la preparación de la muestra, se disolvió 3 g de queso en 25 mL de urea 8,66 M (520,4 g/L), se dejó 1 hora a temperatura de heladera y se filtró en frío.

El filtrado se llevó a una concentración aproximada de 5 mg de proteína / mL con buffer de muestra (sol B 25 mL, glicerol 10 mL, agua hasta 100 mL). Para la siembra, se le agregó una gota de  $\beta$ -mercaptoetanol (aprox. 50  $\mu$ l) para atacar los enlaces sulfuro y abrir la molécula proteica. Se adicionaron 10  $\mu$ L de azul de bromofenol (25 mg de azul de bromofenol diluidos en 10 mL de sol. B) por cada 250  $\mu$ L de solución a sembrar. Se sembró 10  $\mu$ L de cada muestra en cada calle del gel.

Para preparar los patrones se pesaron 5 mg de  $\alpha$ -caseína y 5 mg de  $\beta$ -caseína, se disolvieron en 3,8 mL de buffer de muestra, 200  $\mu$ L de azul de bromofenol y 1 gota de  $\beta$ -mercaptoetanol. A estos se sumó un patrón de caseínas caprina.

Las corridas se realizaron en una solución como buffer de corrida, bajo las siguientes condiciones: voltaje constante de 248 V, intensidad máxima de 25 mA y potencia de 6,8 W. La finalización de la corrida se determinó por la llegada del frente de avance hacia el final de la placa, lo que se detectó por el colorante adicionado a la muestra. Posteriormente, los geles se colorearon con solución de Coomassie Blue R-250 y se decoloraron mediante repetidos lavados con soluciones decolorantes de ácido acético y etanol (Tabla 4.3.3).

**Tabla 4.3.3.** Soluciones para la tinción- decoloración de los geles

Colorante concentrado	2,5 g de Comasie Blue R 250 + 1 L EtOH 9 %.
Colorante para fijación y tinción	100 mL de ácido acético 10 % con 100 mL de colorante concentrado antes de usar.
Solución decolorante 1	200 mL EtOH 95 % + 300 mL acido acético 5% (Tiempo: 1 – 2 h).



Solución decolorante 2	150 mL EtOH 95 % + 350 mL ácido acético 5% (Tiempo 1-2 h).
Solución decolorante 3	100 mL EtOH 95 % + 400 mL ácido acético 5% (Tiempo: 2 h)

Luego de la tinción, los perfiles electroforéticos fueron escaneados en computadora. Para realizar la cuantificación de las bandas de proteínas, los geles fueron analizados a través del programa libre Image J.

Para las fracciones analizadas por urea-Page, se estimó la densidad óptica integrada (DOI) y la misma fue informada como la relación del valor de DOI de cada banda respecto de su valor de DOI inicial (DOI<sub>i</sub>). Los valores menores que 1 indicaron una disminución y valores mayores que 1 indicaron un aumento en cada fracción respecto del valor inicial (Ceruti y col., 2010).

La dificultad para obtener datos cuantitativos es una limitación importante de la técnica, ya que la cantidad de colorante que toma el gel es función de las proteínas presentes en él y del protocolo empleado para la tinción y decoloración, por lo que PAGE debe ser considerada solamente como una técnica analítica semi-cuantitativa (Chevalier, 2011).

#### - *Fraccionamiento del nitrógeno*

Para fraccionar los compuestos nitrogenados del queso; en este estudio se seleccionaron: Nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6), NS en ácido tricloroacético al 12% (NS-TCA) y NS en ácido fosfotúngstico al 2,5% (NS-PTA). La técnica se basa en la utilización de distintos agentes precipitantes para separar los compuestos nitrogenados de las muestras a partir de un extracto crudo del queso en solución de citrato de sodio, mediante el método de Kjeldahl. Los péptidos presentes en el queso son fraccionados de acuerdo a su peso molecular, su hidrofobicidad y su conformación en los distintos solventes. En efecto, el contenido de NS-pH 4,6 incluye proteínas (excluyendo las caseínas), todos los péptidos de hasta 30-35 residuos de aminoácidos, aminoácidos libres y compuestos nitrogenados menores, tales como aminas, urea y amoníaco. La fracción soluble de NS-TCA está constituida por péptidos medios y pequeños con peso molecular < 6000 Da compuesta por aminoácidos libres y compuestos nitrogenados menores, como aminas, urea y amoníaco. Por último, la fracción soluble de NS-PTA

contiene compuestos con un peso molecular hasta 600 Da, que incluyen péptidos muy pequeños, aminoácidos y compuestos nitrogenados menores (Grappin y Beuvier, 1997; Ardö, 1999).

La técnica es de gran utilidad para evaluar el grado de avance de la proteólisis primaria y secundaria (Pripp y col., 2000).

Para realizar el fraccionamiento nitrogenado, se homogenizaron 10 g de queso con 20 mL de solución de citrato de sodio 0,5 M. La suspensión homogénea se trasvasó a un vaso de precipitado adicionando agua destilada hasta 80 mL. Se llevó a baño termostático (Tº 40-60ºC) por una hora. El pH de la suspensión se ajustó a 4,6 mediante la adición de HCl 1 N. La muestra se centrifugó a 3000 g durante 10 min, obteniéndose dos fracciones, una soluble y otra insoluble (compuesta por caseínas sin degradar y productos con peso molecular superior a 15-16000 Da). La fracción soluble, compuesta por productos primarios de peso molecular inferior a 15000-16000, se enrasó a un volumen de 100 mL por adición de agua destilada, se filtró y se extrajo una alícuota de 10 mL, para ser analizada por Kjeldahl. El contenido de nitrógeno de esta fracción, representa el nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6) (Gripon y col, 1975). Las fracciones solubles en TCA y en PTA se obtuvieron a partir de la fracción soluble a pH 4,6 de acuerdo a la metodología descrita por Gripon y col. (1975). Para obtener la fracción soluble en TCA, a 10 mL de la fracción soluble a pH 4,6 se le adicionaron, 10 mL de solución de ácido tricloroacético al 24%. La solución resultante se filtró. La solución obtenida representa la fracción soluble en TCA al 12% (NS-TCA). Nuevamente se tomó 10 mL de la fracción soluble a pH 4,6, y se le adicionó 5 mL de ácido sulfúrico al 25%, e igual volumen de ácido fosfotúngstico 10%. Transcurridas 24h, la solución se filtró. El filtrado constituye la fracción soluble en PTA al 2,5% (NS-PTA). Los niveles de NS-TCA y NS-PTA en las muestras de queso se determinaron por el método de Kjeldahl.

#### - Determinación del índice de maduración

El nivel de nitrógeno en la FS es considerado un indicador de la cantidad de productos propios de la proteólisis secundaria: péptidos medianos y pequeños, aminoácidos y sus productos de degradación (McSweeney y Fox, 1997). El índice de maduración (IM), definido como la relación porcentual entre el contenido de nitrógeno en la FS (NS) con respecto al nitrógeno total (NT),

$$IM = \frac{NS \times 100}{NT} \quad (2)$$

constituye un parámetro de utilidad para evaluar, de manera general, el grado de degradación que presentan las caseínas en el queso (Sousa y col., 2001).

- *Perfiles peptídicos por RP-HPLC*

El análisis de péptidos solubles se realizó mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC). Los perfiles peptídicos de los quesos a distintos tiempos de maduración reflejan el complejo equilibrio entre su producción y su posterior degradación a aminoácidos (Pripp y col., 2000). Esta técnica permite la separación de péptidos o grupos de péptidos, obteniéndose un perfil proteolítico característico de cada muestra.

Para cada muestra de queso se obtuvo la correspondiente fracción soluble en agua a pH 4,6, de acuerdo al método propuesto por Kuchroo y Fox (1982). Se mezclaron 20 g de queso rallado con 30 mL de agua destilada. Esta mezcla fue homogeneizada con un equipo Ultra-Turrax T25 (IKA Werke, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Alemania) durante 2 min, llegando a una velocidad de 16000 rpm y a temperatura ambiente. La mezcla obtenida se mantuvo en un baño termostático a 40°C durante 1 h y luego, utilizando HCl 1 N y bajo agitación, se acidificó hasta llegar a pH 4,6 con una lectura estable durante 5 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 4800 rpm durante 30 min a 5°C, utilizando una centrífuga con termostatación Biofuge 28RS (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Alemania). La capa de grasa formada en la superficie fue eliminada y entonces se separó el sobrenadante del precipitado, siendo este último descartado. El sobrenadante se trasvasó a un matraz aforado de 100 mL y se llevó a volumen con agua destilada. Por último, el contenido del matraz se filtró usando papel Whatman N° 42 (Whatman Int. Ltd., Maidstone, Reino Unido), obteniéndose así, a partir del filtrado recogido, la fracción soluble en agua a pH 4.6 (FS).

El equipamiento utilizado para realizar el análisis de la fracción soluble fue un sistema cromatográfico Waters (Waters Corporation, Milford, MA, Estados Unidos), consistente en una bomba binaria Waters 1525 Series, inyector automático Waters

717plus, degasificador en línea AF, detector de absorbancia dual Waters 2487 y un software Waters Breeze System. La columna fue mantenida a temperatura constante utilizando un controlador Eppendorf TC-50 (Eppendorf North America Inc., Madison, MA, Estados Unidos).

La separación cromatográfica de los péptidos presentes en la fracción soluble se llevó a cabo utilizando un gradiente binario y una columna de C18 (250 x 4.6 mm y 300 Å de diámetro de poro) Microsorb-MV (Varian Inc., Palo Alto, CA, Estados Unidos). Una alícuota de la fracción soluble se filtró a través de una membrana de nylon de 0,2 µm Alltech (Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL, Estados Unidos) y 100 µL se inyectaron en el equipo para su análisis cromatográfico. Todos los solventes utilizados para las fases móviles fueron de grado HPLC. Se realizó una corrida cromatográfica por cada fracción soluble obtenida.

Los quesos fueron analizados por el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC).

#### **4.3.6.2 Lipólisis**

En todas las variedades de queso existe un cierto grado de ruptura de carácter hidrolítico de las moléculas de triglicéridos o lipólisis, provocando la liberación de ácidos grasos en el queso. En la mayoría de las variedades de quesos, la vía de la lipólisis ocurre en forma moderada. Esta hidrólisis es de naturaleza enzimática y según la variedad de queso considerada, las enzimas responsables de esta transformación pueden ser de origen endógeno, exógeno o nativo de la leche.

El estudio de lipólisis en los quesos T0 y T40 se realizó a través del análisis del perfil de ácidos grasos libres (AGL).

##### *- Perfil de ácidos grasos libre*

La metodología empleada fue la técnica de Deeth (Deeth y col, 1983), realizada por cromatografía gaseosa.

La extracción de la grasa y los AGL se realizó con dietiléter y hexano en medio ácido y con presencia de sulfato de sodio anhidro. Para aislamiento de los AGL se empleó una columna de alúmina desactivada al 10%. La extracción de los AGL se realizó con

éter isopropílico al 6% en ácido fórmico. El análisis cromatográfico del extracto obtenido se llevo a cabo mediante GC-FID.

Datos de la etapa cromatográfica:

- Cromatógrafo gaseoso marca Shimadzu, modelo GC-17A con inyector split/splitless y detector FID.
- Columna cromatográfica de 30m de longitud x 0,32mm Diámetro Interno x 0,25µm de espesor del Film. Marca: Agilent J&W. Fase estacionaria: DB-FFAP.
- Condiciones de la corrida:
  - - Temp. Inyector: 250°C
    - Temp. Detector: 250°C
    - Gradiente de Temp. del horno: 100°C, luego gradiente de 16°C/min hasta 210°C permaneciendo en esa temperatura durante 30 min.
    - Gas Carrier: nitrógeno.
    - Caudal: 3 mL/min
    - Relación de Split: 80:1
    - Volumen de inyección: 1 µL

Los análisis fueron realizados por INTI Rafaela.

#### **4.3.6.3 Compuestos de aroma**

El análisis de compuestos de aromas se realizó en el Instituto de Tecnología de los Alimentos (ITA) de INTA Castelar.

- *Nariz electrónica*

La determinación del perfil de olor se realizó mediante nariz electrónica para la cual se usó un sistema PROMETHEUS (Alpha MOS, Toulouse, Francia). El dispositivo de nariz electrónica se puede definir como un instrumento equipado con sensores químicos

y un programa con un patrón de reconocimiento quimiométrico que es capaz de reconocer y comparar olores individuales o de sustancias complejas. El dispositivo tiene dos unidades principales, es decir, un sistema de matriz de sensores ( $\alpha$ -FOX 4000, Francia) y un espectrofotómetro de masas por huella dactilar ( $\alpha$ -KRONOS, Francia) con analizador cuadrupolar de impacto electrónico. Ambas unidades están equipadas con una muestra automática de espacio de cabeza HS100 (Alpha MOS, Toulouse, Francia). El sistema  $\alpha$ -FOX contiene dieciocho sensores de óxido de metal que en su conjunto, se eligen para responder a una amplia gama de clases de productos químicos y discriminar diversas mezclas de análisis posibles. La salida de cada sensor, es integrada para producir un patrón de respuesta distinto que representa el perfil de olor de la muestra. Los datos obtenidos con este instrumento son cualitativos.

En viales de vidrio de 10 mL, se pesaron 2 g de queso rallado y se cerraron herméticamente. Cada muestra fue procesada por triplicado. Para cada muestra se obtuvieron 18 curvas, que representaron las variaciones en la resistencia de cada sensor en el tiempo, generando en su conjunto el llamado perfil de olor la muestra.

Los análisis fueron realizados por el Instituto de tecnología de los alimentos de INTA Castelar.

#### - *Compuestos volátiles*

Los compuestos volátiles se analizaron por cromatografía de gases (CG) acoplado a espectrometría de masas (EM) (SHIMADZU GCMS – QP2010 Ultra). La extracción de la fracción de sustancias volátiles se realizó mediante la técnica SPME (micro-extracción en fase sólida).

En viales de vidrio de 10 mL, se pesaron 2 g de queso rallado y se cerraron herméticamente. Los compuestos volátiles en el queso se extrajeron mediante la inmersión de la fibra SPME en el espacio de cabeza de la muestra (HS) y posteriormente se analizaron mediante un CG-EM (cromatografía gaseosa – espectrometría de masa). La fibra SPME para extraer/concentrar los compuestos volátiles en el proceso de optimización fue CAR/PDMS/DVB (2cm-50/30  $\mu$ m). El calentamiento de los viales se realizó a una temperatura de 55°C durante 15 min con agitación constante, posteriormente se expuso la fibra en el espacio de cabeza por 55 min. Luego de este tiempo la fibra fue retrotraída y llevada al puerto de inyección del cromatógrafo

gaseoso. La etapa de desorción de los analitos se llevó a cabo en el inyector de CG a 280°C. Los compuestos volátiles fueron identificados por sus tiempos de retención. Cada muestra fue procesada por duplicado.

#### 4.3.7 Rendimiento quesero

El rendimiento quesero se midió registrando los litros de leche y kilogramos de queso producidos. El total de quesos producidos por elaboración fue pesado después de la salmuera. El rendimiento porcentual se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{kg de queso} \times 100}{L \text{ de leche}} \quad (3)$$

Este rendimiento se puede expresar por kg de leche usada, no ha sido el caso de esta tesis, donde por practicidad se puso litros leche, no obstante, es factible realizar la transformación de litros a kg considerando la densidad de leche caprina.

#### 4.3.8 Análisis estadístico

Se propuso un diseño completamente aleatorizado (DCA), con tres tratamientos: Quesos sin fermento (SF), queso con fermento Valle de Amblayo (Amb) y quesos con fermento Valle de Lerma (VL) y tres repeticiones por tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un ANAVA. Las comparaciones de medias se realizaron con test a posteriori LSD de Fisher.

Se empleó el Análisis de Componentes Principales (ACP) para detectar las variables que tuvieron mayor inercia en la diferenciación de los quesos elaborados con y sin fermento. Se realizó un Análisis Multivariado Discriminante para el análisis estadístico de los datos de la nariz electrónica.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa InfoStat versión 2017 (Di Rienzo y col., 2017).

## 4.4 Resultados y Discusión

### 4.4.1 Calidad física, química y microbiológica de la leche caprina utilizada en la elaboración de quesos

Los parámetros de calidad físico, químico y microbiológico de los tres lotes de leche de cabra utilizada en la elaboración de los quesos, se muestran en la Tabla 4.4.1.

**Tabla 4.4.1** Calidad fisicoquímica, microbiológica e higiénica de la leche utilizada en las elaboraciones de los quesos.

Características fisicoquímicas y microbiológicas e higiénica de la leche de cabra cruda	Lote 1	Lote 2	Lote 3
pH	6,70±0,02 b	6,66±0,02 b	6,59±0,02 a
Acidez (°D)	10,83±0,26 b	12,47±0,26 a	12,30±0,26 a
Lipólisis (uq/mL)	1,50±0,05 b	1,51±0,05 b	1,87±0,05 a
Grasa (%)	3,76±0,08 a	4,05±0,08 a	3,44±0,08 b
Proteína total (%)	2,97±0,01 b	3,03±0,01 a	3,00±0,01 b
Lactosa (%)	4,86±0,02 a	4,94±0,02 a	4,91±0,02 a
BAL (log ufc/mL)	5,39±0,36 a	5,50±0,36 a	6,55±0,36 a
RAM (log ufc/mL)	6,90±0,38 a	6,11±0,38 a	6,92±0,38 a
CT (log ufc/mL)	4,31±0,71 a	4,09±0,71 a	4,83±0,71 a
CCS (log µq/mL)	4,55±0,32 a	4,77±0,32 a	4,47±0,32 a

Nota: Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (valor  $p < 0,05$ ) entre lotes.

BAL: Bacterias ácido lácticas

RAM: Recuento de aerobios mesófilos

CT: Coliformes totales

CCS: conteo de células somáticas

Los valores promedios obtenidos en acidez, en los tres lotes, estuvieron comprendidos entre 10,8 y 12,5°D, los cuales fueron coincidentes con los reportados para Saanen por Orozco y col. (2013). La acidez del lote 1 fue significativamente menor que en el lote 2 y 3, no obstante, la acidez de la leche en el biotipo Saanen es naturalmente menor que en otros biotipos (Chavez y col., 2011), encontrándose valores entre 6,7°D y 15°D (Chavez y col., 2009, 2011; Orozco y col. 2013). La acidez de la leche puede ser medida a través de acidez titulable o bien por medio del pH, para este último parámetro, los valores se encontraron dentro del rango de pH permitido por el Código Alimentario Argentino (CAA) Art. 555 para leches caprinas (6,57- 6,96).



La lipólisis de la leche es un criterio de calidad en leche de cabra, ya que puede impactar en la calidad sensorial de los quesos (Raynal y col.,2011). Los valores de lipólisis encontrados (1,87-1,50 uq/mL) concuerdan con leches sin alteración de grasa (Chavez y col., 2007). Valores de lipólisis menores a 1,77 uq/ml en leches caprinas, son considerados en Francia dentro del sistema de clasificación de leches, como leche de referencia (Pirisi y col., 2007).

El contenido de grasa en las leches es un componente que depende fuertemente de la alimentación del animal, el biotipo Saanen presenta valores promedios de grasa entre 3,4 y 3,9%, los cuales son menores que otros biotipos caprinos (Anglo-Nubian 5,6% y Criolla 5,9%) (Chavez y col., 2011). Los valores obtenidos en los tres lotes analizados (4,05-3,44%), se encontraron dentro de los esperados, aun considerando que el contenido de grasa en el lote 3 fue menor que el lote 1 y el 2, diferenciándose estadísticamente ( $p < 0,05$ ).

Los valores promedios de proteínas (3,03-2,97%) obtenidos en la leche, resultaron similares a los reportados en Salta, Catamarca y Leales a lo largo de la lactancia para el mismo biotipo (3,1%) (Orozco y col., 2013; Chavez y col., 2011; Scaltritti y Chavez 2009).

Los valores de los recuentos de bacterias aerobias (RAM) superan el límite permitido por el CAA (log ufc/mL 5,9) para leche cruda caprina, mientras que el conteo de células somáticas (CCS) cumple con lo exigido por la normativa (valores  $< 6,18$  log CCS/mL). Los valores de RAM, CT (coliformes totales) y CCS, se encuentran por debajo de los registrados en leche de cabra cruda para el biotipo Saanen en la región de Valle de Lerma (promedio: RAM 6,11 log ufc/mL, CT 5,5 log ufc/mL y CCS 5,59 – 6,4 log cél/mL) (Chavez y col., 2009, Suarez y col., 2012) y en otros países como Brasil (Oliveira y col. 2011), Grecia y Portugal (Morgan y col., 2003; Kondyli y col., 2012), y Líbano (Tabet y col., 2016). No existen diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en la caracterización microbiológica e higiénica entre los lotes.

Los parámetros de pH, acidez y lipólisis indicaron que las muestras estuvieron en muy buen estado al momento de ser utilizadas en la elaboración de quesos. Los valores de grasa y proteína superan el mínimo exigido por el CAA para leche destinada a ser consumida como tal o destinada a la elaboración de productos lácteos (3% y 2,8%

respectivamente). Los altos valores de RAM y CT, fueron indicadores a tener en cuenta en la posterior pasteurización de la leche.

En la Tabla 4.4.2 se puede observar el perfil proteico de la leche de cabra obtenidos por cada lote.

La proteína verdadera ( $PV=(NT-NNP) *6,38$ ) y proteínas de suero para los tres lotes mostraron valores menores que los reportados por Chavez y col. (2011) (3,1 y 0,73 respectivamente). Según Raynal-Ljutovac y col. (2008), para el biotipo Saanen el contenido total de caseína se encuentra entre 2,2 y 2,7 g%, rango en el cual se encuentran las leches en estudio, así mismo la caseína y la relación caseína/proteína total obtenidas fue similar a lo reportado por Chavez y col., (2011) para el mismo biotipo, esta relación es un indicador de la calidad de la leche, puesto que la caseína es la fracción proteica más importante desde el punto industrial (Gallardo y col., 1996). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los lotes en ninguno de los componentes analizados ( $P>0,05$ ).

**Tabla 4.4.2.** Perfil de los componentes proteicos de la leche de cabra utilizada en la elaboración de los quesos.

Parámetros (g/100 g)	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Proteína verdadera	2,71±0,06	2,80±0,06	2,71±0,05
Caseínas	2,18±0,02	2,34±0,02	2,34±0,02
Proteína de suero	0,52±0,04	0,49±0,05	0,46±0,05
Nitrógeno no proteico	0,05±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00
Caseína/Proteínas Totales	73,2±2,07	77,2±2,07	77,7±2,53

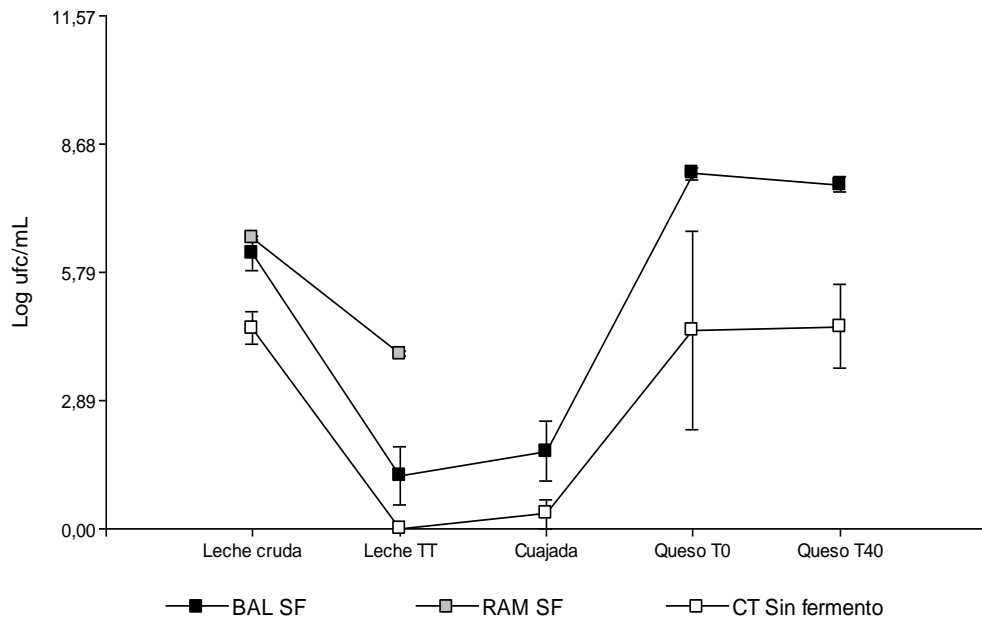
Proteína verdadera:  $PV=(NT-NNP) *6,38$

#### 4.4.2 Procesos de elaboración de quesos caprinos

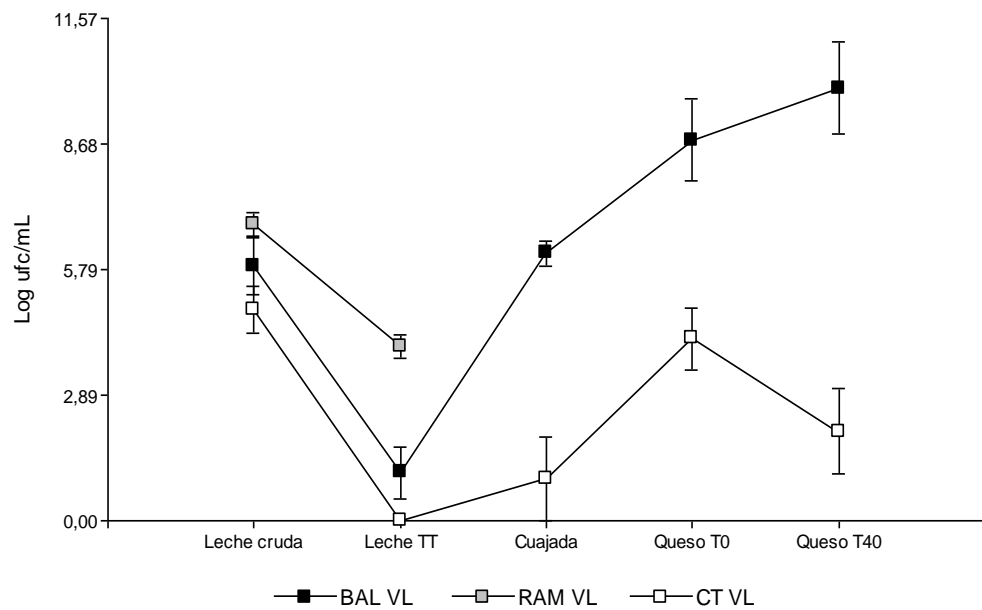
##### 4.4.2.1 Evolución de la microbiota durante el proceso de elaboración de los quesos

Se analizó la evolución de los grupos microbianos: bacterias lácticas (BAL), recuento de bacterias aerobias mesófilas (RAM) y coliformes totales CT), durante el proceso de elaboración de los quesos (leche cruda, leche tratada térmicamente, queso T0 y queso T40 días de maduración) en los tres tratamientos ensayados: SF, Amb y VL (Figura 4.4.1, 4.4.2 y 4.4.3).

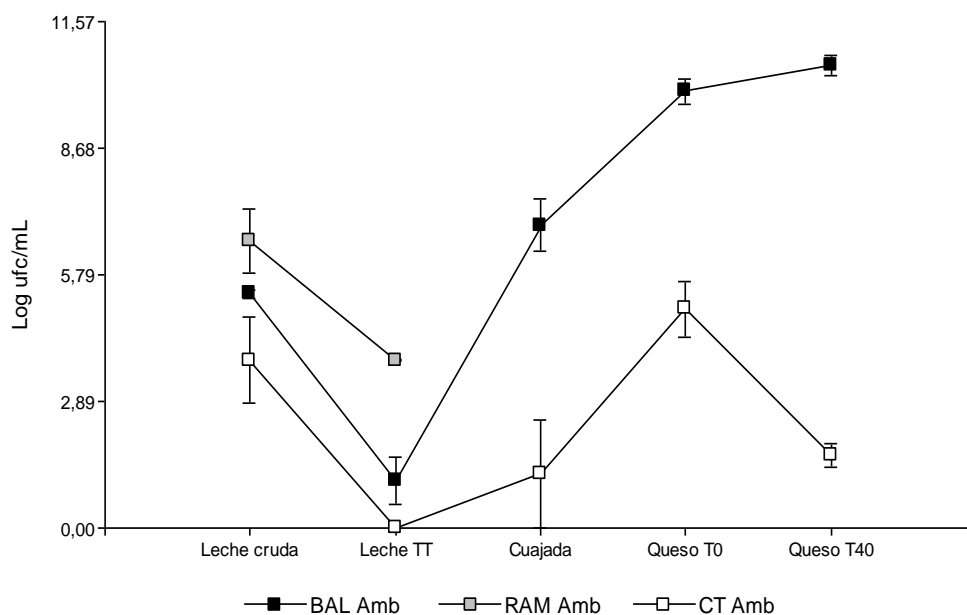
Los valores promedio de BAL, RAM, y CT fueron altos en la leche cruda utilizada para las elaboraciones de los quesos en los tres tratamientos: **SF**: quesos elaborados sin fermento, **Amb**: quesos elaborados con fermento Valle de Amblayo y **VL**: quesos elaborados con fermento Valle de Lerma.



**Figura 4.4.1.** Cambios de la microbiota (BAL, RAM y CT) durante el proceso de elaboración y maduración de quesos sin fermento (medias y desvíos estándar).



**Figura 4.4.2.** Cambios de la microbiota (BAL, RAM y CT) durante el proceso de elaboración y maduración de quesos con fermento Valle de Lerma (medias y desvíos estándar).



**Figura 4.4.3.** Cambios de la microbiota (BAL, RAM y CT) durante el proceso de elaboración y maduración de quesos con fermento Valle de Amblayo (medias y desvíos estándar).

El tratamiento térmico aplicado a la leche fue efectivo, ya que los valores de RAM disminuyeron en los tres ensayos en un rango de 2,60-2,80 log ufc/mL, así mismo no se observó microorganismos pertenecientes al grupo de CT en la leche tratada térmicamente (Leche TT) asegurando de esta manera su inocuidad. La concentración de la microbiota láctica presente en la leche cruda fue alta, no obstante, fueron sensibles al tratamiento térmico disminuyendo su población entre 4,2 y 5,0 log ufc/mL.

En la etapa de formación de cuajada, incrementaron los CT (en promedio 1,2 log ufc/g) en los tres ensayos. Si bien se observa un mayor incremento de los mismos en los ensayos con fermento, no se verificaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Este resultado estadístico se atribuye a la dispersión de CT en los ensayos con fermento (Amb  $\pm 2,1$  y VL  $\pm 1,7$ ). En virtud a la dispersión verificada esta etapa merece especial atención en termino de la gestión de la inocuidad, particularmente cuando se agrega el fermento. Las poblaciones de BAL, en el tratamiento SF aumentaron en el orden de 0,5 log ufc/mL, mientras que en los tratamientos Amb y VL, aumentaron en el orden de 6 log ufc/g, sobre todo por la incorporación del fermento.

Entre los controles de CT en cuajada y los de T0, el valor de los mismos se incrementó en promedio 4 log ufc/g, en consecuencia, es posible pensar que las condiciones de tiempo y temperatura (18 h a temperaturas entre 25 y 15°C) durante el

prensado, propiciaron el crecimiento de los CT ya presentes durante la etapa de cuajada.

En el tratamiento SF se observó mucha variabilidad de esta población; resultados obtenidos por Alegría y col. (2009), mostraron que es la población de microorganismos más variable en quesos caprinos; lo que podría suponer que los fermentos incorporados a los tratamientos Amb y VL equilibraron el crecimiento de este grupo. En esta etapa, el crecimiento de BAL fue muy importante, sobre todo en los quesos SF cuyo valor promedio alcanzado fue de 8,0 log ufc/g aproximándose a los quesos inoculados VL (8,8 log ufc/g). En quesos elaborados con leche pasteurizada, las NSLAB (bacterias ácido lácticas no provenientes del fermento), son bacterias que contaminan la leche ya sea después de la pasteurización o bien que sobreviven al tratamiento térmico en baja proporción o en estado no cultivable (Turner y col., 1986). Zalazar y col. (2006), informaron que en los quesos las NSLAB, parten desde un número muy bajo al inicio de la maduración y van aumentando a medida que encuentran condiciones favorables para su desarrollo, alcanzando altas concentraciones ( $10^7$  ufc/g) según el tipo de queso. Asimismo, Hynes y col. (2006), señalaron a la lactosa residual que queda en la cuajada como el primer sustrato de las NSLAB, que provee la energía necesaria para su crecimiento inicial. Asimismo, algunos autores señalan que cuando los cultivos iniciadores de BAL mixtos están ausentes o son insuficientes para controlar su crecimiento, entonces los enterococos pueden alcanzar de 7 a 8 unidades de registro en el interior de quesos maduros (Domingos-Lopes y col., 2017; Fuka y col., 2017; Vandera y col., 2018) En los quesos Amb y VL a T<sub>0</sub>, aumentaron su población de BAL entre 3,1 y 2,6 log ufc/g, alcanzando un crecimiento de 9, 9 y 8,8 log ufc/g respectivamente, en estos se destacó una buena actividad del cultivo inoculado en el período de fermentación, evidente a partir de los cambios sucedidos en el valor del pH (Figura 4.6). Almeida Junior y col. (2015), observaron similar comportamiento en la población de BAL; estos autores, en ensayo de elaboración de queso caprino realizado con y sin fermento, observaron en quesos T<sub>0</sub> sin inocular, una población NSLAB de  $10^7$  ufc/mL, mientras que en el queso inoculado, la población de BAL en el mismo período, alcanzó valores de  $10^9$  ufc/g.

A los 40 días de maduración, la población de CT se mantuvo constante en los quesos SF, mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), con respecto

a los quesos Amb y VL, en los cuales los CT disminuyeron en un orden de 3 y 2 log ufc/g respectivamente, encontrándose de esta manera dentro de los límites exigidos por el CAA para CT (entre 200 y 1000 ufc/g, equivalente a 2 y 3 log ufc/g, en quesos con humedad hasta 35,9%). Caridi y col. (2003), sugieren que la reducción de coliformes y *E. coli*, observada durante la maduración de quesos, podría ser causada por cepas BAL altamente competitivas que son capaces de prevalecer durante la maduración. En esta tesis, los fermentos utilizados en la elaboración de quesos inhibieron el crecimiento de coliformes, evidenciando un control antimicrobiano ejercido por las cepas seleccionadas. La producción de enterocinas, es una característica importante del género *Enterococcus* (Franz y col., 2007), que resultan en la inhibición de ciertos patógenos durante el período de fermentación y maduración del queso (Giraffa 2003). Ispirili y col. (2017), demostraron que cepas como *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. italicus* y *E. gallinarum* en queso blanco turco, eran eficaces para la inhibición de los patógenos transmitidos por los alimentos. Asimismo, Cocolin y col. (2007), demostraron que cepas de *Enterococcus*, aisladas en leche de cabra, tenían una alta capacidad para producir metabolitos como bacteriocinas. Por otro lado, Oliszewski y col. (2013), en queso caprino elaborado con *E. faecium* como cultivo iniciador, no observaron variaciones significativas en CT con el periodo de maduración.

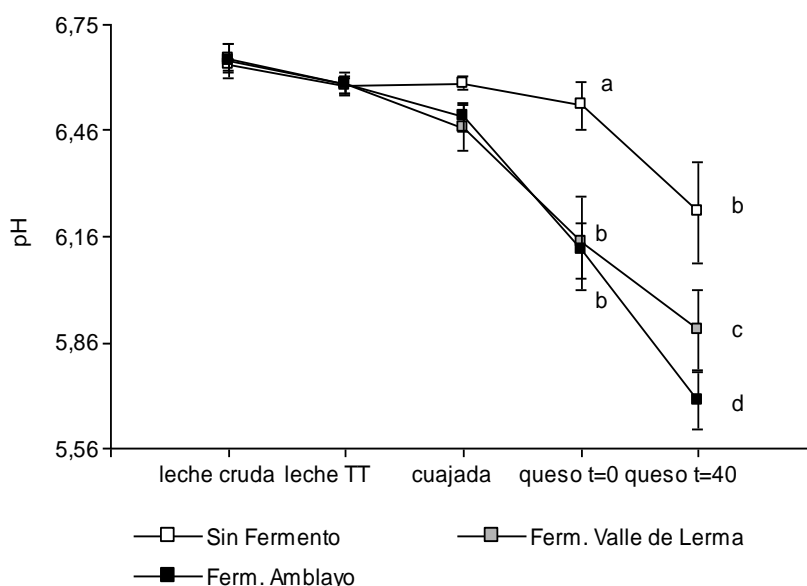
Es interesante destacar que una de las cepas que constituía el fermento Amb, demostró tener propiedades antimicrobianas frente a *Bacillus cereus*. La adición de un fermento que inhiba el crecimiento de microorganismos no deseados es beneficioso, sin embargo, la presencia de estos organismos contaminantes, impulsó una mayor atención en las prácticas de higiene durante los procedimientos de elaboración de los quesos.

Según algunos autores (Hynes y col., 2006; Zalazar y col., 2006), las bacterias lácticas NSLAB pueden crecer, sobrevivir e incluso ser dominantes durante el proceso de maduración del queso. Esto depende de los microorganismos, de su potencial metabólico y la expresión de ese potencial. El queso constituye un medioambiente hostil para el desarrollo bacteriano, sin embargo, en esas condiciones la población de las NSLAB incrementa desde valores muy reducidos hasta números elevados y se mantienen durante tiempos de maduración prolongados. En esta tesis, los valores de BAL en los quesos SF, se mantuvieron constantes durante maduración, diferenciándose estadísticamente de los quesos con fermento, en los cuales continuaron creciendo,

incrementando una unidad logarítmica a los 40 días. Almeida Junior (2015), reportó resultados similares en quesos de cabra inoculados con fermentos de BAL a los 20 días de maduración.

#### 4.4.2.2 Cambios del pH durante el proceso de elaboración de quesos caprinos

La variación de pH durante el proceso de elaboración de los quesos, según los diferentes tratamientos, se puede observar en la Figura 4.4.4. Este parámetro es relevante al momento de condicionar características texturales del queso, microbiología y barrera para inocuidad.



**Figura 4.4.4.** Cambios de pH durante el proceso de elaboración de los quesos Sin Fermento, con Fermento Valle de Amblayo y Fermento Valle de Lerma (medias y desvíos estándar).

Al comenzar la elaboración de los quesos, la leche cruda utilizada en todos los tratamientos mostró un pH similar (entre 6,64-6,66), después del tratamiento térmico, este disminuyó levemente en un rango de 0,6-0,7. Las variaciones de pH entre los diferentes tratamientos, comenzaron a ser más evidentes a partir de la cuajada. Las cuajadas obtenidas de los tratamientos Amb y VL, mostraron una disminución de pH mayor (2,4-3% respectivamente) que las cuajadas del tratamiento SF (0,75%), esto posiblemente por la formación del ácido láctico proveniente de la actividad del fermento. Las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos se

observaron a partir de los quesos sin madurar (T0), donde los fermentos Amb y VL, mostraron capacidad de acidificación, disminuyendo el pH de los quesos en 0,4 y 0,3 unidades respectivamente; mientras que en los quesos SF, la variación de pH fue de 0,06 unidades.

A los 40 días de maduración los quesos SF, alcanzaron en promedio un pH de 6,22, diferenciándose estadísticamente de los quesos Amb y VL que alcanzaron un pH promedio de 5,72 y 5,89 respectivamente. Tabet y col. (2016), no observaron diferencias de pH durante el periodo de maduración en quesos caprinos elaborados con cultivos de *Lactobacillus* y *Streptococcus lactis* (T0=5,22 y T60=5,34), asimismo, Gonzáles y Zárata (2012) en quesos caprinos inoculados con cultivo comercial y autóctonos, obtuvieron valores de pH que oscilaron entre 5,18 y 5,27 a tiempo inicial, y 5,32 y 5,29 a los 60 días de maduración. Por otro lado, Chavez y McSweeney (2009), obtuvieron valores de pH a 5,8 (tiempo inicial) y 5,57 a 60 días de maduración en quesos caprinos en quesos caprinos inoculados con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

Las propiedades tecnológicas del fermento inoculado responden a las de un adjunto (Capítulo 3), sin embargo, las cepas utilizadas contribuyeron a la disminución del pH. Linch y col. (1997), encontraron valores de pH menores en los quesos que contenían lactobacilos como cultivos adjuntos, debido a la producción de ácido láctico consecuencia del metabolismo de la lactosa residual. De esta manera, el efecto sinérgico entre las diferentes cepas que componen el fermento, como el consumo de la lactosa residual por los microorganismos, podrían explicar las diferencias en los valores de pH encontrados en el presente estudio.

Asimismo, asociando el pH a la detección de los coliformes en queso, Fox y col. (2004) informaron que los coliformes y otros patógenos son inhibidos a  $\text{pH} < 5$ . Estas observaciones son consistentes con los resultados obtenidos por Manolopoulou y col. (2003), quienes informaron haber detectado la muerte de *E. coli* y otros coliformes en queso estilo feta con  $\text{pH} < 5,0$ . Otros estudios demostraron un buen crecimiento de 10 diferentes cepas de coliformes (que representan *Hafnia*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Escherichia*) en queso con pH entre 5,2 y 5,3 (Morales y col., 2003). En la presente tesis, se pudo observar que el pH no tuvo incidencia en la inhibición de estos microorganismos, puesto que el menor valor alcanzado de pH fue 5,72 por Amb.



La conservación de los quesos se logra en gran medida mediante el control del pH y la actividad del agua, y como se mencionó anteriormente, otro parámetro intrínseco que pueden afectar el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos, es la presencia de antimicrobianos (Beresford y Williams, 2004). Estas propiedades en el queso, constituyen un sistema de "obstáculos" que actúan en la inhibición del crecimiento de microorganismos perjudiciales (Martin y col., 2016). En esta tesis la reducción de coliformes observada pudo haber sido ejercida por este último parámetro.

#### 4.4.3 Caracterización de los quesos de cabra

##### 4.4.3.1 Caracterización fisicoquímica y composición global de los quesos

Se analizó la composición global y la calidad fisicoquímica de los quesos elaborados con y sin fermento, así como la evolución de estos parámetros producido por la maduración de los quesos (Tabla 4.4.3).

**Tabla 4.4.3.** Características fisicoquímicas de los quesos caprinos elaborados con y sin fermento durante maduración.

Características Físico-Químicas	Quesos					
	Sin Fermento		Valle de Lerma		Valle de Amblayo	
	T0	T40	T0	T40	T0	T40
<b>pH</b>	6,50±0,09 a	6,09±0,1b	6,05±0,13b	5,89±0,18c	6,09±0,14b	5,72±0,12d
<b>Humedad (%)</b>	48,7±0,78 a	30,9±1,99b	47,8±0,96a	26,5±1,14c	48,5±0,26a	27,7±1,88d
<b>Proteínas (%)</b>	19,9±1,08 cd	24,7±1,17b	19,2±1,54d	26,3±0,77a	20,0±0,95c	26,4±0,71a
<b>Grasa (%)</b>	24,7±1,75 c	32,9±1,12b	24,9±1,46c	36,0±3,08a	24,9±1,29c	35,8±1,82a
<b>ClNa (%)</b>	1,12±0,19 a	1,57±0,13b	1,05±0,06a	1,84±0,02c	1,06±1,06a	1,83±0,22c
<b>G/P</b>	1,2		1,3		1,2	
<b>S/Hº</b>	2,3±0,36 a	5,3±2,01b	2,3±0,86a	6,9±0,35c	2,21±0,89a	6,5±3,54c

Nota: Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (valor  $p < 0,05$ ) entre columnas.

Los quesos sin madurar, indistintamente del tratamiento, no mostraron diferencias significativas en el contenido de humedad, sal, grasa y la relación sal/humedad. El pH, como se explicó anteriormente, difiere estadísticamente entre los quesos sin fermento y con fermento, el contenido de proteínas muestra ser levemente

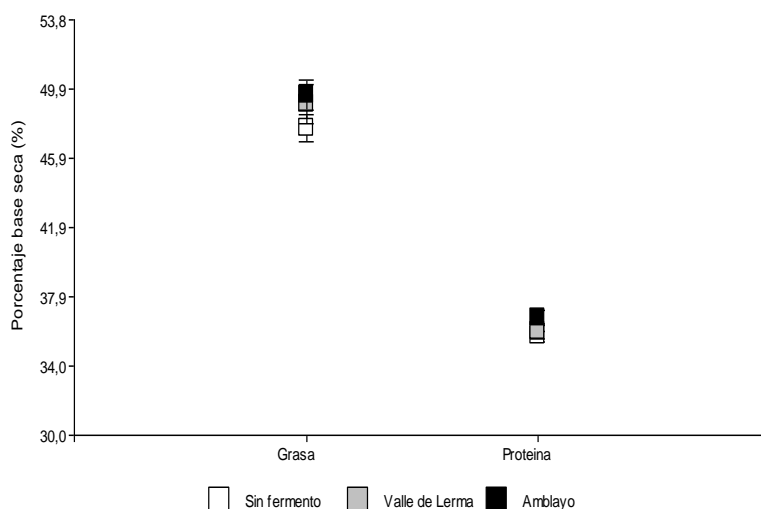
menor en los quesos elaborados con fermento de Valle de Lerma, no obstante, el contenido de humedad, grasa y proteínas fue acorde a los resultados de quesos elaborados con similar tecnología (Chavez y McSweeney, 2009; Miloradovic y col., 2017, González y Zárate, 2012).

La inoculación de los fermentos, no tuvo incidencia en el rendimiento quesero (SF: 12,7%, Amb 13% y VL 13,05%) ( $p > 0,05$ ). Almeida Junior y col. (2015), obtuvieron valores similares entre quesos caprinos inoculados y sin inocular. Hayaloglu y col. (2013), obtuvieron valores de rendimiento de queso comprendidos entre 13,87% - 18,89%, las diferencias que, de acuerdo a estos autores, se deben más al biotipo caprino que a al cultivo inoculado.

Hacia los 40 días de maduración, el pH alcanzado por los quesos Amb y VL es similar al obtenido por Chavez y Mc Sweeney (2009) a los 30 días de maduración. La humedad promedio de los quesos disminuyó hasta alcanzar un valor entre el 26 y 30%. Gámbaro y col. (2017), analizó la humedad en diferentes quesos de origen caprino, encontrando que puede variar entre 28 y 55% (dependiendo de los días y la temperatura de maduración). Los quesos elaborados en este estudio mostraron una pérdida de humedad similar a la de los quesos con más de 60 días de maduración (Bontini y col., 2008). Dos posibles causas se identificaron: la temperatura de elaboración puede haber sido baja para las características de la leche caprina, y la humedad relativa de la sala de maduración baja para el tamaño pequeño de los quesos, lo que aumentó considerablemente la superficie expuesta a la atmósfera y consecuentemente la pérdida de humedad. Así mismo, se observó que los quesos sin fermento, mostraron mayores valores de humedad durante maduración, diferenciándose estadísticamente de los quesos elaborados con fermento. De acuerdo con Eck (1990) y Stanley (1998), una menor acidificación retarda el desuerado, como se mencionó anteriormente los quesos sin fermento mostraron mayor valor promedio de pH, hecho que podría haber favorecido una mayor retención de humedad.

Los quesos elaborados con fermento mostraron menor contenido de proteínas, grasa y cloruros de sodio, observándose diferencias significativas con respecto al queso sin fermento, estimativamente estos valores están relacionados al contenido de humedad, puesto que, al referir los valores a peso seco, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 4.4.5). La relación grasa/proteína se

encuentra en la leche de cabra está entre 1,1 y 1,5 (Raynal-Ljutovac y col., 2008), rango también obtenidos en los lotes de leche utilizados en la elaboración de los quesos en estudio. Esta relación en los quesos T0 estuvo entre estos valores, lo que indicaría que durante su elaboración, la tecnología utilizada, no causó pérdida de grasa (Gambaro y col., 2017).



**Figura 4.4.5.** Contenido de grasa y proteína en base seca en los quesos elaborados a los 40 días de maduración.

En general los quesos elaborados presentaron un alto contenido de proteínas y grasa (Codex Alimentarius, 1978). Resultados similares fueron informados por varios autores (Chavez y McSweeney, 2009; Raynal-Ljutovac y col., 2011; Gonzalez y Zárate., 2012; Miloradovic y col., 2017; Gambaro y col., 2017), quienes obtuvieron en quesos caprinos de diferentes variedades, un rango en el contenido de proteínas entre 39 y 41% y en el contenido de grasa entre 45 y 51% (en extracto seco). En suma, los quesos elaborados en esta tesis, según el CAA, se clasifican en quesos de baja humedad (hasta 35,9%) y grasos (entre 45,0 y 59,9% en materia grasa del extracto seco) (Figura 4.4.5). También cumplen con los requisitos del mercado griego para los productos de primera calidad que es  $\leq 56\%$  de humedad y  $\geq 43\%$  de grasa en materia seca (Griego Codex Alimentarius, 2009 en Kondyli y col., 2016).

Nuestros resultados fortalecen la posición de los productos lácteos de cabra como buenos proveedores de proteínas de alta calidad, energía y grasa; similar a otros productos lácteos (Raynal-Ljutovac y col., 2008).

La relación sal y contenido de humedad (S/H<sup>o</sup>), aumentó durante la maduración debido a la pérdida de humedad. A los 40 días, los quesos con fermento mostraron una relación S/H<sup>o</sup> mayor que los quesos sin fermento, siendo las diferencias estadísticamente significativas. Esta relación en un queso, define la viabilidad del desarrollo de microorganismos y la cinética de las reacciones enzimáticas durante maduración (Guamis y col., 1997; en Kondili 2016), las que luego darán lugar a la generación de los compuestos implicados en el flavor de los quesos. Según Lawrence y col. (2004), la relación S/H<sup>o</sup> influye principalmente controlando la actividad del agua, que a su vez determina la tasa de crecimiento bacteriano y la actividad enzimática en el queso. Si el valor es bajo (<4,5%), los números de bacterias iniciadoras alcanzarán un valor alto en el queso y con esto aumenta la posibilidad de sabores desagradables. El bajo valor inicial de la relación S/H<sup>o</sup> en los quesos, puede ser una de las causas del incremento poblacional de BAL en los quesos SF (Figura 4.4.1). Lawrence y Gilles (1980 y 1982) informaron que para controlar estas poblaciones los fabricantes de queso Cheddar tratan de mantener la relación S/H<sup>o</sup> entre 4,5 y 5,5%, valor alcanzado en los quesos SF y superado en los quesos con fermento a los 40 días de maduración.

#### **4.4.4 Procesos asociados a la maduración de quesos**

##### **4.4.4.1 Proteólisis**

La proteólisis determina el desarrollo de textura y sabor en el queso. La tecnología de fabricación de queso, especialmente con respecto al pretratamiento de la leche, cocción de cuajada, desuerado y curva de pH, afecta principalmente la proteólisis primaria (Grufferty y Fox, 1988; Hynes y col., 1999; Bansal, Fox y McSweeney, 2007), mientras que la proteólisis secundaria y la formación del sabor son principalmente mediados por bacterias lácticas en el queso (Sousa y col., 2001).

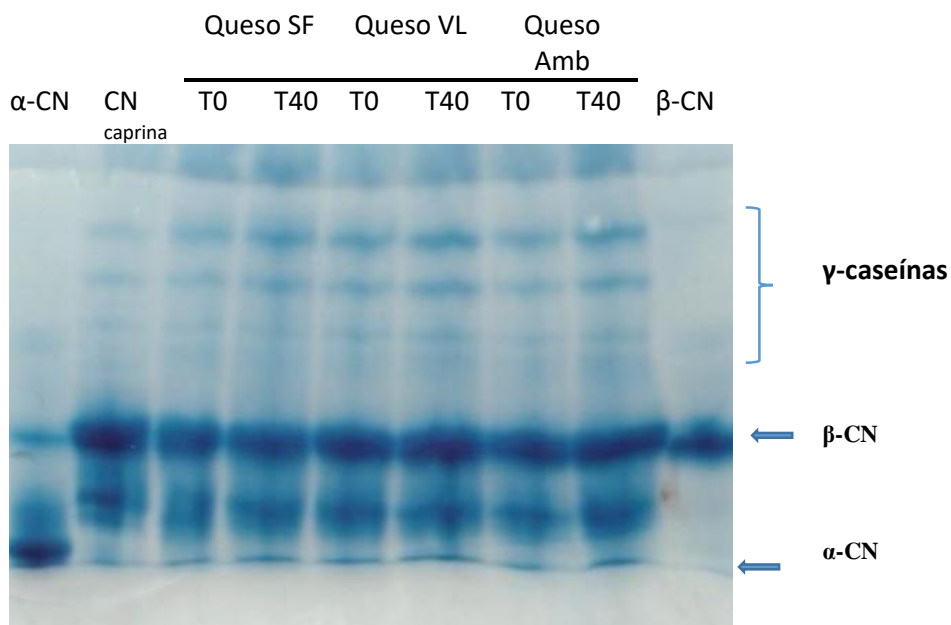
La proteólisis primaria en el queso se puede definir como aquellos cambios en las caseínas (CN;  $\alpha$ 1-CN,  $\alpha$ 2-CN,  $\beta$ -CN y  $\gamma$ -CN) y péptidos, que pueden detectarse por métodos de electroforesis (Fox, 1989), cuyos electroforegramas muestran la separación de las proteínas (fracción insoluble a pH 4,6) en el queso durante la maduración.

Para medir los productos de proteólisis secundaria, es decir proteínas, péptidos y aminoácidos que son solubles en la fase acuosa de queso y extraíble con agua (Fox, 1989), se considera el fraccionamiento de los componentes del nitrógeno (NS-pH 4,6, NS-TCA y NS-PTA), y perfiles de péptidos HPLC (Trujillo y col., 2012).

### Proteólisis primaria

#### Análisis electroforético por urea-PAGE

La degradación de proteínas, particularmente caseínas, fue evaluada por urea-Page, esta es una buena herramienta para analizar proteólisis especialmente durante las primeras etapas de la maduración del queso (Mc Sweeney, 2004), a través de esta metodología fue posible identificar y cuantificar las tres fracciones de caseína mayoritarias con diferentes movilidades electroforéticas (Figura 4.4.6.). Es importante recordar que se utilizó  $\alpha$ -s caseína bovina, incluyendo en este estándar todo el grupo de caseínas  $\alpha$  (ver dispersión en el gel); en igual sentido se tomó caseína  $\beta$ ; además, se utilizó como indicador las CN aisladas de leche caprina.



**Figura 4.4.6.** Electroforegrama de quesos caprinos elaborados sin fermento (SF), con fermento VL y Fermento Amb. Los números indican días de maduración.  $\alpha$ -CN y  $\beta$ : marcadores bovinos. CN: caseinas

Las proporciones de  $\alpha$  caseínas son menores en leches caprinas que en bovinas, fenómeno que se verificó cuando estas resultaron posicionarse en la parte inferior del gel; mientras que las caprinas se ubicaron antes. Las  $\beta$  caseínas de ambas especies son similares (Kalantzopoulos, 1992), comportamiento verificado en el gel. El marcador de caseínas caprinas utilizado (CN caprinas), como se mencionó anteriormente, fue obtenidos a partir de leche de cabra (contiene todas las caseínas), por lo que se puede observar la correspondencia entre las bandas de leche y queso caprino. Este resultado permite entender que durante maduración del queso, estas proteínas mayoritarias, no sufrieron grandes cambios en su concentración, respecto del perfil en leche.

En la Tabla 4.4.4, se observan los valores de densidad óptica integrada (DOI) para las fracciones analizadas, cuantificación considerada importante para complementar la figura 4.8. En esta tabla, valores de DOI /DOIi menores a 1 indican una disminución y valores mayores que 1 indican un aumento en cada fracción respecto del valor inicial. Entonces durante maduración, es posible concluir que la degradación de las fracciones de  $\alpha$  y  $\beta$  caseínas fue leve. La disminución de estas fracciones de caseína a los quesos a los 40 días de maduración, no fue afectada de forma estadísticamente significativa por la incorporación de los fermentos, puesto que los quesos SF, VL y Amb mostraron valores similares en la relación DOI/DOIi de  $\alpha$  y  $\beta$  caseínas.

**Tabla 4.4.4.** Densidad óptica integrada referidos a sus valores iniciales (DOI /DOIi) para las fracciones analizadas por urea-PAGE en los tres tipos de quesos caprinos, a los 40 días de maduración.

Tratamiento	$\alpha$ -caseína	$\beta$ -caseína	$\gamma$ -caseína
Sin Fermento	0,89 $\pm$ 0,04	0,90 $\pm$ 0,10	1,27 $\pm$ 0,35
Valle de Lerma	0,90 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,10	1,20 $\pm$ 0,23
V. de Amblayo	0,90 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,12	1,02 $\pm$ 0,06

Los datos representan los valores de las medias  $\pm$  desvío estándar.

También se observó la presencia de  $\gamma$ -caseína, si bien ésta fracción ya se pudo visualizar en la leche (CN caprina), su presencia en el queso durante maduración, indica la actividad de la plasmina (enzima presente en la leche que no se inactiva con la pasteurización) en esta matriz. La plasmina, es la principal responsable de la hidrólisis

de la  $\beta$ -caseína (Fox y McSweeney, 1996; Fox y Cogan 2004), consecuentemente la disminución de la  $\beta$ -caseína resultó en un aumento en las  $\gamma$ -caseínas a T40.

### Proteólisis secundaria

#### - Fraccionamiento del nitrógeno

El grado de proteólisis en quesos durante la maduración, se controló midiendo los niveles de nitrógeno soluble en agua (NSA), e identificados como índice de maduración de los quesos (IM), el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% (NS - TCA, identificado como F1) y en ácido fosfotúngstico al 5% (NS - APT, identificada como F2), los resultados se muestran en la Tabla 4.4.5.

**Tabla 4.4.5.** Evolución del fraccionamiento del nitrógeno de los quesos caprinos con y sin fermento durante maduración.

Variable	Maduración (días)	Quesos		
		Sin Fermento	Valle de Lerma	V. de Amblayo
NT (%) base húmeda	T0	3,08±0,19	3,03±0,28	3,17±0,14
	T40	3,93±0,18a	4,13±0,12b	4,16±0,11b
<b>IM</b> NSA pH 4,6 %NT	T0	5,40±0,62 a	5,07±sd ab	4,19±0,10 b
	T40	7,99±0,89 a	5,09±0,09 b	5,18±0,62 b
<b>F1</b> TCA 12%/NT(%)	T0	1,95±0,48	1,63±sd	1,96±0,78
	T40	2,92±0,36	2,17±0,01	2,59±0,92
<b>F2</b> PTA/NT (%)	T0	0,67±0,01	0,77±0,09	0,76±0,29
	T40	0,81±0,06	1,06±0,01	1,23±0,22

Los datos representan los valores de las medias  $\pm$  sus desvíos estándar.

Los valores de Nitrogeno total (NT), nitrógeno soluble (NS), nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (NS-TCA), nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico (NS-APT), están expresados como porcentaje de nitrógeno total.

Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre columnas para la misma determinación y tiempo de maduración.

EL valor del nitrógeno total (medido en base húmeda), fue mayor a los 40 días de maduración debido a la pérdida de humedad durante este período.

Las fracciones IM, F1 y F2, aumentaron durante la maduración. En esta experiencia, se observaron los valores más altos de la fracción IM en los quesos SF mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto a los quesos Amb y VL. Las fracciones F1 y F2 fueron similares en los tres tratamientos. Los resultados obtenidos sugieren una proteólisis baja en todos los quesos durante la maduración.

El mayor nivel de proteólisis producido en quesos SF, dado por el IM, podría explicarse por la acción del coagulante residual (quimosina). El coagulante residual, su retención y actividad en el queso, y la consiguiente hidrólisis de la  $\alpha$  caseína, depende de la tecnología; factores como el pH en el drenaje, la temperatura de cocción o la humedad del queso (Gaiaschi y col., 2000; Jacob y col., 2010). En sistema modelo se mostró que la degradación de la caseína por cuajo se produce a valores de pH inferiores a 5,8 (Ardo y col., 2017). Asimismo, Børsting y col. (2014), demostraron en sistema modelo similar, que la retención de la quimosina bovina aumenta casi linealmente del 2% al 20% cuando el pH disminuye de 6,65 a 6,00. En esta tesis se observó que en los quesos SF, el pH disminuyó de 6,50 a 6,09 a los 40 días de maduración, mientras que los quesos elaborados con fermento, alcanzaron valores de pH inferiores a 5,8.

El nivel de humedad también tiene un efecto importante en la tasa de proteólisis, cuanto mayor es la humedad, más rápida es la velocidad de hidrólisis de proteínas. Los quesos SF perdieron menor humedad durante la maduración, pudiendo haber retenido más quimosina y consecuentemente haber tenido mayor proteólisis.

Además, la humedad y la relación S/H<sup>o</sup>, puede influir en la medida en que la microbiota iniciadora y secundaria crece, se lisa y produce enzimas relacionadas con la proteólisis (Grappin y Beuvier, 1997). Estos parámetros físicos químicos también determinan la tasa de crecimiento bacteriano y la actividad de la enzima en el queso, específicamente la actividad proteolítica de la quimosina (Fox y Walley, 1971; Pearce, 1982; Fox, 1987), plasmina (Richardson y Pearce, 1981) y proteasas iniciales (Milesi, 2008). En este estudio, los quesos SF presentaron valores de S/H<sup>o</sup> de 5,3 %; como se mencionó anteriormente, los queseros normalmente apuntan a un valor S/H en queso Cheddar entre 4,5 y 5,5% (Lawrence y Gilles, 1980, 1982). En los quesos elaborados con fermento, la relación S/H<sup>o</sup> supera los 6,5%. Al igual que el contenido de sal, no existe una normativa que ajuste el rango de S/H<sup>o</sup> en el queso, siendo muy variable el valor

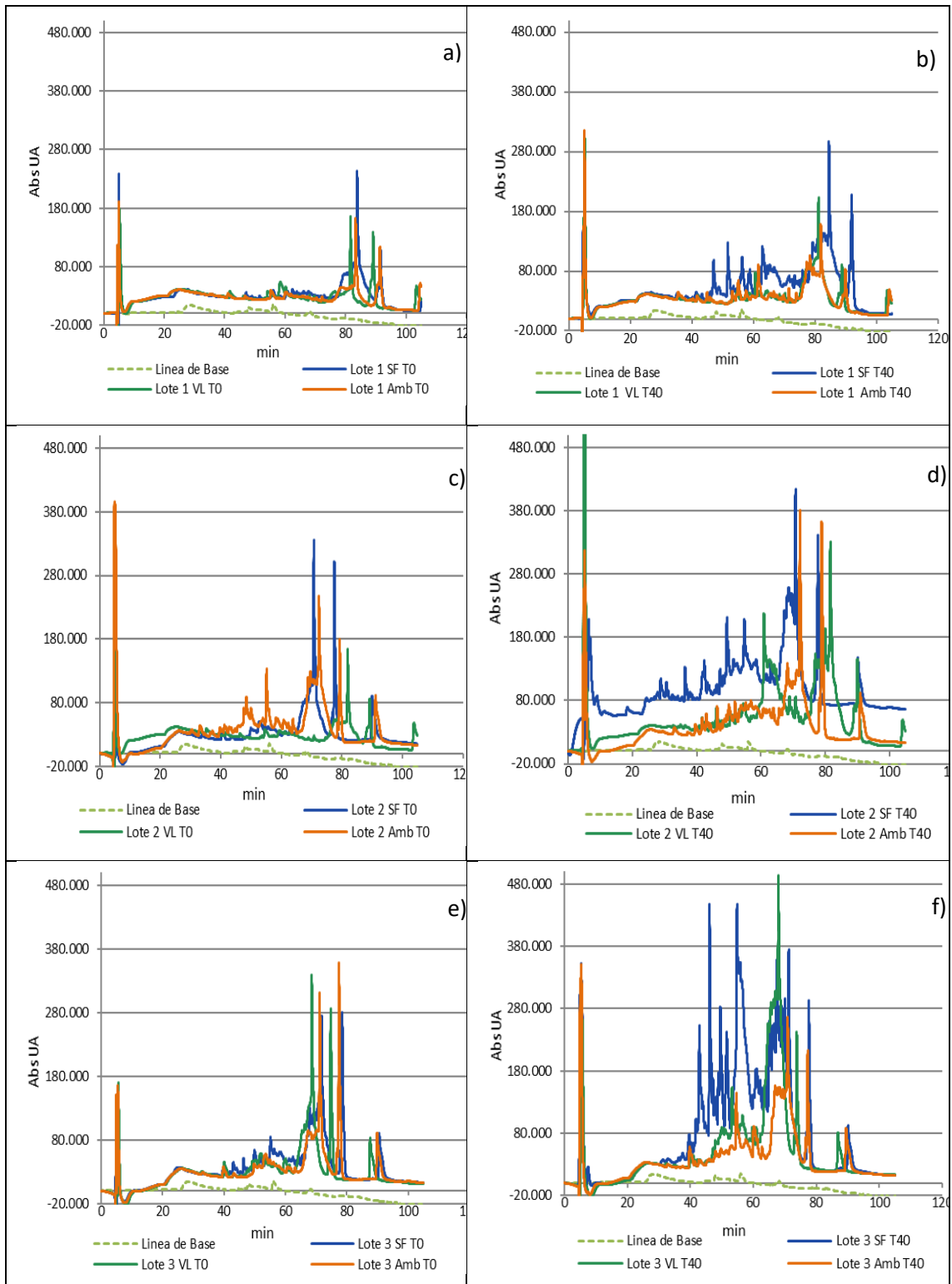


según las características del queso que se desee elaborar. Sin embargo, la FAO (1986), indica para quesos semiduros un contenido normal de S/H<sup>º</sup> entre 0,8 y 2,9%.

Si bien las diferencias no fueron significativas, los valores de la fracción F2, fueron más altos en los quesos elaborados con fermento láctico, sobre todo en los elaborados con fermento Amb. Valores similares obtuvo Hayaloglu y col. (2013) en quesos de cabra inoculados con cultivos mesófilos a los 30 días de maduración, de acuerdo a este autor la fracción F2 (NS-APT) indica niveles de mono, di y tri-péptidos, péptidos de bajo peso molecular y niveles de aminoácidos libres (Hayaloglu y col., 2005). La mayoría de estos compuestos se producen por la acción de peptidasas de cultivo iniciador (Visser, 1977; Fox et al., 1995). Los aminoácidos libres y los péptidos pequeños pueden impartir notas de sabor amargo, pero son mucho más relevantes como precursores del sabor a través del catabolismo de aminoácidos, una transformación también causada por la microbiota láctica, que puede conducir al 50% de compuestos de flavor en el queso (Upadhyay y col., 2004; Yvon, 2006). Según algunos autores el nivel de la fracción F3, puede ser un indicador confiable del desarrollo del sabor, por encima de ciertos límites (Lawrence y col., 2004).

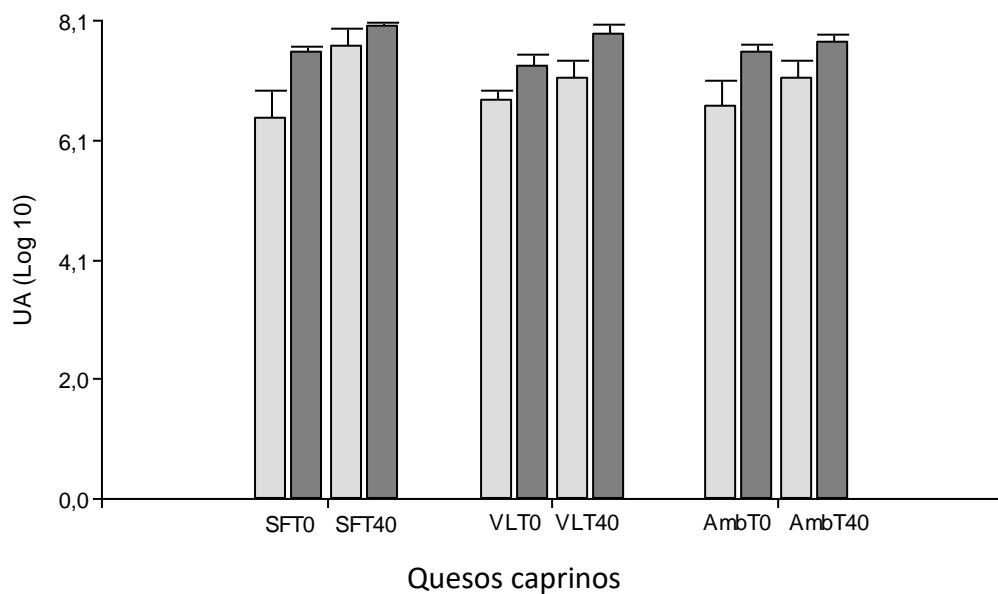
#### Análisis de péptidos por RP-HPLC

En la Figura 4.4.7 se puede visualizar los cromatogramas de RP HPLC obtenidos a partir de los quesos SF, VL y Amb. Esta figura fue organizada según lote y tiempo de maduración. Es posible distinguir que para tiempo 0 de maduración (Fig.4.4.7 a, c,e), la mayoría de los compuestos eluyen a tiempos entre 60 y 80 min para los lotes 2 y 3, siendo diferente al lote 1; en todos los casos predominan compuestos hidrofóbicos. Los picos son mayores en los lotes 2 y 3, respecto del 1. Esto se debe fundamentalmente a la calidad de la leche cruda utilizada, a las condiciones de alimentación del rebaño. Estos picos quedan presentes en los cromatogramas a tiempo 40 (días) de maduración (Fig. 4.4.7 b, d, f), sumándose otros de menor concentración a tiempos de elusión más bajos (hidrofilicos). La magnitud de altura de pico fue utilizada para evaluar proteólisis, en efecto, mediante ANAVA se observó el efecto del tiempo de maduración, observándose diferencias estadísticamente significativas entre T0 y T40 días ( $p < 0,5$ ), resultado predecible, puesto que con el transcurso de la proteólisis se espera que los valores de las áreas sean más altos.



**Figura 4.4.7.** Cromatogramas RP-HPLC del extracto soluble en agua de quesos elaborados sin fermento (SF), con fermento Valle de Lerma (VL) y fermento Valle de Amblayo (Amb). A tiempo cero (T0 a, c, y e) y 40 días de maduración (T40 b, d y f). Elaborados con leche de cabra según lote 1, 2 y 3.

Continuando el análisis de la Figura 4.4.7, la Figura 4.4.8, muestra los valores las áreas cromatográficas totales, obtenidos a partir de la suma de los picos hidrofílicos (tiempo de elución entre 10 – 60 min, 1º tramo) e hidrofóbicos (tiempo de elución entre 60 y 100 min, 2º tramo), por cada tratamiento, a tiempo 0 y 40 días. Con la maduración, se observó un aumento de las áreas cromatográficas correspondiente a los picos hidrofílicos e hidrofóbicos, consecuencia del transcurso de la proteólisis. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $p>0,05$ ). Sin embargo, se visualizaron picos más altos en los quesos SF, resultados que coincidieron con el mayor IM obtenido (Tabla 4.4.5).



**Figura 4.4.8.** Picos hidrofílicos (entre 10 – 60 min, gris claro) y picos hidrofóbicos (60 – 100 min, gris oscuro), en quesos de cabra SF, VL y Amb, a tiempo cero (T0) y tiempo 40 días (T40). Unidades de área: UA

#### 4.4.4.2 Lipólisis

La bioquímica de la maduración del queso consiste en la modificación de diferentes metabolitos que provienen de la glucólisis, proteólisis y lipólisis conducida por la microbiota presente en la leche, por los microorganismos adicionados como cultivos iniciadores o adjuntos o enzimas propias de la leche.

En la lipólisis, los ácidos grasos libres (AGL) son liberados por las acciones de lipasas de diferentes fuentes (leche, pasta de cuajo, iniciador, bacterias no iniciadoras, lipasas exógenas) (Perotti y col., 2005). Los AGL contribuyen positivamente al sabor de queso, sobre todo cuando está debidamente equilibrado por los productos de proteólisis y otras reacciones catalizadas por enzimas, y son precursores de compuestos aromáticos más complejos (Atasoy y Turkoglu, 2009). Se determinó el **grado de lipólisis** como el total de ácidos grasos libres (AGLT) obtenidos, sumando las concentraciones individuales de cada AGL.

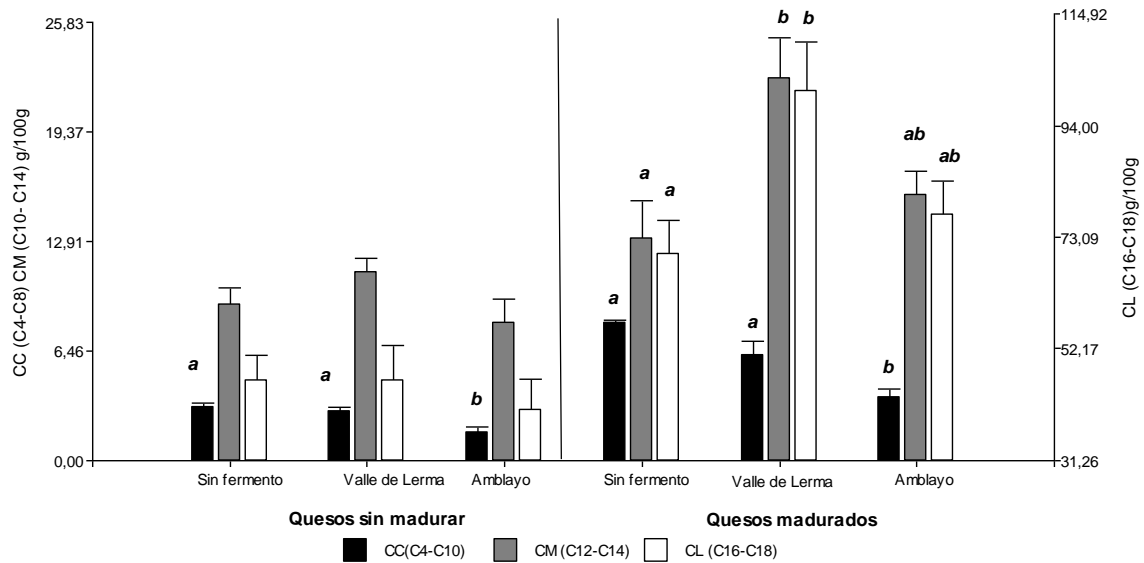
En la Tabla 4.4.6, se puede observar la composición de ácidos grasos libres en los quesos de cabra SF, VL y Amb a tiempo 0 y 40 días de maduración. También en esta tabla se expresan la concentración de los AGL de cadena corta (AGCC), AG de cadena media (AGCM), AG de cadena larga (AGCL) a lo largo del periodo de maduración; finalmente la concentración de AGL totales.

**Tabla 4.4.6.** Composición de ácidos grasos libres en los quesos de cabra elaborados sin fermento (SF), con fermento Valle de Lerma (VL) y con fermento Valle de Amblayo (Amb) durante maduración (40 días).

Ácidos Grasos libres		Quesos SF		Queso VL		Queso Amb	
(mg/100g)							
C4:0 butirico	T0	0,9±0,07	a	0,64 ±0,07	a	0,44 ±0,07	b
	T40	4,12±0,43	a	2,02 ±0,43	b	1,25 ±0,43	b
C6:0 caproico	T0	0,93±0,11		0,74±0,11		0,46 ±0,11	
	T40	1,57±0,22		1,74±0,22		0,96±0,22	
C8:0 caprílico	T0	1,31±0,13	a	1,48±0,13	a	0,78±0,13	b
	T40	2,44±0,26		2,48±0,26		1,48±0,26	
C10:0 cáprico	T0	3,76±0,55		4,62±0,55		3,17±0,55	
	T40	4,63±0,74	b	8,23±0,74	a	5,79±0,74	ab
Total de AGCC	T0	6,91±0,67	a	7,48±0,67	a	4,85±0,67	b
	T40	12,76±1,17	a	14,47±1,17	a	9,48±1,17	a
C12:0 láurico	T0	1,79±0,19		2,40±0,19		1,67±0,19	
	T40	3,39±0,43		4,24±0,43		2,99±0,43	
C14:0 mirístico	T0	3,59±0,47		4,04±0,47		3,29±0,47	
	T40	5,10±1,02	b	10,02±1,02	a	6,85±1,02	ab
Total de AGCM	T0	5,39±0,65		6,43±0,65		4,96±0,65	
	T40	8,49±1,36	b	14,24±1,36	a	9,84±1,36	ab
C16:0 palmítico	T0	18,15±2,19		17,89±2,19		17,10±2,19	
	T40	24,73±3,71	b	41,49±3,71	a	31,27±3,71	ab
C18:0 esteárico	T0	10,37±1,03		8,69±1,03		7,28±1,03	
	T40	12,77±1,50		17,80±1,50		15,62±1,50	
C18:1 oleico	T0	17,95±2,77		20,06±2,77		16,61±2,77	
	T40	33,09±3,42		42,57±3,42		31,22±3,42	
Total de AGCL	T0	46,47±5,86		46,64±5,86		40,99±5,86	
	T40	70,59±7,55	b	101,86±7,55	a	78,11±7,55	ab
AGL Totales	T0	58,77±7,0		60,55±7,0		50,80±7,0	
	T40	91,83±10	b	130,59±10	a	97,42±10	ab

Nota. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (valor  $p < 0,05$ ) entre columna, diferenciando tratamientos al mismo tiempo de maduración.

La figura 4.4.9, complementa el análisis de la tabla, en la misma se discrimina por tipo de cadena (corta, media y larga), teniendo un mejor acercamiento al comportamiento obtenido durante maduración



**Figura 4.4.9.** Ácidos grasos libres totales y variación de niveles de ácidos grasos de cadena corta (CC, barras negras C4-C10), cadena media (CM, barras grises C12-C14), y de cadena larga (CL, barras blancas C16-C18), en quesos sin madurar y madurados, elaborados: Sin fermento (SF), con Fermento Valle de Lerma (VL) y Fermento Valle de Amblayo (Amb).

Nota. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (valor  $p < 0,05$ ) entre columnas del mismo color para cada tiempo de maduración.

Los AGLT aumentaron entre un 36 y 54% a los 40 días, respecto al inicio de maduración, alcanzando valores promedio de 92, 97 y 130 mg /100 g de queso (SF, VL y Amb respectivamente). Comparando con otros quesos caprinos madurados en tiempos similares, la lipólisis fue baja. Poveda y Cabezas (2006), consideraron que 16 quesos de cabra de diferentes regiones de España, de 30 a 60 días de maduración, presentaron niveles bajos de lipólisis cuando la concentración de AGLT estuvo comprendida entre 239,7 y 664,4 mg /100 g de queso. En la bibliografía existe una amplia gama de valores informados sobre el contenido de ácidos grasos libres totales en quesos caprinos. Atasoy y Turkoglu (2009) reportaron valores de 72 y 99 mg/100 g a los 90 días de maduración, en quesos de cabra elaborados con leche pasteurizada y leche cruda respectivamente. Delgado y col., (2011) informaron para quesos Ibóres (leche cruda) de 60 días de maduración un valor de aproximadamente 670 mg/100 g. Por otro lado, se encontraron niveles de AGLT más altos para el queso Majorero artesanal 2400 mg/100 g después de 60 días de maduración y 1600 mg/100 g después de 150 días de maduración (Sheehan y col., 2009). En quesos caprinos elaborados con leche pasteurizada a los 30 días de maduración se observaron valores de 3926 mg/100 g de AGLT (Tabet y col., 2016), aunque en este caso los valores iniciales también fueron altos. Esta diferencia de valores

informados puede atribuirse a varios factores, entre los que están: el tipo de leche utilizada: cruda o pasteurizada, en efecto, la pasteurización de la leche de cabra durante el proceso de elaboración de los quesos inhibe las lipasas presentes en la leche y conduce a una disminución en la lipólisis en los quesos (Morgan y col., 2001, Atasoy y Turkoglu 2009); las actividades enzimáticas de los cultivos iniciadores y cultivos adjuntos y del coagulante; la tecnología utilizada para la fabricación del queso (a razón de la retención de agua y sal) y la duración del período de maduración del queso. Un antecedente valioso por tratarse de quesos artesanales del NOA, es Oliszewski y col., (2013) quienes informaron para quesos caprinos elaborados con leche pasteurizada e inoculados con cultivos adjuntos de *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Enterococcus faecium*, madurados durante 60 días, un rango de AGLT entre 120 y 220 mg/100 g, no encontrando diferencias significativas entre los quesos con inóculo y el control; situación similar a la obtenida en esta tesis.

La hidrólisis de los lípidos (triglicéridos) en el queso durante la maduración, puede ser catalizada por la lipasa indígena de la leche y/o por lipasas microbianas (Fox y col., 1990). En quesos elaborados con leche pasteurizada, la lipasa deriva de las bacterias de los cultivos iniciadores o adjuntos. En el presente estudio se puede observar la influencia en los quesos con fermento VL, los cuales condujeron a una mayor lipólisis (AGLT= 130 mg/100 g) mostrando diferencias significativas con respecto al queso sin fermento SF (AGLT= 92 mg/100 g). Sin embargo, el fermento Amb (AGLT=97 mg/100 g) generó lipólisis en menor medida, acercándose su avance al obtenido en quesos sin fermentos.

En quesos SF y VL sin madurar (T0), el contenido de AGCC fue mayor que en los quesos Amb, comportamiento que siguió siendo igual a T=40, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre SF y VL con respecto a Amb. Asimismo, los quesos VL mostraron un incremento importante de AGCM y AGCL a T=40, diferenciándose estadísticamente de los quesos SF.

Entre las BAL, los enterococos muestran actividad lipolítica significativamente mayor que la mayoría de otros géneros (Tsakalidou y col., 1994). Oliszewski y col. (2013) obtuvieron al final de la maduración en quesos experimentales elaborados con *E. faecium* como cultivo adjunto, valores más altos en % de AGCC ( $p < 0,05$ ) que sus respectivos quesos control, siendo los ácidos butíricos y caproicos los principales. El

aroma y sabor de los quesos maduros de leche de cabra, es característico y muy apreciado, detectándose la presencia de cantidades importantes de ácidos grasos de cadena corta, particularmente de los ácidos grasos caprílico y cáprico. En este estudio, para todos los quesos, entre los AGCC, el ácido cáprico fue en el que se detectó en mayor concentración, siendo éste, estadísticamente mayor en quesos VL que en quesos SF y Amb a los 40 días de maduración. La liberación de ácidos butírico fue importante en quesos SF, diferenciándose estadísticamente ( $p < 0,05$ ) de los quesos con fermento. Los ácidos caproico y caprílico no mostraron diferencias significativas entre los quesos. El ácido graso caproico, es el responsable de off flavor, generando sabores y aromas a orín de macho, en los casos estudiados el menor valor fue presentado por los quesos con fermento Amb.

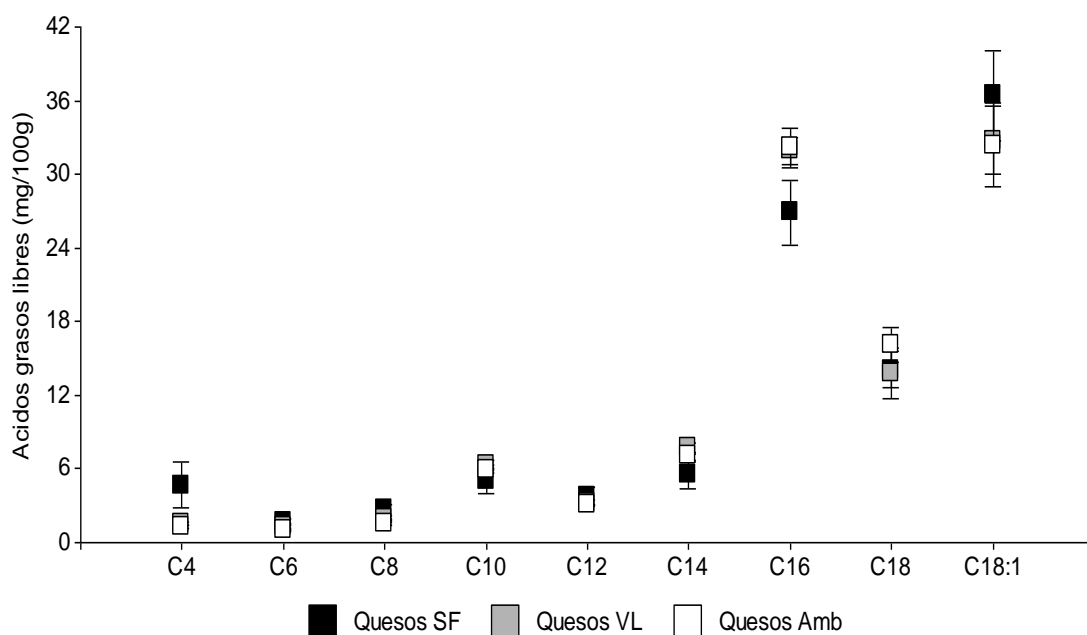
A pesar de la importancia cuantitativa de los AGCM y AGCL, no son los principales contribuyentes al sabor del queso (Freitas y Malcata, 1998). Sin embargo, se ha demostrado claramente que los AGCL pueden producir estímulos gustativos (Laugerette, 2005). El ácido mirístico fue el AGCM predominante en todos los quesos experimentales. Entre los AGCL, los ácidos palmítico, esteárico y oleico, fueron importantes en los quesos con fermento, en particular en los quesos elaborados con fermento VL.

En términos generales, los grados de avances de la lipólisis fueron mayores en los casos de quesos con fermentos, pero entre estos, los de Valle de Amblayo fueron los menores.

- *Perfil de ácidos grasos en quesos madurados*

En la Figura 4.4.10 se puede visualizar el perfil de ácidos grasos en quesos madurados.





**Figura 4.4.10.** Perfil de ácidos grasos en los quesos madurados, elaborados sin fermento, con fermento Valle de Lerma y con fermento Valle de Amblayo. Los valores representan las medias y desvíos

Los ácidos más abundantes para los tres tratamientos, fueron los de cadena larga (AGCL): oleico (C18: 1), palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0), representando juntos entre el 77 y 80% de los ácidos grasos totales (AGLT). En menor medida se detectaron los ácidos de cadena media (AGCM) representados por el ácido mirístico (C14:0) con valores de 5,6% en SF y superiores al 7% en VL y Amb. Entre los ácidos de cadena corta (AGCC) se destacó el ácido cáprico, (C10:0) con valores entre el 5 y el 6% en los tres tipos de queso y el ácido butírico (4,5%) en los quesos sin fermento. Un patrón similar fue informado por Poveda y Cabeza (2006), Sheehan y col. (2009), Oliszewski y col. (2013), El Galiou y col. (2015), en quesos de cabra.

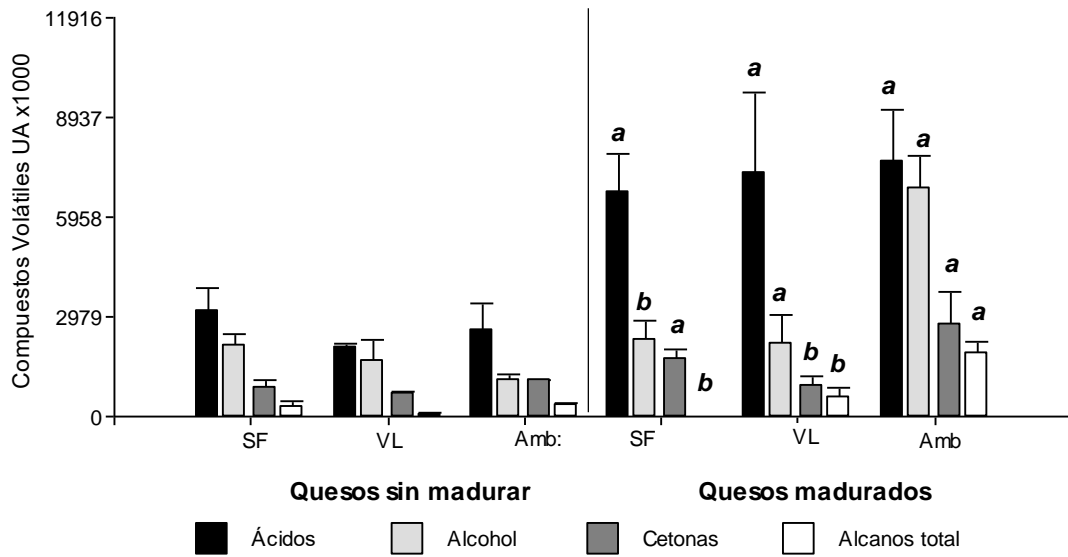
Los ácidos capróticos, caprílicos y cápricos, contribuyen de manera importante al sabor del queso de leche de cabra (Attaie y Richter, 1996). En los quesos de este ensayo el porcentaje de estos ácidos en su conjunto estuvo entre un 8,5 y 9,5% de los ácidos grasos totales. Valores más bajos obtuvo Atasoy y Turkoglu (2006), en quesos caprinos elaborados con cultivos mesófilos. Se detectó mayor concentración de estos ácidos en los quesos elaborados con fermento VL, mientras que los quesos elaborados con fermento Amb presentaron valores similares al control.

#### 4.4.4.4 Compuestos volátiles

Al realizar el análisis de compuestos volátiles por cromatografía gaseosa acoplada a masa en los quesos de cabra, se detectaron 54 compuestos, de los cuales: 8 fueron ácidos, 13 alcoholes, 4 cetonas, 9 alcanos, 9 ésteres, 7 aldehídos y 4 bencenos. En la tabla 4.4.11 se puede observar en detalle la composición de cada grupo de compuestos volátiles.

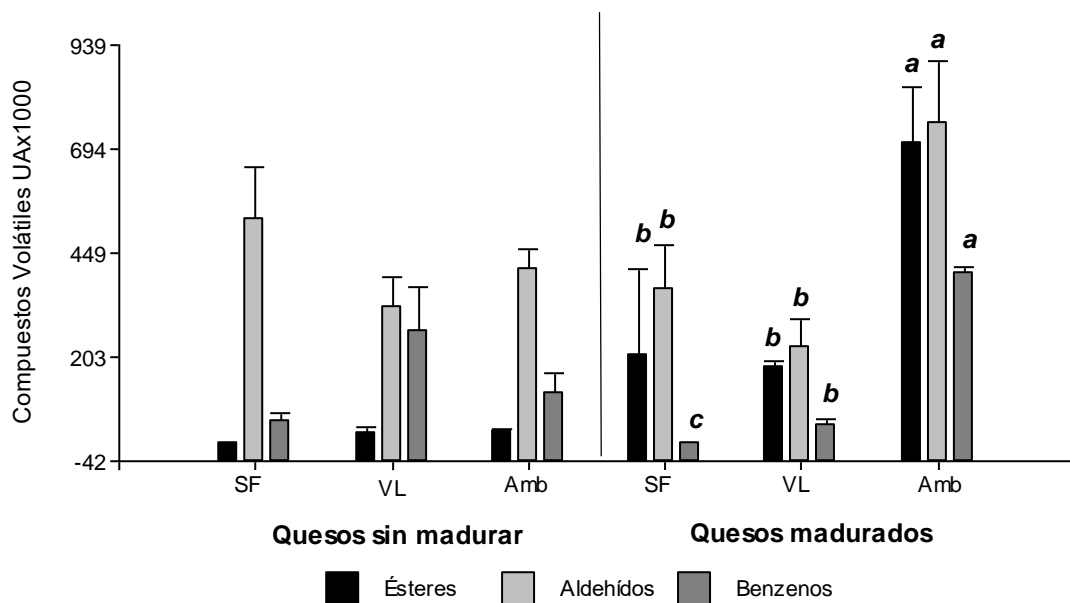
La presencia de estos compuestos volátiles también se detectó en quesos de cabra europeos (Poveda y col., 2008; Attaie, 2009; Sheehan y col., 2009). Los compuestos volátiles en los quesos sin madurar (T0) no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. A los 40 días de maduración, se observó una generación importante de los compuestos, mostrando diferencias significativas con los quesos sin madurar.

Las figuras Figura 4.4.11 y 4.4.12, muestran los grupos de compuestos volátiles, los valores de los mismos se obtuvieron al sumar los compuestos que conformaban cada grupo. En quesos madurados, los elaborados con fermento Amb se destacaron por la mayor generación de compuestos volátiles, sobre todo en la producción de alcoholes, alcanos, esterres, aldehídos y bencenos, mostrando diferencias estadísticamente significativas, con los quesos VL y SF.



**Figura 4.4.11.** Compuestos volátiles (ácidos, alcohol, cetonas y alcanos totales) en quesos Sin fermento, con fermento Valle de Lerma y con fermento Valle de Amblayo; sin madurar y madurados.

Nota: Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (valor  $p < 0,05$ ) entre columnas del mismo color.



**Figura 4.4.12** Compuestos volátiles (ésteres, aldehídos, bencenos) en quesos Sin fermento, con fermento Valle de Lerma y con fermento Valle de Amblayo; sin madurar y madurados.

Nota: Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (valor  $p < 0,05$ ) entre columnas del mismo color.

En la Tabla 4.4.7 se puede observar en detalle la composición de cada grupo de compuestos volátiles.

**Tabla 4.4.7.** Compuestos volátiles identificados en quesos caprinos elaborados sin fermento, con fermento Valle de Lerma y fermento Valle de Amblayo, sin madurar y madurados (UAX1000).

	n	Sin Fermento		Valle de Lerma		Valle de Amblayo	
		T0	T40	T0	T40	T0	T40
<b>Ácidos</b>							
Ácido acético	3	934,1±189,4	0,0	657,4±208,7	0,0a	190,3±329,6	0,0
Ácido hexanoico	3	60,9±105,5	1693,5±921,0	0,0	3072,3±2062,5	7,2±12,5	1933,0±182,3
Ácido hexanoico, 2-etil	3	967,6±462,7	1460,7±618,1	848,3±105,0	2106,3±979,2	1280,2±727,6	1718,6±1565,9
Ácido octanoico	3	108,2±187,5	989,2±198,2	98,3±170,2a	0,0	220,2±381,4	437,1±496,8
Ácido nonanoico	3	583,8±302,5	851,5±352,6	225,2±205,7	853,3±882,5	545,3±355,9	1004,9±617,6
Ácido decanoico	3	480,5±326,5	574,8±434,8	196,2±40,3	532,9±510,7	102,6±177,7	545,1±81,8
Ácido butanoico	3	0,0	30,2±6,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Acido 9-octadecanoico	3	0,0	1,1±0,1	0,0	0,7±0,4	0,3±0,1	1,9±0,2
<b>Alcohol</b>							
1-Butanol,3-metil	3	37,6±65,1	76,0±131,6	10,6±8,7	8,8±2,5	6,1±10,6	132,5±26,7
1-pentanol	3	6,6±11,4	0,0	0,0	0,0	2,6±4,6	16,6±7,9
2,3-Butanadiol	3	694,2±20,4	1202,7±1128,4	657,5±1138,9	467,2±468,0	230,9±399,9	1478,7±2561,2
1-Hexanol	3	94,1±86,1	36,3±13,6	51,9±37,0	98,0±119,8	70,0±21,8	26,3±45,6
2 Butoxi etanol eter	3	32,2±1,7	0,0	7,4±12,9	94,2±67,6	48,8±8,5	0,0
1-heptanol	3	30,8±2,3	0,0	9,9±17,2	53,0±54,7	50,5±13,1	2075,7±984,5
1-hexanol, 2-etil	3	744,2± 198,1	54,0±93,5	798,6±542,5	575,8±155,8	643,2±371,5	87,8±152,1
Benzyl alcohol benceno	3	218,8 ±198,2	519,5±188,7	21,2±36,8	794,4±640,9	16,8±13,1	2638,9±1511,5
1-Octanol	3	41,2± 5,8	72,6±71,7	53,0±30,2	30,8±16,2	41,6±19,0	23,2±40,2
Benceno etanol	3	207,7±±159,7	0,0	0,0	0,0a	0,0a	0,0a
1-nonanol	3	10,7± 1,6	0,0	20,6±6,4	37,8±9,6	2,9±5,0a	81,3±12,6
Etanol 2-phenoxy	3	8,2± 14,2	17,8±30,9	0,0	0,0	0,0a	228,5±55,8
1-decanol	3	0,0	0,0	56,9±16,3	0,0	0,0	38,6±66,9
<b>Cetona</b>							
2-butanona, 3-hidroxi	3	0,0	59,0±7,5	145,6±16,3	190,6±30,4	523,1±44,5	1914,0±365,5
2-Pentanona, 4-hidroxi	3	0,0	0,0	41,4±4,7	0,0	70,6±25,7	0,0
2-heptanona	3	390,1±122,7	483,4±189,8	182,6±28,7	270,3±162,1	202,5±44,3	428,5±66,5
2-nonanona	3	404,3± 299	980,7± 15	258,7±114	246,90± 119	218,53± 10,9	918,3±54,8
<b>Alcanos</b>							
3-Etil 3-metilheptano	3	45,0±15,2	0,0	0,0a	153,8±266,3	9,4±16,2	0,0
Dodecane	3	55,6±96,2	0,0	0,0a	0,0	160,5±131,4	1126,7±714,3
Dodecano, 4,6-dimetil	3	54,0±93,6	0,0	0,0	0,0	0,0	39,019,6
Hexadecano	3	7,0±12,1	0,0	39,5±68,4	250,4±254,3	0,0	55,3±20,4
Metano, sulfonylbis	3	102,3±53,7	0,0	0,0	0,0	91,1±14,1	204,3±353,9
1,6 Dioxacyclododecano	3	50,3±8,9	68,9±119,3	30,5±7,8	14,7±25,4	59,7±2,7	51,9±7,9
Tetradecano	3	25,5±0,9	0,0	6,0±10,3	14,2±24,7	12,3±21,4	87,2±151,0
Octadecano	3	0,0	0,0	11,4±19,7	136,6±33,8	3,9±6,8	8,0±13,9
Undecano	3	0,0	0,0	0,0	136,63	0,0	360,6±47,6
<b>Ésteres</b>							

Ácido butanoico etil éster	3	204,2±353,6	0,0	0,0	8,3±14,3	0,0	0,0
Ácido Hexanoico, etil éster	3	0,0	0,0	0,0	161,9±2,9	0,0	486,3±195
Ácido benceno acético, 4-metil-, 1,1-dimetiletil éster	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,3±78,5
Ácido fumárico, isobutil tetrahidrofurfuril éster	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	31,3±54,2
Ácido octanoico etil éster	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	26,6±46,1
Acido 2-Propenoico-etilhexil éster	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,8±74,1
Ácido propanoico, 2-metil-, 2,2-dimetil-1-2-hidroxi-1-metiletil) propil éster	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	22,5±38,9
Ácido propanoico, 2-metil-, 3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentil éster	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	49,5±85,8
<b>Aldehídos</b>							
3 metil butanal	3	0,0	0,0a	31,7±6,5	0,0a	0,0	0,0
Heptanal	3	39,4±14,1	52,7±11,1	72,3±32,7	20,3±17,5	46,5±24,0	67,5±4,6
Benzaldehído	3	65,8±39,8	63,1±18,1	88,4±32,4	116,0±63,6	81,9±24,9	107,8±40,5
Octanal	3	27,8±1,5	26,0±0,4	41,0±32,8	4,6±7,9	28,3±5,4	64,3±22,7
Nonanal	3	141,7±64,0	60,6±105,0	258,1±105,3	210,2±108,7	190,0±49,2	500,6±207,9
Hexanal	3	33,8±20,0	19,9±34,4	26,9±46,6	0,0	57,6±8,3	0,0
2-Nonenal	3	13,3±10,7	5,7±9,9	11,3±3,5	12,3±3,2	8,6±0,8	14,2±24,6
<b>Bencenos</b>							
Benceno, 1-etil-3-metil	3	12,4±21,5	0,0	55,4±95,9	0,0	13,3±23,0	72,2±13,1
Metil benceno	3	0,0	0,0	135,1±85,4	34,5±24,7	67,2±36,0	33,3±3,6
3,7-Dimetil-1,6-octad	3	0,0	0,0	2,2±3,9	9,6±2,8	0,0	5,3±9,2
<b>Terpenos</b>							
Cimeno	3	0,0	0,0	0,0	0,0a	0,0a	158,03±13,05
Limoneno	3	0,0	0,0	0,0	0,0a	0,0a	134,7±5,7

Entre los **ácidos**, se determinaron ácidos grasos de cadena lineal. Los ácidos hexanoico, octanoico y nonanoico fueron los más abundantes. El olor y el sabor de los quesos, están vinculados a las características específicas de la leche de cabra, sobre todo a algunos ácidos grasos en particular y su liberación durante la maduración. Los AGCC, incluso en bajas cantidades, desempeñan un papel clave en el sabor del queso de cabra y oveja (Carunchia Whetstine y col., 2003; Attaie, 2009). Varios compuestos volátiles, son responsables del sabor específico de "cabra": ácido nonanoico, 3-ácido metilbutanoico, ácido octanoico, ácido 4-metiloctanoico y ácido 4-etiloctanoico (Ha y Lindsay, 1991; Raynal y col., 2011), en este estudio, en general, se observó un aumento de los ácidos hexanoico, octanoico y nonanoico en los quesos durante maduración. El

ácido hexanoico aumento en mayor medida en los quesos madurados VL, mientras que el ácido octanoico tuvo un mayor aumento en los quesos SF, asimismo en los quesos Amb, se observó los valores más altos de ácido nonanoico.

Entre los **alcoholes**, los alcoholes lineales primarios (1 pentanol, 1 hexanol, 1heptanol, 1 nonanol, 1 decanol), 1 heptanol fueron los más abundante en quesos Amb, entre los alcoholes de cadena ramificada, 2,3-butanodiol fue el predominante en todos los quesos, sobre todo en los madurados de Amb.

Entre las **cetonas**, se detectaron principalmente 2-butanona- 3-hidroxi (acetoina), 2-heptanona, 2 nonanona. Las cetonas provienen del catabolismo de ácidos grasos libres y de la glucosa por microorganismos. La 2-butanona, está relacionada con el aroma a manteca, es el principal componente de aroma del queso Cheddar (Arora y col.,1995), está asociado con el metabolismo de lactosa o citrato por algunos iniciadores BAL utilizados en los quesos (Abeijón y col., 2006; Cabral y col., 2007). La 2-heptanona con aroma herbáceo es también un importante compuesto que contribuye al flavor del queso Emmental (Curioni y col., 2002). Notas frutales, florales y de humedad están asociadas con varias metil cetonas como las 2 octanona, 2 nonanona, 2 decanona. La presencia de estos compuestos volátiles, sumados a su bajo umbral de percepción y la concentración en la que se encuentra presente, pueden considerarse positivos para el flavor de los quesos (Delgado y col., 2011). Los quesos Amb, se destacaron por la producción de 2-butanona-3-hidroxi, 2 nonanona y 2 heptanona. Valores similares se observaron en los quesos SF a T40, aunque los valores de T0 de los mismos también fueron mayores.

Los **ésteres** aparecen en los quesos debido a la esterificación de los ácidos y alcoholes, la mayoría de ellos tienen notas dulces, frutadas y florales. Los ésteres de AGCC tienen umbrales de percepción bajos (Curioni y Bosset, 2002) y son los encontrados con mayor frecuencia (Liu y col., 2004). Como se mencionó anteriormente, se obtuvo valores más bajos en AGCC en los quesos elaborados con fermentos, sin embargo, se observó una mayor concentración de los ésteres: etil butanoato, etil hexanoato y etil octanoato, en los quesos elaborados con fermento, por lo que se puede suponer que los fermento utilizados participaron impulsando la esterificación de los ácidos. La presencia y contribución de ésteres etílicos en el aroma de muchas variedades de queso, incluido el queso de cabra, ha sido informado por varios autores (Castillo y

col., 2007; Sheehan y col., 2009; Abeijón Mukdsi y col., 2010). Delgado y col. (2011), informaron que los etil éster son particularmente conocidos por tener un importante rol en la formación del carácter frutal en quesos, minimizando el fuerte aroma producido por ácidos carboxílicos. En este estudio, los ésteres etílicos fueron predominantes en quesos elaborados con fermento y madurados. Esto se observó sobre todo en los quesos Amb, siendo el más abundante el éster etil hexanoato. Resultados similares obtuvo Negri y col. (2011), en quesos caprinos artesanales de la zona de Valle de Amblayo. En quesos con fermento VL se detectó la presencia del éster etil butanoato. En el queso Gokceada de cabra, se identificaron entre los más abundantes el etil acetato, etil butanoato y etil hexanoato (Hayaloglu y col., 2013). Estos ésteres etílicos también se detectaron en otros quesos de leche de cabra, como Majorero (Castillo y col., 2007), Ibores (Delgado y col., 2011) y Xinotyri (Bontinis y col., 2012). En quesos con fermento Amb también se determinaron ésteres de metilo y cadena ramificadas similares a los obtenidos por Hayaloglu y col. (2013) en queso de cabra.

Los **aldehídos** pueden ser convertido posteriormente en los alcoholes primarios correspondientes y se consideran compuestos transitorios en el queso, sin embargo, se considera que desempeñan un papel clave en el desarrollo de sabor a queso (Carunchia hetstine y col., 2003; Attaie, 2009). Los aldehídos más representativos fueron el nonanal y benzaldehído, este último se encuentra comúnmente en los quesos, tiene una nota aromática de almendra amarga (Molimard y Spinnler, 1996), ambos compuestos estuvieron presentes sobre todo en los quesos con fermento VL y fermento Amb.

Los **terpenos**, se asocian con olores cítricos y resinoso en el queso (Fedele y col., 2005). En quesos Amb se encontraron estos compuestos, particularmente limoneno y cimeno. Estos y otros compuestos similares (por ejemplo: A-pineno, D-limoneno, mirceno etc.) fueron reportado por Negri y col. (2011), en quesos caprinos artesanales de Valle de Amblayo, y otros autores como Fedele y col. (2005), en leche caprina, o Barron y col. (2007), en quesos Idiazabal (quesos frescos de oveja). El limoneno, aunque se informó que no tiene aroma activo, puede tener un efecto indirecto en el sabor del queso de leche de cabra a niveles inferiores al umbral (Carunchia Whetstine y col., 2003); el cimeno fue relacionado a propiedades antimicrobianas, Ultee y col. (1998), encontraron que este compuesto causaba desestabilización de la membrana de las células bacterianas de *Bacillus cereus* causando la muerte celular. Si bien estos

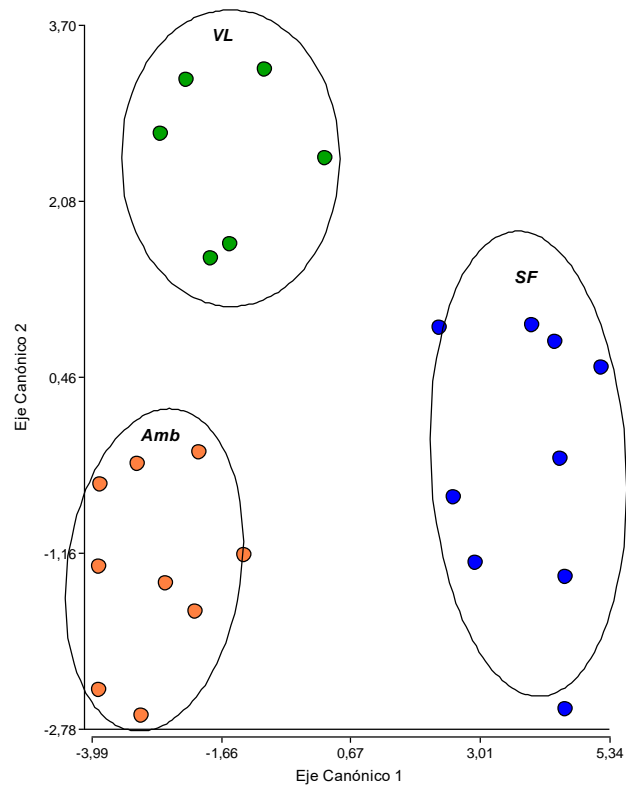
compuestos pueden encontrarse en el material vegetal pastoreada por el animal lactante (Mariaca y col., 1997), y la leche utilizada en la elaboración de los quesos tuvo el mismo origen (mismo rodeo de cabras), los terpenos solo se encontraron en quesos elaborados con fermento Valle de Amblayo, cuyas cepas utilizadas en la formulación del mismo tenían propiedades antimicrobianas.

#### *Nariz electrónica (NE)*

La nariz electrónica, trata de simular la complejidad de detección de olores de la nariz humana; para lo cual, en la nariz electrónica, cada sensor no corresponde a un olor en particular, sino a familia de compuestos químicos asociados a olores. Es un instrumento que permite diferenciar o discriminar poblaciones muestrales según estos sensores, y fue utilizada a modo exploratorio sobre el comportamiento de los fermentos, en términos de olores, en los quesos de 40 días.

Los resultados de la medición con la nariz, fueron volcados en un análisis de discriminante canónico (Fig. 4.4.13.), con la finalidad de verificar si los fermentos eran capaces de generar grupos muestrales diferentes. En efecto, en la mencionada figura se puede distinguir tres grupos, estadísticamente diferentes: SF, VL y Amb, correspondiente a los quesos elaborados Sin fermento, con fermento Valle de Lerma y fermento Valle de Amblayo a los 40 días de maduración. El eje canónico 1 explica el 80,63% de la variación entre grupos, a partir del mismo se puede observar, que SF se opone a VL y Amb, indicando que las diferencias se encuentran entre los quesos elaborados con fermento de los quesos elaborados sin fermentos. A su vez, es posible distinguir que los fermentos de Amb y los de VL, se separan en dos grupos diferentes; aunque sobre esta última afirmación es importante mencionar que corresponde al eje canónico 2, el cual representó el 19,4% de la variabilidad.

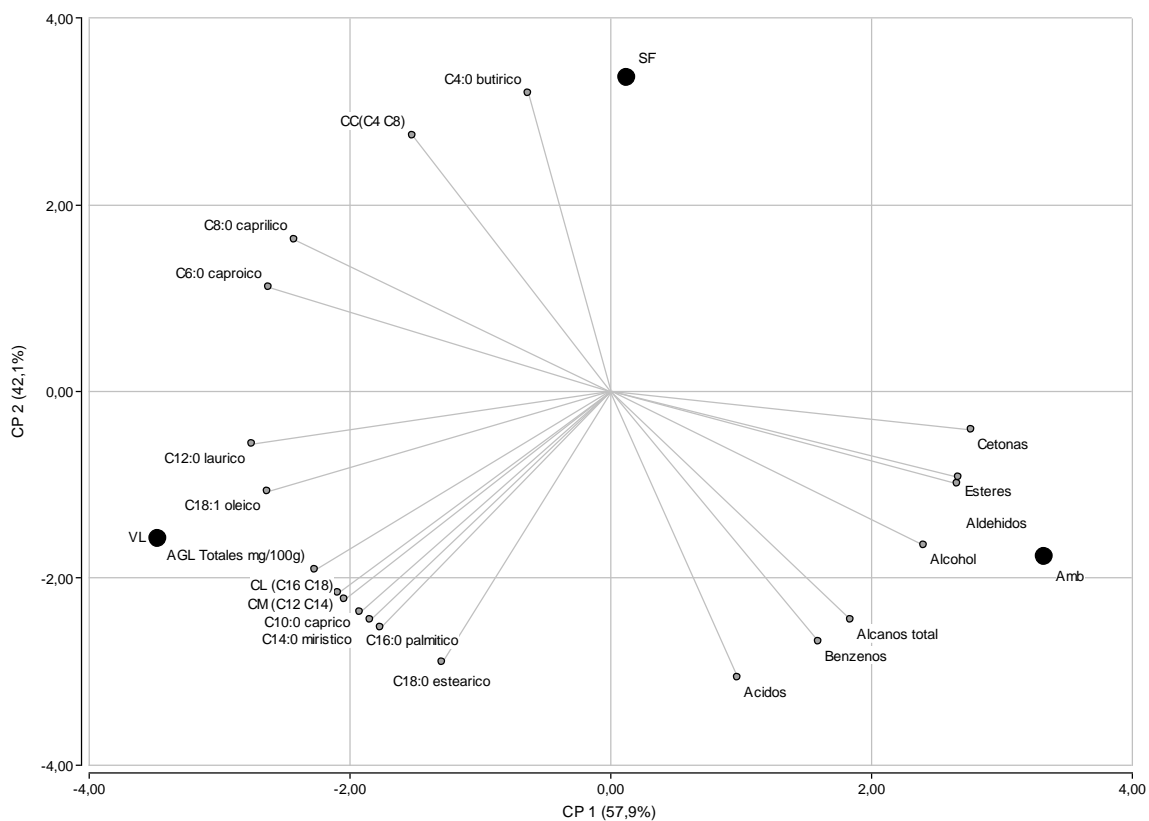




**Fig. 4.4.13.** Análisis discriminante de datos obtenidos por nariz electrónica, para los quesos caprinos elaborados sin fermento (SF), con fermento Valle de Lerma (VL) y fermento Valle de Amblayo (Amb) a los 40 días de maduración. Contornos corresponden a elipses de predicción.

Análisis de Componentes Principales (ACP) de los ácidos grasos y compuestos volátiles de los quesos

La Figura 4.4.14 describe la dimensionalidad del conjunto de compuestos volátiles y ácidos grasos en los quesos AMB, VL y SF mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP). Este análisis complementa el análisis discriminante realizado con los resultados de Nariz electrónica.



**Figura 4.4.14.** Biplot del Análisis de Componentes Principales (ACP) para la caracterización de quesos madurados, elaborados sin fermento (SF), con fermento Valle de Lerma (VL) y fermento Valle de Amblayo (Amb) según ácidos grasos y compuestos volátiles.

El primer componente principal del ACP, representa el 57,9 de la varianza total y diferencia los quesos elaborados con fermentos (Figura 4.4.14). Los quesos caprinos Amb, se caracterizaron por la presencia de compuestos volátiles, sobre todo cetonas, ésteres, aldehídos y alcoholes. Los quesos VL se caracterizaron por el contenido de ácidos grasos libres totales, diferenciándose los de cadena larga (principalmente ácido oleico) y cadena media (principalmente ácido láurico), asimismo los ácidos caproico y caprílicos contribuyeron en gran medida a estos quesos.

El segundo componente, representando el 42,1% de la varianza total, separo claramente los quesos elaborados con fermento del queso control (SF), este último caracterizado por los ácidos grasos de cadena corta, sobre todo ácido butírico. A partir de los coeficientes de peso del eje 1, se observó que las variables que más contribuyeron a diferenciar los quesos fueron: cetonas, aldehídos, ésteres, ácido caproico, ácido caprílico, ácido láurico y ácido oleico.

#### 4.5 Conclusiones

- Se detectó avance de proteólisis en mayor medida en los quesos con fermento Amb y VL. Este avance de proteólisis, fue bajo pero relevante al momento de generar volátiles y ácidos grasos libres, y permitir diferenciar fermentos según procedencia.
- Los quesos caprinos elaborados con fermento VL, presentaron el mayor contenido de ácidos grasos libres totales, distinguiéndose los de cadena larga (principalmente ácido oleico y palmítico) y cadena media (principalmente ácido mirístico).
- Los quesos caprinos elaborados con fermento Amb, se caracterizaron por la mayor presencia de compuestos volátiles, sobre todo cetonas, ésteres, aldehídos y alcoholes.
- Se pudo diferenciar los quesos elaborados con fermento del queso control sin fermento. Este último se caracterizó por la presencia de ácidos grasos de cadena corta, sobre todo ácido butírico.
- A través de las bacterias lácticas seleccionadas, fue posible asociar perfiles sensoriales a ecosistemas diferentes: Los quesos con fermento Amb tienden a ser más aromáticos, mientras que los elaborados con fermento Valle de Lerma están más asociados a compuestos grasos.

## Discusión y Conclusiones Generales

La biodiversidad microbiológica de los sistemas lecheros, leche y quesos artesanales caprinos es amplia, y al inicio de este trabajo muy poco conocidas en los sistemas de Salta.

Este trabajo de tesis aportó específicamente sobre indicadores microbiológicos de inocuidad y sobre bacterias lácticas, consideradas estas claves en el desarrollo de cualidades sensoriales, dotando de características propias a estos quesos.

Esta biodiversidad está asociada a los sistemas productivos, cuyos ecosistemas son particulares y co responsables del material biológico involucrado (en los valles áridos de altura es fácil encontrar cuencas lecheras que no tuvieron incorporación de material microbiológico provenientes de la industria de los fermentos), razón por la cual, se encontró relevante conocer un recorte de esta biodiversidad asociada a la producción de quesos artesanales caprinos en dos aspectos de interés para el sector y para las autoridades de control bromatológico.

El primer aspecto abordado tuvo que ver con la forma de cuantificar la inocuidad de este alimento. Relacionar los parámetros de calidad teniendo en cuenta la zona de procedencia, el tipo de ordeño y el biotipo, muestra un aporte diferente, donde las condiciones agroecológicas de una zona y el tipo de manejo, es decir los diferentes sistemas productivos, se reflejan en las características de la producción y en la calidad del queso. La incorporación al CAA de parámetros de calidad de leche caprina (inicialmente solo estaban para bovino), como pH, acidez, conteo de células somáticas y recuento de bacterias aerobias mesófilas, permitió realizar comparaciones más efectivas. Asimismo, se contribuyó con un valor límite para coliformes totales en leche cruda caprina, sumando información a los estudios de inocuidad de los sistemas artesanales caprinos del NOA.

El otro aspecto abordado para estas producciones, fue el de reconocer la microbiota láctica como baluarte de estos sistemas, asociar texturas, sabores y aromas a las mismas y, por consiguiente, al terruño; pudiendo ser ésta, una herramienta biotecnológica que permita dar origen a un proceso de diferenciación territorial. Adicionalmente y no con menos importancia, verificar el aporte de acción antimicrobiana de estos MO como protectores de la leche y con potencial para otros

usos para salud humana. Sin dudas quedan cepas por estudiar, pero las acá evaluadas permitieron reconocer la riqueza de este capital biológico. Aún más, fue posible entender que la tecnología quesera resulta fundamental para que esta riqueza quede expresada, sobre este aspecto será posible trabajar y proponer, a futuro, otras tecnologías que permitan diversificar en tipos de quesos diferentes al tradicional y utilizando recursos biológicos locales (animales, pasturas, microbiota).

La provincia de Salta, y en general las del NOA, producen quesos en forma artesanal, esto significa un sistema de producción-elaboración particular propio que está asociado a la geografía. En efecto, cada elaborador de queso es productor de su propia leche, ya que resulta difícil trasladar la leche por la presencia de cerros, acantilados, ríos y distancia sin caminos. Sin embargo, en los valles templados de Salta, también hay interés en producir lácteos caprinos; en estos valles hay caminos y acceso a energía eléctrica y agua, facilitando la incorporación de equipamientos, traslado del alimento en cadena de frío, entre otras cosas. El análisis de leche caprina tratada térmicamente obedece a realizar ofertas tecnológicas para estos sistemas, además del queso. También puede ser una propuesta interesante para Municipios quienes tengan la posibilidad de organizar una cuenca lechera alrededor del mismo. La leche caprina presenta cualidades nutricionales que han sido estudiadas y destacada por muchos autores. Por lo que la leche caprina pasteurizada, puede formar parte de la alimentación diaria en niños, llegando a escuelas o merenderos de zonas productoras.

El estudio de indicadores de inocuidad sobre la línea de elaboración de quesos a pequeña escala, permitió dar información importante para el desarrollo de herramientas de la gestión de la inocuidad, hoy no disponible para estos sistemas.

Finalmente agregar que el estudio de la biodiversidad en términos de bacterias lácticas en las cuencas evaluadas, propone la aplicación de las mismas en otros procesos de elaboración de lácteos bovinos, caprinos y ovinos y sus mezclas, además de la formulación de fermentos para quesos. En efecto, la aparición de fagos en líneas estandarizadas industriales es un aspecto que requiere de la renovación permanente de fermentos cubriendo esta dificultad. Consecuentemente, contar con estrategias de selección con finalidad tecnológica, metodologías de medición y análisis de las cinéticas que supere la caracterización bioquímica individual, fueron aportes fundamentales para abordar el desarrollo de nuevos fermentos. Tanto metodología como resultados,

contribuyen a diseñar procesos a diferentes escalas productivas. Adicionalmente, la formulación de starters para otras aplicaciones (producción de embutidos, silos alimentos animal, probióticos) resulta demandas tecnológicas permanentes. Haber aplicado metodologías que puedan evaluar cepas actuando en forma conjunta, es una información valiosa para iniciar la formulación de estos iniciadores para diferentes procesos fermentativos.

### Proyecciones futuras

La tesis se enfocó en la microbiología de la leche caprina principalmente en dos procesos: elaboración de queso y tratamiento térmico de la leche. Sin embargo, los resultados promisorios obtenidos en cuanto a biodiversidad se refieren, impulsó a tomar nuevas matrices de estudio, ahondándose en cuajo y quesos en la actualidad, además de leche. Incluso extendiendo los sitios experimentales a la provincia de Jujuy y Tucumán. En efecto, del análisis de la microbiota láctica realizado en la leche, se encontraron en mayor porcentaje enterococos, por lo que investigar la presencia de lactobacilos y lactococos, nos conduce al análisis de otras matrices como el cuajo (utilizado en la elaboración de los quesos como coagulante), el queso y los pastos consumidos por las cabras. Se proyecta caracterizar la microbiota láctica en estas matrices y estudiar su potencial tecnológico, no solo para elaboraciones de lácteos, sino para otros alimentos e insumos de producciones agroalimentarias, como son los fermentos para silos o probióticos para nutrición animal.

A partir de las bacterias aisladas y caracterizadas, se logró obtener una colección de BAL con propiedades tecnológicas conocidas y una metodología que sistematiza este estudio. Este banco de cepas organizado, permitirá la evaluación de sustancias antimicrobianas en aquellas bacterias donde fueron detectadas, determinar su naturaleza química, analizar la presencia de genes estructurales de bacteriocinas, y sus aplicaciones serán posibles caminos a seguir; de hecho, ya existe una articulación con investigadores de la Universidad Nacional de Salta en este sentido.

Por otro lado, esta tesis ha aportado información valiosa sobre inocuidad de leche, propone un indicador importante para su control, sobre todo teniendo presente que se trata de producciones en las que el pasteurizado no se aplica. Estos primeros

pasos despertaron el interés de enfocar la inocuidad de los quesos a partir de la tecnología de barreras, llevando a profundizar sobre la tecnología y sus puntos críticos. Toda información esta, se comparte con la comisión técnica de CONAL para la inclusión de estos quesos en el Código Alimentario Argentino. En un mismo sentido la información y la experiencia lograda aportan al análisis de puntos críticos de control para lograr una herramienta apropiada del monitoreo de la inocuidad, actividad que se está desarrollando en la actualidad.

Entonces, los avances logrados sobre las tecnologías queseras y la biodiversidad que se pone en juego, llevaron a tratar el tema de tipicidad de estos quesos, ya que responden a características sensoriales propias asociadas al territorio, su gente, geografía y recursos naturales; se trata de producciones que agregan valor en origen, muy difícil de ser reproducidas y estandarizadas fuera de ese ámbito. Responden a alimentos que se diferencian de los industriales por su bajo o nulo agregado de agentes químicos; es menester entonces reconocerlos y ayudar a que se comercialicen.

Por último, continuar con la aplicación de los estudios de tratamientos térmicos para leche caprina. El capítulo dos de la tesis, contiene una parte de la investigación que el grupo de Agregado de Valor y Agroindustria de INTA Salta lleva adelante. Fruto de esta investigación, en convenio con la Universidad Nacional de Salta, se obtuvo el 1<sup>er</sup> premio INNOVAR 2016 (MinCyT), con el desarrollo de un prototipo que permitió obtener como producto final leche caprina ATCT de vida útil media (30 días bajo cadena de frío). En la actualidad, se plantea presentar un proyecto para la obtención de leche caprina pasteurizada envasada, fortificada con capsulas de hierro, con fines comerciales. Diseñó este pensado, en asociación con el tambo caprino de la EEA-Salta, emulando los sistemas reales para los Valles Templados.

## Referencias Bibliográficas

- Abdel-Bar, N.; Harris N.D.; Rill, R. (1987). Purification and properties of an antimicrobial substance by *Lactobacillus bulgaricus*. *J Food Sci.* 52: 411-415.
- Abeijón Mukdsi, M.C. (2010). Esterases of lactic acid bacteria in fermented foods. PhD Thesis, National University of Tucumán, Argentine.
- Abeijon Mukdsi, M.A.C.; Medina, R.B.; Katz, M.B.; Pivotto, R.; Gatti, P.; Gonzalez; S.N. (2009). Contribution of Lactic Acid Bacteria Esterases to the Release of Fatty Acids in Miniature Ewe's Milk Cheese Models. *Journal Agric. Food Chemistry*, 57: 1036–1044.
- Abeijón, M.C.; Medina, R.B.; Katz, M.B.; González, S.N. (2006). Technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from ewe's milk and cheese with importance for flavour development. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 237-254.
- Addis, M.F.; Tanca, A.; Uzzau, S.; Oikonomou, G.; Bicalho, R.C.; Moroni, P. (2016). The bovine milk microbiota: Insights and perspectives from -omics studies. *Molecular BioSystems*, 12(8): 2359–2372.
- Aimar, B.; Nieto I.; Bonafede M.; Picotti, J.; Molina Ortiz S. (2013). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la leche de cabra perteneciente a la cuenca de San Pedro Gutenberg, provincia de Córdoba. Biblioteca digital INTI. [www-biblio.inti.gob.ar/.../library.cgi](http://www-biblio.inti.gob.ar/.../library.cgi).
- Alais, CH. (1985). *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera*. Editorial Reverté, S.A. Barcelona. España. Pag 873.
- Alegría, A.; Álvarez-Martín, P.; Sacristán, N.; Fernández, E.; Delgado, S.; Mayo, B. (2009). Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology* 136:44-51.
- Almeida Júnior, W.L.G.; da Silva Ferrari, I.; de Souza, J.V.; da Silva, C.D.A.; da Costa, M.M.; Dias, F.S. (2015). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control* 53:96-103.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSLBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
- Amaral, D.M.F.; Silva, L.F.; Casarotti, S.N.; Nascimento, L.C.S. y Penna, A.L.B. (2017). *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. *Journal Dairy Science*, 100: 933–949.
- Ambadoyiannis, G.; Hatzikamari, N.; Litopoulou-Tzanetaki, E.; Tzanetakis, N. (2004). Probiotic and technological properties of enterococci isolates from infants and cheese. *Food Biotechnology*, 18:307-325.
- Amiot, J. (1991). *Ciencia y tecnología de la leche*. Editorial Acribia. Zaragoza. España. Pág. 547.
- Andreazza, R.; Frazzon, A.P.G.; de Oliveira Camargo, F.A.; Brandelli, A. (2015). Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. *Food Control* 51: 49-54.
- Andrighetto, C.; Knijff, E.; Lombardi, A.; Torriani, S.; Vancanneyt, M.; Kersters, K.; Swings, J.; Dellaglio, F. (2001). Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research*, 68: 303-316.



- Ardö, Y.; McSweeney, P.L.H.; Magboul, A.A.A.; Upadhyay, V.K.; Fox, P.F. (2017). Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. En *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018-1>.
- Ardö, Y. (1999). Bulletin IDF 337: Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation (Part 2); Cap. 2: Evaluating proteolysis by analyzing the N content of cheese fraction (Ed.: Ardö, Y.). International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica. Pág. 4-9.
- Arora, G.; Cormier, F.; Lee, B. (1995). Analysis of odor-active volatiles in Cheddar cheese headspace by multidimensional GC/MS sniffing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43. 748-752.
- Aspri, M.; Bozoudi, D.; Tsaltas, D.; Hill, C.; Papademas, P. (2017). Raw donkey milk as a source of *Enterococcus* diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control* 73 (2017) 81-90.
- Atasoy, A.F. y Türkoğlu, H. (2009). Lipolysis in Urfa cheese produced from raw and pasteurized goats' and cows' milk with mesophilic or thermophilic cultures during ripening. *Food Chemical*. 115: 71-78.
- Attaie, R. (2009). Quantification of volatile compounds in goat milk Jack cheese using static headspace gas chromatography. *Journal Dairy Science*. 92:2435-2443.
- Attaie, R. y Richter, R. L. (1996). Formation of volatile free fatty acids during ripening of Cheddar-like hard goat cheese. *Journal of Dairy Science*, 79: 717-724.
- Audisio, M.C.; Terzolo, H.R.; Apella, M.C. (2005). Bacteriocin from honeybee beebread *Enterococcus avium*, active against *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3373-3375.
- Audisio M.C. (1999). Estudios de bacterias lácticas con actividad antipatógena para el diseño de suplementos probióticos para aves. (Tesis doctoral). Salta, Argentina: Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Exactas.
- Azadnia, P., Zamani, M. H., Shah, A. G., Khalegh, B. A., Karimi, J.M., Taarof, N. (2011). Isolation and identification of thermophilic Lactobacilli from tradicional yoghurts of tribes of Kaserum. *Journal of Animal of Veterinary Advances*. 10(6):774-776.
- Badis, A.; Guetarni, D.; Moussa-Boudjemaa, B.; Henni, D.E.; Tornadijo, M.E.; Kihal, M. (2004). Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*, 21: 343-349.
- Bansal, N.; Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. (2007). Factors affecting the retention of Rennet in cheese curd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:9219-9225.
- Barron, L.J.R.; Redondo, Y.; Aramburu, M.; Gil, P.; Perez-Elortondo, F.J.; Albisub, M.; Nájera, A.I.; de renobales, M.; Fernández-García, E. (2007). Volatile composition and sensory properties of industrially produced Idiazabal cheese. *International Dairy Journal* 17(12): 1401-1414.
- Ben Omar, N.; Castro, A.; Lucas, R.; Abrionel, H.; Yousif, N.M.K.; Franz, C.M.A.P.; Holzapfel, W.H.; Pérez-Pulido, R.; Martínez-Cañamero, M.; Galvez, A. (2004). Functional and Safety Aspects of Enterococci Isolated from Different Spanish Foods. *Systematic and applied microbiology* 27:118-130.
- Beresford, T. y Williams, A. (2004). The Microbiology of Cheese Ripening. En *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition. General Aspects 1:287-317. ISBN: 0-1226-3652-X Set ISBN: 0-1226-3651-1.
- Bergey's Manual of determinative microbiology. (1994). Group 17 Genus *Enterococcus*. En J.G. Holt, N.R Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley y S.T. Williams (ed), Williams y Wikins, U.S.A. Pág. 528.

- Binetti, A.; Suárez, V.; Tailliez, P.; Reinheimer, J. (2007) Characterization of spontaneous phage-resistant variants of *Streptococcus thermophilus* by randomly amplified polymorphic DNA analysis and identification of phage-resistance mechanisms. *International Dairy Journal* 17: 1115–1122.
- Bontini, T.; Mallatou, H.; Pappa E.C.; Massouras, Th.; Alichanidis, E. (2012). Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. *Small Ruminant Reserch* 105:193-201.
- Bontinis T.; Mallatou, H.; Alichanidis, E.; Kakouri, A.; Samelis, J. (2008). Physicochemical, microbiological and sensory changes during ripening and storage of Xinotyri, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. *International Journal of Dairy Technology* 68: 229-236.
- Boor, K.J.; Wiedmann, M.; Murphy, S.; Alcaine, S. (2017). Microbiology and safety of milk handling. *Journal of Dairy Science*, 100(12):9933–9951.
- Børsting, M.W.; Qvist, K.B.; Ardö, Y. (2014). Influence of pH on retention of camel chymosin in curd. *International Dairy Journal*, 38: 133–135.
- Bosset, J.O., y Gauch, R. (1993). Comparison of the volatile flavour compounds of six European cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method. *International Dairy Journal*, 3: 359-377.
- Burdova, O.; Baranova, M.; Laukova, A.; Rozanska, H.; Rola, J.G. (2002). Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. *Bulletin of the Veterinary Institute*, 46: 325-329.
- Cabral, M.E.; Abeijón Mukdsi, M.C.; Medina, R.B.; González, S.N. (2007). Citrate metabolism by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from goat's and ewe's milk: influence of glucose and lactose. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 607–615.
- CAC (2013). Codex general standard for cheese. Rome Italy: FAO/WHO.
- Calle, M.L.; Hough, G.; Curia, A.; Gómez, G. (2006). Bayesian survival analysis modeling Quality and Preference 17: 307-312.
- Canzek Majhenic, A.; Rogelj, I.; Perko, B. (2005). Enterococci from Tolminc cheese: Population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *International Journal of Food Microbiology* 102: 239- 244.
- 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: 1-6.
- Carunchia Whetstine, M.E.; Karagul-Yuceer, Y.; Avsar, Y.K.; Drake, M.A. (2003). Identification and quantification of character aroma components in fresh Chevre-style goat cheese. *Journal Food Science*, 68:2441–2447.
- Casalta, D.; Requena, T.; Gomez, R. (1996). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL 105, *Journal o Applied Bacteriology*, 81: 35-41.
- Casp, A. y Abril, J. (1999). *Procesos de Conservación de Alimentos*. Ediciones Mundi prensa. Coedición. España. Pág. 493.
- Castillo, I; Calvo, M.V.; Alonso, L.; Juarez, M. (2007). Changes in lipolysis and volatile fraction of a goat chesee manufactured employing and hygienized rennet paste and defined strain started. *Food Chemical* 100:590:598.
- Centeno, J.A.; Menendez, S.; Hermida, M.A.; Rodriguez-Otero, J.L.; (1999). Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *International Journal Food Microbiology* 48:97– 111.

- Ceruti, R.J.; Zorrilla, S.E.; Sihufe, G.A. (2012). The influence of elevated initial ripening temperature on the proteolysis in Reggianito cheese. *Food Research International* 48:34–40.
- Chamorro M.C. y Losada M.M. (2002). El análisis sensorial de los quesos. AMV Ediciones, Madrid, España. Pág. 1-229.
- Charles M.A.P.; Franz, Ch.M.A.P.; van Belkum, M.J.; Holzapfel, W.H.; Abriouel, H.; Galvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *Federation of European Microbiological Societies* 31:293-310.
- Chavez. M. (2018). Calidad higiénica y sanitaria de la leche. En *Lechería Caprina: producción, manejo, sanidad, calidad de leche*. Ed. Gabriela Marcela Martínez y Víctor Suárez. Ediciones INTA. Pág. 149-153.
- Chavez, M. (2014). Comparación de Composición y estabilidad de leche entre vaca y cabra. En: *Leche inestable - Desafíos en el cono sur*. Pág. 43-53. ISBN 978-9974-0-1103-8.
- Chavez, M.; Orosco, S.; Sánchez, M.; Martínez, G.; Torres, N.; Candotti, J. (2011). Sistemas de Producción de Leche Caprina: Valles Áridos y Quebradas del NOA como caso de estudio. En *Primer Taller Internacional sobre Tecnologías productivas disponibles para el Sector de los Pequeños Rumiantes en la República Argentina*. Setiembre 2011.
- Chavez, M. y Fili, M. (2009). Leche de Cabra: Aporte nutricional y beneficios para la Salud. *Panorama Agropecuario de Salta y Jujuy*. Nº 52: 42.
- Chavez, M. y Mc Sweeney, P.L.H. (2009). Ripening evaluation of artisan-type goat cheese from the north zone of Argentina. En: *XII Congreso CYTAL*. ISBN 978-987-22165-3-5. CD Nº1.28
- Chávez, M.; Torres, N.; Orozco, S.; Sánchez, V.; Candotti, J. (2009 a). Parámetros de calidad y sanitaria en leche cruda caprina de sistemas productivos del norte argentino. En: *X Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos*. Octubre, 2009. Uruguay Soporte electrónico: Colmic 2009.congresoselis.info/programa/programaExtendido.php? Sala=48dia= 2, Nº 097.
- Chavez, M.; Margalef, M.I.; Fili, J.; Marrupe, S.; Sanchez, V. (2009 b). Punto de corte sensorial de leche caprina pasteurizada. En: *XII Congreso CYTAL*. ISBN 978-987-22165-3-5. CD Nº 8.13.
- Chavez, M.S.; Margalef, M.I.; Martínez, M. (2007). Cuantificación de lipólisis en leche caprina (saanen) cruda y térmicamente tratada. En: *V Congreso Latinoamericano de Especialistas en pequeños rumiantes y camélidos sudamericanos*, Mendoza, Argentina. Pág. 181-183
- Chevalier F. (2011). Analytical methods: Electrophoresis. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra. Pág 185-192.
- Chillard, Y., Ferlay, A., Rouel, J.; Lambert, G. (2003). A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal Dairy Science* 86: 1751-1770.
- Chye, F.Y.; Abdullah, A.; Mohd, K.A. (2004). Bacteriological quality and safety of raw milkin Malaysia. *Food Microbiology* 21: 535-541.
- Cocolin, L.; Foschino, R.; Comic, G.; Fortina M. (2007). Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiology* 24:752-758.
- Codex Alimentarius Commission (2003). *Codex Alimentarius food hygiene basic texts (3rd ed.)*. Rome: World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Código Alimentario Argentino. Capítulo 8: Lacteos.

- Cogan, T.M.; Barbosa, M.; Beuvier, E.; Bianchi-Salvadori, B.; Cocconcelli, P.S.; Fernandes, I. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64: 409-421.
- Coghill, D. y Juffs, H.S. (1979). Incidence of psychrotrophic sporeforming bacteria in pasteurised milk and cream products and effect of temperature on their growth. *Australian Journal Dairy Technology*, 34: 150-153.
- Cromie, S.J.; Dommett, T.W.; Schmidt, D. (1989). Changes in the microflora of milk with different pasteurisation and storage conditions and aseptic packaging. *Australian Journal Dairy Technology*, 44: 74-77.
- Crow, V.; Curry, B.; Christison, M.; Hellier, K.; Holland, R.; Liu, S.-Q. (2002). Raw milk flora and NSLAB as adjuncts. *Australian Journal Dairy Technology*, 57:99-105.
- Curionia, P.M.G. y Bosset, J.O. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12 (2002) 959-984.
- da Silva Ferrari, I.; de Souza, J. V.; Lacerda Ramos, C.; da Costa, M.; Freitas Schwan, R.; Silva Dias, F. (2016). Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. *Food Microbiology*, 60: 29-38.
- Daffonchio, D.; Borin, S.; Frova, G.; Manachini, P.; Sorlini, C. (1998). PCR fingerprinting of whole genomes: the spacers between the 16S and 23S rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveals a different intraespecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 107-116.
- Danielsen, M. y Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology* 82: 1- 11.
- De Man, J.C.; Rogosa, M.; Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135.
- Deeth, H.C., Fitz-Gerald, C.H., Snow, A.J., 1983. A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. *N. Z. Journal of Dairy Science Technology*, 18, 13-20.
- Deeth, H.C. y Lewis M.J. (2017). *High Temperature Processing of Milk and Milk Products*. ISBN:9781118460504, Online ISBN: 9781118460467.
- Delavenne, E.; Mounier, J.; Deniel, F.; Barbier, G.; Le Blay, G. (2012). Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *International Journal Food Microbiology*, 155: 185-190.
- Delgado, F.J.; Gonzalez-Crespo, J.; Cava, R.; Ramirez, R. (2012). Changes in microbiology, proteolysis, texture and sensory characteristics of raw goat milk cheeses treated by high-pressure at different stages of maturation. *LWT- Food Science Technology*, 48:268-275.
- Delgado, F.J.; González-Crespo, J.; Cava, R.; Ramírez, R. (2011). Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. *Food Chemistry* 129:1156-1163.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. (2017). *InfoStat versión 2017*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Dice, L.R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302.

- Dicks, L.M.T.; Todorov, S.D.; Franco; B.D. (2009). Current status of antibiotic resistance in lactic acid bacteria. En *Antibiotic Resistance: Causes and Risk Factors, Mechanisms and Alternatives*. A. R. Bonilla and K. P. Muniz, ed. Nova Science Publishers Inc., New York, NY.
- Dolci, P.; Alessandria, V.; Zeppa, G.; Rantsiou, K.; Coccolin, L. (2008). Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25: 392-399.
- dos Santos, Souza, M.; Couto Gomes Passetti, L.; Ribeiro Gonçalves, T.; Cortez Passetti, R.; de Arruda Santos, G. (2019). Characterisation of goat product consumers and goat farming systems in the Brazilian Northeast region. *Small Ruminant Research* 179: 7–13
- Dumalisile, P.; Witthuhn, R.C.; Britz, T.J. (2005). Impact of different pasteurization temperatures on the survival of microbial contaminants isolated from pasteurized milk. Vol 58, No 2 *International Journal of Dairy Technology*.
- Durak, M.Z.; Fromm, H.I.; Huck, J.R.; Zadoks, R.N.; Boor, K.J. (2006). Development of molecular typing methods for *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. Isolated from fluid milk products. *Journal Food Science*, 71: M50-M56.
- Durlu-Ozkaya, F.; Xanthopoulos, V.; Tunail, N.; Litopoulou-Tzanetaki, E. (2001) Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 861–870.
- Eck, A. (1990). *El queso*. Ed. Omega, Barcelona, España.
- El Galiou.O; Zantar, S.; Bakkali, M.; Laglaoui, A; Centeno J. (2015). Chemical and microbiological characteristics of traditional home made fresh goat cheeses from Northern Morocco. *Small Ruminant Research* 129:108–113.
- Escuder-Vieco, D.; Espinosa-Martos, I.; Rodriguez, J.M.; Corzo, N.; Montilla, A.; Siegfried, P.; Fernández, L. (2018). High-Temperature Short-Time pasteurization system for donor milk in a human milk bank setting. *Frontiers in Microbiology*, 9: 926.
- FAO/OMS., (2004). Code of hygienic practice for milk and milk products. Joint FAO/WHO Food Standards Programme-Codex Committee on Food Hygiene, 26th Session, March 29-April 2, 2004, Washington, DC., USA.
- Farkye, N.Y. y Fox, P.F. (1990). Objective indices of cheese ripening. Review. *Trends in Food Science and Technology*, 8: 37-40.
- Favaro, L.; Basaglia, M.; Casella, S.; Hue, I.; Dousset, X.; de Melo Franco, B.D.G.; Todorov, S.D. (2014). Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiology* 38: 228–239.
- FDA., (2009). Grade A pasteurized milk ordinance. Food and Drug Administration, USA. Pág. 1-26.
- Fedele, V.; Rubino, R.; Claps, S.; Sepe, L.; Morone, G. (2009). Seasonal evolution of volatile compounds content and aromatic profile in milk and cheese from grazing goat. *Small Ruminant Research*, 59:273-279.
- Fili, M. (2018). Características Físico-Químicas de la Leche de cabra. En *Lechería Caprina: producción, manejo, sanidad, calidad de leche*. Ed. Gabriela Marcela Martínez y Víctor Suárez. Ediciones INTA. Pág. 141-145.
- Food and Agriculture Organization of the united nations/ Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS). (2007). *Leche y productos lácteos*. Codex Alimentarius. Roma. Pág. 275.

- Fortina, M.G.; Ricci, G.; Borgo, F.; Manachini, P.L.; Arends, K.; Schiwon, K.; Abajy, M.; Grohmann, E. (2008). A survey on biotechnological potential and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus*. *International Journal of Food Microbiology* 123:204-211.
- Foschino, R., Invernizzi, A., Barucco, R.; Stradiotto, K. (2002). Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *Journal of Dairy Research*, 69(2): 213-225.
- Fox, P.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. (2017). Factors That Affect the Quality of Cheese. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 4ª Edición. Ed. Elsevier Lid. Pág. 617-641.
- Fox P.F. 2011a. Milk: introduction. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Volumen 3. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, Pág. 458-466.
- Fox P.F. 2011b. Cheese: an overview. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, Pág. 534-543.
- Fox P.F. 2011c. Lactic acid bacteria: an overview. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, Pág. 401-402.
- Fox, P.F. y Cogan, T.M. (2004). Factors that affect the quality of cheese. En *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, (vol. 1), General aspects (3ª ed.). Amsterdam: Elsevier. P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. Guinee (Eds.). Pág. 583–608.
- Fox, P.F. y McSweeney, P.H.L. (1998). Dairy Chemistry and Biochemistry. Cap.10 en *Chemistry and biochemistry of cheese and fermented milks*. Blackie Academic y Professional, Londres, Reino Unido, pág. 379-436.
- Fox, P.F. y Wallace, J.M. (1997). Formation of flavour compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology*, 45:17–85.
- Fox, P.F.; y McSweeney, P.L.H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Review International*, 12(4): 457–509.
- Fox, P.F.; Lucey, J.A.; Cogan, T.M. (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29: 237–253.
- Fox, P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal Dairy Science*, 72:1379–1400.
- Fox, P.F. y Walley, B.F. (1971). Influence of sodium chloride on the proteolysis of casein by rennet and by pepsin. *Journal of Dairy Research*, 41: 259–268.
- Fox, P.F. (1963). Potentiometric determination of salt in cheese. *Journal Dairy Science*, 46:744-745.
- Franciosi, E.; Settanni, L.; Cavazza, A.; Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, 19: 3–11.
- Franco, I.; Prieto, B.; Urdiales, R.; Fresno, M.J.; Carballo, J. (2001) Study of the biochemical changes during ripening of Ahumado de Aliva cheese: a Spanish traditional variety. *Food Chemistry*, 74: 463 – 469.
- Franz, C.M.; Muscholl-Silberhorn, A.B.; Yousif, N. M.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Holzapfel, W.H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4385-4389.
- Franz, C.M.A.P.; Holzapfel, W.H.; Stiles, M.E.; (1999). Enterococci at the crossroads of food safety?. *International Journal of Food Microbiology*, 47: 1-24.

- Frau, F.; Font, G.; Paz, R.; Pece, N. (2012). Composición físico-química y calidad microbiológica de leche de cabra en rebaño bajo sistema extensivo en Santiago del Estero (Argentina). *Revista de la Facultad de agronomía*, 111(1): 1-7.
- Freitas, A.C. y Malcata, F. X. (1998). Lipolysis in Picante cheese: Influence of milk type and ripening time on free fatty acid profile. *Lait*, 78: 251–258.
- Fresno, M.J.; Tornadijo, E.M.; Carballo, J.; Bernardo, A.; Gonzalez-Prieto, J. (1997) Proteolytic and lipolytic changes during the ripening of a Spanish craft goat cheese (Armada variety). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75: 148–154.
- Fromm, H.I. y Boor, K.J. (2004). Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. *Journal Food Science*, 69: M207-M214.
- Gaiaschi, A.; Beretta, B.; Polesi, C.; Conti, A.; Giuffrida, M.; Galli, C.; Restani, R. (2000). Proteolysis of casein as a marker of Grana Padano cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 83: 2733-2739.
- Galeslod, T.E.; Hassing, F.; Stadhouders, J. (1961). Agar medium for the isolation and enumeration of aroma bacteria in starters. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 15: 127-129.
- Gámbaro, A.; González, V.; Jiménez, S.; Arechavaleta, A.; Irigaray, B.; Callejas, N.; Grompone, M.; Vieite, L. (2017). Chemical and sensory profiles of commercial goat cheeses. *International Dairy Journal* 69:1-8.
- Garg S.K. y Mital, B.K. (1991). Enterococci in milk and milk products. *Critical Reviews in Microbiology* , 18: 15–45. DOI: 10.3109/10408419109113508.
- Giannou, G.; Lianou, A.; Kallimanis, A.; Drainas, C.; Samelis, J. (2009). Identification and biopreservation potential of *Enterococcus* spp. Isolated from fully ripened graviera, a traditional hard greek cheese. *Italian Journal of Food Science*, 21:135-147.
- Giraffa, G. y Rossetti, L. (2004). Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 237: 133- 138.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88: 215– 222.
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 163-171.
- Giraffa, G.; Carminati, D.; Neviani, E. (1997) Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection*, 60: 732-738
- Gonzalez del Llano, D.; Polo, M.C.; Ramos, M. (1995). Study of proteolysis in artisanal cheeses. High performance liquid chromatography of peptides. *Journal of Dairy Science*, 78: 1018-1024.
- Gonzalez, L. y Zárata, V. (2012). Influence of an autochthonous starter culture and a commercial starter on the characteristics of Tenerife pasteurised goats' milk cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65:542-547.
- González, L.; Zárata, V. (2012). Influence of an autochthonous starter culture and a commercial starter on the characteristics of Tenerife pasteurised goats' milk cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65: 542–547.
- Granum, P.E. y Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157: 223-228.
- Grappin, R. y Beuvier E. (1997). Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7:751-761.

- Greek Codex Alimentarius, 2009. Official Journal of the Hellenic Republic. Vol. B, Article 83, Section A, No. 899 Article 83 Paragraph 1.10. Athens, National Printing Office (in Greek).
- Griffiths, M.W. (1986). Use the milk enzymes as indices of heat treatment. *Journal of Food Protection*, 49: 696–705.
- Gripon, J.C.; Desmazeaud, M.J.; Le Bars, D.; Bergère, J. L. (1975). Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. *Lait*. 55:502-516.
- Grufferti, M.B. y Fox, P.F. (1988). Review article: milk alkaline proteinase. *Journal of Dairy Research*, 55:609.
- Guamis, B.; Trujillo, A.J.; Ferragut, V.; Chiralt, A.; Andres, A.; Fito, P. (1997). Ripening control of Manchengo type cheese salted by brine vacuum impregnation. *International Dairy Journal*, 7: 185–192.
- Guerreiro, P.K.; Machado, M.R.F.; Braga, G.C.; Gasparino, E.; Franzener, A.S.M. (2005). Milk microbiological quality according to prophylactic techniques in production management. *Agrotechnology Science*, 29: 216-222.
- Ha, J.K. y Lindsay, R.C. (1993). Release of volatile branched-chain and other fatty acids from ruminant milk fats by various lipases. *Journal Dairy Science*, 76: 677–690.
- Haenlein, G.G.W. (2002). Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. *Small Ruminant Research*, 45: 163–178.
- Hall TA, (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hayaloglu, A.; Tolu, C.; Yasar, K.; Sahingil, D. (2013). Volatiles and sensory evaluation of goat milk cheese Gokceada as affected by goat breeds (Gokceada and Turkish Saanen) and starter culture systems during ripening. *Journal Dairy Science*, 96:2765–2780.
- Hayaloglu, A.A.; Guven, M.; Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. (2005). Influence of starters on chemical, biochemical, and sensory changes in Turkish White-brined cheese. *Journal Dairy Science*, 88:3460–3474.
- Herrera, V.; Chavez, M.; Gonzáles, M.; Quinteros, J.; Ogas, M.; Páez, R. 2010. Milk quality and cheese yield of four European and African goat biotypes bred in a semi arid area of Argentina Northwest. *Proceeding of 10th International conference of Goats (19 al 23 de octubre de 2010, Recife, Brasil) (ISBN 085598). Área 02, Nº99-1, Pág. 4.*
- Hinckley L. (1990). Revision of the somatic cell count standard for goat milk. *Dairy Food Environment Sanitat* 10: 548–549.
- Hough, G.; Langohr, K.; Gómez, G.; Curia, A. (2003). Survival Analysis Applied to Sensory Shelf Life of Foods. *Journal of Food Science*. 68 (1): 359-362.
- Hynes, E. y Bergamini, C. (2006). Rol de las NSLAB (Non Starter Lactic Bacteria) en la maduración de quesos. En *Avances en Microbiología, bioquímica y tecnología de quesos*. Ed. Jorge Reimheimer y Carlos Zalazar. Pág 245-265.
- Hynes, E.; Zalazar, C.A.; Delacroix-Buchet, A. (1999). Proteolysis during ripening of soft cheese. II. Effect of milk-clotting enzyme on Cremoso Argentino cheese ripening. *Microbiologia, Alimentos y Nutrición*, 17:199-205.
- ICMSF, *Microbiología de los Alimentos 1- Su significado y método de enumeración*. (2000). 2ª Ed. Editorial Acirbia, S.A. ISBN: 84-200-0908-3.



- ICMSF., (1998). Microorganisms in Foods. Volume 6, Microbial Ecology of Food Commodities. Blackie Academic and Professional, New York. Pág. 521-576.
- IDF (1988) Milk and Milk Products. Preparation of Samples and Dilutions for Microbiology Examination. Standard 122A. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF (1997). Dairy starter cultures of lactic acid bacteria (LAB). Standard of Identity. Standard 149 A. International Dairy Federation. Brussels, Belgium International Journal of Systematic Bacteriology (1998) 48: 107-116.
- International Dairy Federation (2004). Heat Resistance of Pathogenic Organisms: Proceedings of an International Workshop. Bulletin No. 392/2004 of the International Dairy Federation, Brussels.
- Isaac, P.; Bohl, L.P.; Bresler, M.L.; Orellano, M.S.; Conesa, A.; Ferrero, M. A.; Porporatto, C. (2017). Commensal coagulase-negative Staphylococcus from the udder of healthy cows inhibits biofilm formation of mastitis-related pathogens. Veterinary Microbiology 207: 259 - 266. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.05.025>.
- ISO 13366-2 / IDF 148-2: Milk – Enumeration of somatic cells – Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. 2nd ed. Geneva, 2006.
- Ispirli, H.; Demirbas F.; Dertli, E. (2017). Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. Isolated from Turkish white cheese. Food Science and technology 75:358-365.
- Jacob, M.; Jaros, D.; Rohm, H. (2010). The effect of coagulant type on yield and sensory properties of semihard cheese from laboratory, pilot and commercial scale productions. International Journal of Dairy Technology, 63: 370-380.
- Johnson, E.A.; Nelson, J.H.; Johnson, M. (1990). Microbial safety of cheese made from heat-treated milk, part II. Microbiology. Journal of Food Protection, 53: 519–540.
- Kalantzopoulos, G.C. (1992). Cheeses from ewes' and goats' milk. En Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Vol2. Ed. Fox, P.F. Pág. 507-543.
- Kleerebezem, M. y Hugenholtz, J. (2003). Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. Current Opinion in Biotechnology, 14: 232–237.
- Kondyli, E.; Svarnas, C.; Samelis, J.; Katsiari, M.C. (2012). Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds. Small Ruminant Research 103: 194 -199.
- Kramer, J.M. y Gilbert, R.J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Foodborne Bacterial Pathogens, Doyle, M.P. (Ed.). Marcel Dekker Inc., New York Pág. 21-70.
- Kuchroo C.N. y Fox P.F. 1982a. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. Milchwissenschaft, 37 (6): 331-335.
- Laboratoire Interprofessionnel Laitier du Centre-Ouest, (1994–2004). Annual Reports of Activity (Unpublished). Interprofessional Dairy Laboratory of Centre-West, Surgeres, France.
- Labuza, T.P. (1982). Shelf Life Dating of Foods. Food and Nutrition Press, Westport, CT. Pag 189-231.
- Laugerette, F.; Passilly-Degrace, P.; Patris, B.; Niot, I.; Febbraio, M.; Montmayeur, J.P.; Besnard, P., (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. Journal of Clinical Investigation, 115(11):3177-3184.
- Lawrence, R.C.; Gilles, J.; Creamer, L.K.; Crow, V.L.; Heap, H.A.; HonorS, C.G.; Johnston, K.A.; Samal, P.K. (2004). Cheddar Cheese and Related Dry-salted Cheese Varieties. En Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition - Volume 2: Major Cheese Groups ISBN: 0-1226-3653-8 Set ISBN: 0-1226-3651-1. Pág. 71-100.

- Lawrence, R.C. y Gilles, J. (1982). Factors that determine the pH of young Cheddar cheese. *NZ J. Dairy Science and Technology*, 17: 1-14.
- Lawrence, R.C. y Gilles, J. (1980). The assessment of the potential quality of young Cheddar cheese. *NZ J. Dairy Science and Technology*, 15: 1-12.
- Legendre, P. y Legendre, L. (1998). *Numerical ecology*, Volume 24. Amsterdam: Elsevier B.V.
- LeJeune, J.T. y Rajala-Schultz, P.J. (2009). Unpasteurized milk a continued public health threat. *Clinical Infectious Diseases*, 48(1): 93–100.
- Lewis, M.J. (2003). Improvements in the pasteurisation and sterilisation of milk. In: Smit, G. Ed., *Dairy Processing, Improving Quality*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge Pág. 81–103.
- Lewus, C.B. y Montville. (1991). Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 13: 45-150.
- Litopoulou-Tzanetaki, E. y Tzanetakis, N. (2011). Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research*, 101:17–32.
- Liu, S-Q.; Holland, R.; Crow, V.L. (2004). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 14(11):923-94.
- López, N.; Torres, N. y Chavez, M. (2015). Exploración de la microflora láctica del cuajo nativo caprino. En: XV Congreso CYTAL. Buenos Aires, 3 al 5 de noviembre de 2015. ISBN: 978-987-22165-7-3.
- Lopez-Kleine, L. y Monnet, V. (2011). *Lactic acid bacteria proteolytic systems* (2th ed.). France: Academic Press Published.
- Ludikhuyze, L.; Claeys, W.; Hendrickx, M. (2000). Combined pressure-temperature inactivation of alkaline phosphatase in bovine milk: A kinetic study. *Journal Food Science*, 65: 155-160.
- Lundberg, Å.; Nyman, A.K.; Aspán, A.; Börjesson, S.; Unnerstad, H.E.; Waller, K.P. (2016). Udder infections with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis* at calving in dairy herds with suboptimal udder health. *Journal of Dairy Science*, 99(3):2102–2117. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9487>.
- Lynch, C.M.; Mcsweeney, P.L.H.; Fox, P.F.; Congan, T.M.; Drinan, F.D. (1997). Contribution of starter lactococi non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait*, 77: 441-459.
- Macedo, A.C.; Tavares, T.G.; Malcata, F.X. (2004). Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. *Food Microbiology*, 21: 233-240.
- Mahaut M., Jeantet R.; Brulé G. (2003). *Introducción a la tecnología quesera*. Ed. Acribia, Zaragoza, España, pp. 23-31.
- Mannu, L.; Paba, A.; Daga, E.; Comunian, R.; Zanetti, S.; Dupre, I.; Sechi, L.A. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology* 88: 291– 304.
- Manolopoulou, E.; Sarantinopoulos, P.; Zoidou, E.; Aktypis, A.; Moschopoulou, E.; Kandarakis, I. G.; Anifantakis, E. M. (2003). Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *Int. J. Food Microbiology*, 82:153– 161.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.

- Mariaca, R.G.; Berger, T.F.H.; Gauch, R.; Imhof, M.I.; Jeangros, B.; Bosset, J.O. (1997). Occurrence of volatile mono- and sesquiterpenoids in highland and lowland plant dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4423–4434.
- Marilley, L. y Casey, M.G. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 139-159.
- Marin, E.; Sanchez, L.; Perez, M.D.; Puyol, P.; Calvo, M. (2003). Effect of heat treatment on bovine lactoperoxidase activity in skim milk: Kinetic and thermodynamic analysis. *Journal Food Science*, 68: 89-93.
- Marino, M.; Maifreni, M.; Rondinini, G. (2003). Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 229: 133-140.
- Martin, N.H.; Ranieri, M.L.; Murphy, S.C.; Ralyea R.D.; Wiedmann, M.; Boor, K.J. (2011). Results from raw milk microbiological tests do not predict the shelf-life performance of commercially pasteurized fluid milk. *Journal Dairy Science*, 94: 1211–1222. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3915>.
- Martín, O.; Qin, B.L.; Chang, F.J.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Swanson, B.G. (2007). Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Process Engineering*, 20(4): 317–336. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.1997.tb00425.x>.
- Martinez, M. (2018). La Glandula Mamaria: Morfología y Desarrollo pag. 37-41, en *Lechería Caprina: producción, manejo, sanidad, calidad de leche*. Ed. Gabriela Marcela Martínez y Víctor Suárez. Ediciones INTA.
- Martinez, S.; Lopez, M.; Bernardo, A. (2003). Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state on microbial cells. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 475–481.
- Martín-Platero, A. M.; Valdivia, E.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M. (2009). Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheese. *Int. J. Food Microbiology*, 132:24–32.
- Mauro, B.; Van Nieuwenhove, C.P.; González, S.N.; Oliszewski, R. (2010). Elaboración y maduración de quesos caprinos con fermentos autóctonos iniciadores y adjuntos. En: *XX Congreso Latinoamericano de Microbiología*.
- McAuley, C.M.; Gobius, K.S.; Britz, M.L; Craven, H.M. (2012). Heat resistance of thermotolerant enterococci isolated from milk. *International Journal of Food Microbiology* 154: 162–168.
- McInnis, E.A.; Kalanetra, K.M.; Mills, D.A.; Maga, E.A.; (2015). Analysis of raw goat milk microbiota: impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. *Food Microbiology*, 46: 121–131.
- McKenzie H.A. (1971). *Milk Proteins. Chemistry and molecular biology. Volumen 2*. Ed. Academic Press, New York, EE.UU.
- McSweeney, P.L.H. (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects. Cap. 14.1 en Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview* (Ed.: Unidos, pág. 347-360. Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. y Guinee, T.). Academic Press, Estados.
- McSweeney, P.L.H. y Sousa, M.J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening. *Lait*, 80: 293-324.
- McSweeney P.L.H. y Fox P.F. (1997). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait* 77: 41-76.
- Medina, R.B.; Socci, M.C.; González, S.N.; Oliszewski, R. (2012). Caracterización metabólica de cultivos adjuntos autóctonos en quesos caprinos. En: *XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e*

Higiene de Alimentos. IV Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos. III Simposio Argentino de Conservación de Alimentos. Bs. As., Argentina.

Medina, R.B.; Oliszewski, R.; Abeijón Mukdsi, M.C.; Van Nieuwenhove, C.P.; González, S.N. (2011). Sheep and goat's dairy products from South America: Microbiota and its metabolic activity. *Small Ruminant Research*, 101: 84–91.

Medina, M.; Nuñez, M. (2004). Chesees from ewe and goat milk. En *Chesees: Chemistry, Physics and Microbiological*. National Institute for Agricultural and food research and technology. Madrid Spain. Pág. 1069-1094.

Medina, R.; Katz, M.; González, S.; Oliver, G. (2001). Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. *Journal of Food Protection*, 64, 559–563.

Meer, R.R.; Baker, J.; Bodyfelt, F.W.; Griffiths, M.W. (1991). Psychrotrophic *Bacillus* spp. In fluid milk products: A review. *Journal of Food Protection*, 54: 969-979.

Meinardi, C.; Zalazar, C.; Reinheimer J.; y otros. (1994). *Ciencia y Tecnología de los Productos Lácteos*. Diagramma S.A.

Meng, Z.; Zhang, L.; Xing, L.; Lin, K.; Yi, H.; Han, X. (2017). Technological characterization of lactobacillus in semihard artisanal goat cheese from different mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria. *Journal Dairy Science*, 101:2887-2896.

Milesi, M. (2008). Desarrollo de fermentos adjuntos para quesería a partir de bacterias lácticas no pertenecientes al fermento. Universidad Nacional del Litoral.

Miloradovic, Z.; Kljajevic, N.; Miocinovic, J.; Tomic, N.; Smiljanic, N.; Macej, O. (2017). High heat treatment of goat cheese milk. The effect on yield, composition, proteolysis, texture and sensory quality of cheese during ripening. *International Dairy Journal* 68:1-8.

Molimard, P. y Spinnler, H. (1996). Review: Compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79:169–184.

Morales, P.; Fernandez-García, E.; Gaya, P.; Nuñez, M. (2013). Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheeses. *International Dairy Journal* 13:201–209.

Morandi, S.; Cremonesi, P.; Povolo, M.; Brasca, M. (2012). *Enterococcus lactis* sp. from Italian raw milk cheeses. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 1992–1996.

Morandi, S.; Brasca, M.; Andrighetto, C.; Lombardi, A., Lodi, R. (2006). Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from northwestern Italian dairy products. *International Dairy Journal*, 16: 867-875.

Morgan, F.; Massouras, T.; Barbosa, M.; Roseiro, L.; Ravasco, F.; Kandarakis, I.; Bonnin, V.; Fistakoris, M.; Anifantakis, E.; Jaubert, G.; Raynal-Ljutovac, K. (2003). Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Ruminant Research* 47: 39–49.

Mossel, D.A.A., Moreno, B. y Struijk, C.B. (2006). *Microbiología de los Alimentos*. 2ª Ed. Editorial Acribia.

Moulay, M.; Aggad, H.; Benmechernene, Z.; Guessas, B.; Henni, D.E.; Kihal, M. (2006). Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their Proteolytic Activity. *World Journal of Dairy and Food Sciences* 1 (1): 12-18.

Moussa, O.B.; Mankai, M.; Fekih, A.B.; Hassouna, M. (2013). Effect of the lactoperoxidase system on proteolysis and physicochemical changes in ultra-high temperature milk during storage. *Afr. Journal Biotechnology*, 12: 2041-2050.

- Murphy, S.C.; Martin, N.H.; Barbano, D.M.; Wiedmann, M. (2016). Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *Journal of Dairy Science*, Madison, v. 99, n. 12: 10128-10149. DOI: 10.3168/jds.2016-11172.
- NCCLS. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Seventeenth International Supplement. M100 S17. Vol 27 (1).
- Negri, L.; Sancho, A.; Chavez, M. (2011). Trazabilidad de quesos: optimización de una metodología SPMC para el estudio de quesos de cabra. En: IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos; 14, 15 y 16 de noviembre de 2012, Universidad Nacional de Córdoba. ISBN-13: 978-987-28845-0-5. 2012.
- Negri, L. (2005). El pH y la acidez de la leche. Manual de referencias técnicas para el logro de leche de calidad, Pág 155-160. 2ª ed., Ediciones INTA.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nei, M.; Li, W-H (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 7: 5269-5273.
- Nieto-Arribas, P.; Seseña, S.; Poveda, J.; Chicón, R.; Cabezas, L.; Palop, Ll. (2011). *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiology*, 28: 891-899.
- Nieto-Arribas, P.; Sesen, S.; Poveda, J.M.; Palop, Ll.; Cabezas, L. (2009). Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04334.x
- Nikolaou, E.; Tzanetak, N.; Litopoulou-Tzanetaki, E.; Robinson, R.K. (2002). Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal, low-fat cheese made from raw ovine milk during ripening. *Int. J. Dairy Technology*, 55: 12–17.
- Noël, Y.; Ardö, Y.; Pochet, S.; Hunter, A.; Lavanchy, P.; Luginbühl, W.; Le Bars, D.; Polychroniadou, A. y Pellegrino, L. (1998). *Lait*. 78:569-588.
- Ogier, J.C. y Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 1206:291-301.
- Oliszewski, R.; Guzmán, F.; González, S.N. (2014). Fabricación de quesos de cabra con adición de fermentos lácticos autóctonos iniciadores y adjuntos: impacto en el flavour. *Tecnología Láctea Latinoamericana* 80: 49-52.
- Oliszewski, R.; Wolf, I.V.; Bergamini, C.V.; Candiotti, M.; Perotti, P.C. (2013). Influence of autochthonous adjunct cultures on ripening parameters of Argentinean goat's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 2730–2742.
- Oliszewski, R.; Mercanti, D.J.; Candiotti, M.; Herrera, V.; González, M.F.; González, S.N.; Zalazar, C.A. (2009). Estudio de interacciones entre fermentos comerciales y adjuntos autóctonos de origen caprino durante la maduración de quesos semi-duros. En: Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL). Concordia, Argentina.
- Oliszewski, R.; Van Nieuwenhove, C.; González, S.; Pérez Chaia, A. (2006). Identificación y caracterización tecnológica de bacterias ácido lácticas aisladas de leche de cabra y quesos artesanales del noroeste argentino. *Revista Argentina de Lactología* 24: 47–58.

- Oliszweski, R.; Rabasa, A.; Fernández, J.; Poli, M.; Núñez M. (2002). Composición química y rendimiento quesero de la leche de cabra Criolla Serrana del noroeste argentino. *Zootecnia Tropical*, 20 (2): 179-189.
- Oliveira, C.J.B.; Hisrich, E.R.; Moura, J.F.P.; Givisiez, P.E.N.; Costa, R.G.; Gebreyes, W.A. (2011). On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. *Small Ruminant Research*, 98: 64–69.
- Oliver, S.P.; Boor, K.J.; Murphy, S.C.; Murinda, S.E. (2009). Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7): 793–806. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0302>.
- Orosco, S.; Chavez, M.; Sanchez, V.; Candotti, J. (2013). Parámetros de calidad fisicoquímica de leche caprina. En: XIV Congreso CYTAL. CD ID 773. ISBN: 978-987-22165-5-9.
- Orosco, S.; Sanchez, V.; Chavez, M. (2011). Medición del desarrollo de lipólisis en leche caprina cruda por dos métodos. En: XIII Congreso CYTAL. ISBN 978-987-22165-4-2. CD. Pag 113.
- Oumer, B. A.; Gaya, P.; Fernandez-Garcia, E.; Marciaca, R.; Garde, S.; Medina, M.; Nunez, M. (2001). Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocins producing adjunct culture. *Journal Dairy Research*, 68:117–129.
- Palladino, P.M.; Rodríguez, H.R.; Molina, R.A.; Ortigoza, G.; Moreno, K.; Chavez, M.; Masana, M.O. (2012). Inocuidad microbiológica de cuajos utilizados en la elaboración de quesos de cabra artesanales en el valle de Amblayo, provincia de Salta, Argentina. En: MICROAL 2012.
- Pangallo, D.; Drahovska, H.; Harichova, J.; Karelava, E.; Chovanova, K.; Ferianc, P.; Turna, J.; Timko, J. (2008). Assessment of environmental enterococci: bacterial antagonism, pathogenic capacity and antibiotic resistance. *Antonie van Leeuwenhoek* 94: 555–562. DOI 10.1007/s10482-008-9272-9.
- Parente, E.; Patel, H.; Caldeo, V.; Piraini, P.; McSweeney, P. (2010). RP-HPLC peptide profiling of cheese extracts: A study of sources of variation, repeatability and reproducibility. *Food Chemistry* 131:1552-1560.
- Park, Y.W.; Juarez, M.; Ramos, M.; Haenlein, G.F.W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68: 88-113.
- Pece, N.; Frau, F.; Tgo, J.; Larcher, G.; Paz, R. (2008). Estado de la situación de establecimientos tamberos caprinos de Santiago del Estero - Argentina. En: IV Congreso Internacional de la Red SIAL.
- Penna, A.L.B.; de Paula, A.T.; Casarotti, S.N.; Silva, L.F.; Diamantino, V.R.; Todorov, S.D. (2014). Overview of the functional lactic acid bacteria in the fermented milk products. En *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*. R. V. Ravishankar and Jamuna Bai. Pág. 113–148.
- Pérez Elortondo, F.J.; Aldamiz Echobarria, P.; Albisu, M.; Barcina, Y. (1998). Indigenous lactic acid bacteria in Idiazábal ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, 8: 725–732.
- Pérez-Pulido, R.; Abriouel, H.; Ben Omar, N.; Lucas, R.; Martínez-Cañamero, N.; Gálvez, A. (2006). Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food and Chemical Toxicology* 44: 2070–2077.
- Perotti, M.C.; Bernal, S.M.; Meinardi, C.A.; Zalazar, C.A. (2005). Free fatty acid profiles of Reggianito Argentino cheese produced from different starters. *International Dairy Journal*, 15: 1150–1155.
- Petrus, R.R.; Loiola, C.G.; Oliveira, C.A.F. (2010). Microbiological shelf life of pasteurized milk in bottle and pouch. *Journal Food Science*, 75: M36-M40.
- Pexara, A.; Solomakos, N.; Govaris, A. (2018). Q fever and prevalence of *Coxiella burnetii* in milk. *Trends in Food Science & Technology*, 71: 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.004>.

- Pícolo, A.; Giorgetti, M.; Chavez, D. (2008). Estudios socioeconómicos de la sustentabilidad de los sistemas de producción y recursos naturales. Zonas Agroecológicas Homogeneas. Salta-Jujuy. Ed INTA. ISSN 1851-6955.
- Picon, A.; Garde, S.; Avila, M.; Nuñez, M. (2016). Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses. *International Dairy Journal* 58: 14-22.
- Picon, A.; López-Pérez, E.; Torres, E.; Garde, S.; Nuñez, M. (2019). Contribution of autochthonous lactic acid bacteria to the typical flavour of raw goat milk cheeses. *International Journal of food microbiology*. 299:8-22.
- Pieniz, S.; de Moura, T.; Cassenego, A.; Andreatza, R.; Guedes Frazzon, A.; de Oliveira Camargo, F.; Brandelli, A. (2015). Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. *Food Control*. 51:49-54.
- Piredda, G. y Addis, M. (2003). The lamb rennet paste used in ewe's milk cheeses manufactured in Sardinia. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 54: 225–235.
- Pirisi, A.; Lauret, A.; Dubeuf, J.P. (2007). Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Ruminant Research*, 68:167–178.
- Pospiech, T. y Neumann, J. (1995). Genomic DNA isolation. Kieser (Ed). John Innes Center. Norwich NR4 7UH. United Kingdom.
- Poveda, J.M.; Sánchez-Palomo, E.; Pérez-Coello, M.S.; Cabezas, L. (2008). Volatile composition, olfactometry profile and sensory evaluation of semi-hard Spanish goat cheeses. *Dairy Science and Technology*, 88: 355–367.
- Poveda, J.M. y Cabezas, L., (2006). Free fatty acid composition of regionally-produced Spanish goat cheese and relationship with sensory characteristics. *Food Chemistry*, 95: 307–311.
- Pripp, A.H.; Stepaniak, L.; Sørhaug, T. (2000a). Chemometrical analysis of proteolytic profiles during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 10:249-253.
- Psoni, L.; Kotzamanides, C.; Andrighetto, C.; Lombardi, A.; Tzanetakis, N.; Litopoulou-Tzanetaki, E. (2006). Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 109: 109-120.
- Quigley, L.; O'Sullivan, O.; Stanton, C.; Beresford, T.P.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Cotter, P.D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5): 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>.
- Randazzo, C.L.; Caggia, C.; Neviani, E. (2009). Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods* 78: 1–9.
- Ranieri, M.L. y Boor, K.J. (2009). Short communication: Bacterial ecology of high-temperature, short-time pasteurized milk processed in the United States. *Journal Dairy Science* 92: 4833-4840.
- Ranieri, M.L.; Huck, J.R.; Sonnen, M.; Barbano, D.M.; Boor, K.J. (2009). High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *Journal Dairy Science* 92: 4823-4832.
- Rao, C.U.M.; Shankar, P.A.; Laxminarayana, H.; (1986). A study of enterococci occurring in milk and milk products. *Indian Journal of Dairy Science*, 39: 281–285.
- Raynal-Ljutovaca, K.; Le Papeb, M.; Gaborita, P.; Barrucanda, P. (2011). French goat milk cheeses: An overview on their nutritional and sensorial characteristics and their impacts on consumers' acceptance. *Small ruminant Research*. 101:64-72.

- Raynal-Ljutovaca, K.; Lagriffoulb, G.; Paccardb, P.; Guillet, I.; Chilliard, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research* 79:57–72.
- Raynal-Ljutovac, K.; Park, Y.W.; Gaucheron, F.; Bouhallab, S. (2007). Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* 68: 207–220.
- Reis, K.T.M.; Sousa, C.H.B.; Santana, E.H.W.; Roig, S.M (2013). Qualidade microbiológica do leite cru e pasteurizado produzido no Brasil: Revisão. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v.15, n. 10: 411-421.*
- Reviriego Herráez, C. (2009). *Lactococcus Lactis* productores de pediocina PA-1 y enterococos aislados de leche materna como agentes bioconservantes en quesos. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Ribeiro, J, J.C.; Oliveira, A.M.; Silva, F.G.; Haber García, L.N.; Oliveira Lobo C.M.; Alexandrino, V.; Tamanini, R.; Beloti, V. (2019). Influence of the microbiological quality of raw milk on the shelf life of pasteurized milk. *Food Science*. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n4p1469.
- Ribeiro, J. J.C.; Oliveira, A.M.; Silva, F.G.; Tamanini, R.; Oliveira, A.L.M.; Beloti, V. (2018). The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science, Madison, v. 101, n. 1, Pag 75-83. DOI: 10.3168/ jds.2017-13069.*
- Ribeiro, S.C.; Ross, R.P.; Silva, C.C.G. (2017). Characterization and application of antilisterial enterocins on model fresh cheese. *Journal of Food Protection*.80:1303-1316.
- Richardson, B. C. y Pearce, K. N. (1981). The determination of plasmin in dairy products. *N. Z. J. Dairy Science Technology, 16:209-220.*
- Rincon-Delgado, M. I.; Lopez-Hernandez, A.; Wijaya, I.; Rankin, S.A. (2012). Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. *Journal of Dairy Science, 95(3): 1128-1139.*
- Roginski, H.; Fuquay, J.; Fox, P. (2003). *Encyclopedia of dairy science*. Ed. Academic/Elsevier Science. Amsterdam. Pág. 2-500.
- Rogosa, M.; Mitchell, J.A.; Wiseman, R.F. (1951). A selective medium for the isolation of oral and faecal lactobacilli. *Journal of Bacteriology, 62: 132-133.*
- Rohlf, J.F. (1998). *NTSYSpc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0 User Guide*.
- Rossetti, L. y Giraffa, G. (año). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by ML3-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods, 63: 135- 144.*
- Rychlik, M.; Warmke, R.; Grosh, 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.*
- Rysstad, G. y Kolstad, J. (2006). Conference contribution: Extended shelf life milk-advances in technology. *International Journal Dairy Technology, 59: 85–96.*
- Samelis, J.; Bleicher, A.; Delbés Paus, C.; Kalkouri, A.; Neuhaus, K.; Montel, M.C. (2011). FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese. *Food Microbiology, 28: 76-83.*
- Samelis, J.; Lianou, A.; Kakouri, A.; Delbes, C.; Rogeli, I.; Bogovic-Matijasic, B.; Montel, M.-Ch. (2009). Changes in the Microbial Composition of Raw Milk Induced by Thermization Treatments Applied Prior to Traditional Greek Hard Cheese Processing. *Journal of Food Protection 72,4:783-790.*



- Sarantinopoulos, P.; Kalantzopoulos, G.; Tsakalidou, E. (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 76: 93-105.
- Sarantinopoulos, P.; Andrighetto, C.; Georgalaki, M.D.; Rea, M.C.; Lombardi, A.; Cogan, T.M.; Kalantzopoulos, G.; Tsakalidou, E. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 11: 621-647.
- Scaltritti, M.R. (2011). Desarrollo de una herramienta modelo para el control de peligro y calidad de sistema de producción lechero caprino. Tesis de maestría, Universidad Católica de Córdoba.
- Scaltritti, M.R. y Chavez, M. (2009). Parámetros de calidad de leche caprina para tres biotipos raciales en el Valle Central de la Provincia de Catamarca. En: III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Vol I. Código GP 51: 122.
- Schirru, S.; Todorov, S.D.; Favaro, L.; Mangia, N.P.; Basaglia, M.; Casella, S.; Comunian, R.; Franco, B.G.M.; Deiana, P. (2012). Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. *Food Control*, 25:309–320.
- Schroder, M.J.A.; Cousins, C.M.; McKinnon, C.H (1982). Effect of psychrotrophic post-pasteurization contamination on the keeping quality at 11 and 5°C of HTST-pasteurized milk in the UK. *Journal Dairy Research*, 49: 619-630.
- Scintu, M.F. y Piredda, G. (2007). Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products. *Small Ruminant Research* 68:221–231.
- Scintu, M.F.; Mannu, L.; Caria, A. (2004). Presence of spores of clostridium spp in ewes' raw milk. In: IDF Symposium on: The Future of the Sheep and Goat Dairy Sectors, Zaragoza, Spain, p. 187 (Special issue of the International Dairy Federation 0501/Part 3).
- Semedo, T.; Santos, M.A.; Lopes, M.F.S.; Figueiredo Marques, J.J.; Crespo, M.T.B.; Tenreiro, R. (2003). Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus? *Systematic and Applied Microbiology*, 26:13–22.
- Sharma, S.K.; Sehgal, N.; Kumar, A. (2003). Dry-reagent strips for testing milk pasteurization. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 36: 567–571.
- Sheehan, J.J.; Patel, A.D.; Drake, M.A.; McSweeney, P.L.; (2009). Effect of partial or total substitution of bovine for caprine milk on the compositional, volatile, non volatile and sensory characteristics of semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 19: 498–509.
- Sihufe, G.A.; Zorrilla, S.E.; Rubiolo, A, C. (2010). The influence of ripening temperature and sampling site on the proteolysis in Reggianito Argentino cheese. *Food Science and Technology*, 43:247–253.
- Silanikove, N.; Leitner, G.; Merin, U.; Prosser, C. G. (2010). Recent advances in exploiting goat's milk: quality, safety and production aspects. *Small Ruminants Research*, 89: 110-124.
- Silva, L.; Casella, T.; Gomes, E.S.; Nogueira, M.C.L.; Lindner, J.D.D.; Penna, A.L.B. (2015). Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo Mozzarella cheese. *Journal Food Science*, 80: M411–M417.
- Silva, R.; Cruz, A.G.; Faria, J.A.; Moura, M.M.; Carvalho, L.M.; Water, E.H; Sant'Ana, A.S. (2010). Pasteurized milk: Efficiency of pasteurization and its microbiological conditions in Brazil. *Foodborne Pathogen Disease*, 7: 217-219.
- Smit, G.; Smit, B.A.; Engels, W.J.M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *Microbiology Reviews*, 29: 591–610.

- Sneath, P. y Sokal, R.R. (1973). Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman and Company. San Francisco, USA, Pág. 574.
- Sousa, M.J.; Ardö, Y.; McSweeney, P.H.L. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11:327-345.
- Stanley, G. (1998). The Technology of Dairy Products. Cap. 2 en Microbiology of fermented milk products. (Ed.: Early, R.). Blackie Academic and Professional, Londres, Reino Unido. Pág. 50–80.
- Suarez, V.; Martinez, G.; Gianre, V.; Calvino, L.; Chavez, M.; Orosco, S. y Sánchez, V. (2013). Relaciones entre la variación del conteo de células somáticas y la inocuidad microbiológica de la leche de cabra. *Revista Veterinaria Argentina*, Vol. XXX N° 306.
- Suarez, V.H. (2012). Mastitis ovinas y caprinas. Diagnóstico y control. En: Programa de Ámbito Nacional Leche. Producción técnica-científica de Proyecto Cartera 2006- 2009 / 2010-2012. (Eds; Taverna M.; Comeron, E.A.; Suarez, V.H.) Producciones INTA, Argentina. Pág. 793-794.
- Suzzi, G.; Caruso, M.; Gardini, F.; Lombardi, A.; Vannini, L.; Guerzoni, M.E.; Andrighetto, C.; Lanorte, M.T. (2000). A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology*, 89: 267–274.
- Tabet, E.; Mangiab, N.P.; Mouannesb, E.; Hassouna, G.; Helalc, Z.; Deiana, P. (2016). Characterization of goat milk from Lebanese Baladi breed and his suitability for setting up a ripened cheese using a selected starter culture. *Small Ruminant Research*, 140:13–17.
- Taboada, N.; Van Nieuwenhove, C.; Lopez Alzogaray, S.; Medina, R. (2015). Influence of autochthonous cultures on fatty acid composition, esterase activity and sensory profile of Argentinean goat cheeses. *Journal of food composition and analysis* 40: 86-94.
- Taillez, P. (1998). Nuevos métodos para la selección de bacterias lácticas y el estudio de ecosistemas bacterianos complejos. VII Jornada Técnica Lactocasearia, Facultad de Ingeniería Química (UNL).
- Taverna, M.; Chavez, M.; Páez, R.; Cuatrín, A.; Negri, L. (2006). Caracterización de la aptitud tecnológica de la leche destinada a la elaboración de leche en polvo entera en la cuenca lechera centra. *Revista Argentina de Lactología*, N°23-2004/5 Pag 33-49.
- Taverna, M.; Calvino, L.; Páez, R.; Chavez, M.; Charlón, V.; Vanzini, V.; Abdala, A.; Castillo, A.; Cuatrín, A.; Gallardo, M. (2002). Manual de referencia para el logro de la leche de calidad. <http://rafaela.inta.gov.ar/publicaciones/>
- Taverna, M.A. y Coulon J.B. (2000). Caracterización de la composición fisicoquímica de la leche producida en la Cuenca Lechera Central de la Argentina. *La Calidad de la leche y de los quesos*. Pág. 88-113.
- Temcic, A.; Chauchan, K.; Kent, D.J.; Ralyea R.D.; Martin N.H.; Boor K.J.; Wiedman, M. (2016). Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *Journal Dairy Science*, 99:6105–6120.
- Teuber, M.; Meile, L.; Schwarz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:115-137.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Todorov, S.D.; Franco, B.D.M.; Wiid, I.J. (2014). In vitro studies of beneficial properties and safety of lactic acid bacteria isolated from Portuguese fermented meat products. *Beneficial Microbes*, 5:351–366.

- Tolle, A. (1980). The microflora of the udder. Factors Influencing the Bacteriological Quality of Raw Milk, International Dairy Federation Bulletin, Document 120: 4.
- Tomasula, P.M.; Mukhopadhyay, S.; Datta, N.; Porto-Fett, A.; Call, J.E.; Luchansky, J.B.; Tunick, M. (2011). Pilot-scale crossflow-microfiltration and pasteurization to remove spores of *Bacillus anthracis* (Sterne) from milk. *Journal of Dairy Science*, 94(9): 4277–4291. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3879>.
- Tormo, H.; Haimoud Lekhal, D. A.; Roques, C. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 210: 9–15.
- Trujilloa, A.J.; Buffaa, M.; Casalsb, I.; Fernandez, F.; Guamisab, B. (2002). Proteolysis in goat cheese made from raw, pasteurized or pressure-treated milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3:309–319.
- Tsakalidou, E.; Manolopoulou, E.; Kabarak, E.; Zoidou, E.; Pot, B.; Kersters, K.; Kalantzopoulos, G. (1994). The Combined Use of Whole-cell Protein Extracts for the Identification (SDS-PAGE) and Enzyme Activity Screening of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Greek Dairy Products. *Systematic and Applied Microbiology* 17(3):444-458.
- Tunick, M.H.; Ren, D.X.; Van Hekken, D.L.; Bonnaille, L.; Paul, M.; Kwoczak, R.; Tomasula, P.M. (2016). Effect of heat and homogenization on in vitro digestion of milk. *Journal of Dairy Science*, 99(6): 4124–4139. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10474>.
- Upadhyay, V.K.; Sousa, M.J.; Ravn, P.; Israelsen, H.; Kelly, A.L.; McSweeney, P.L.H. (2004). Use of exogenous streptokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Lait*. 84:527–538.
- USFDA, (2002). Part 131—Milk and cream. Code of Federal Regulations, Title 21, Food and Drugs. U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC.
- Utee, A.; Gorris, L.; Smid, E. (1998). Bactericidal activity of carvacrol toward the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174:233-238.
- Vandera, E.; Tsirka, G.; Kakouri, A.; Koukkou, A.I.; Samelis, J. (2018). Approaches for enhancing in situ detection of enterocin genes in thermized milk, and selective isolation of enterocin-producing *Enterococcus faecium* from Baird-Parker agar. *Journal of food microbiology* 281:23-31.
- Vatne, K.B. y Castberg, H.B. (1991). Processing and packaging aspects of extended shelf life products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 46: 98-100.
- Vázquez S, M. Suárez, H., Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas por bacterias ácido lácticas en la conservación de carnes. *Revista Chilena de Nutrición*. 36(1):64-71.
- Vega, S.; Gutiérrez, R.; Ramirez, A.; González, M.; Díaz-González, G.; Salas, J.; González, C.; Coronado, M.; Schettino, B.; Alberti, A. (2007). Características físicas y químicas de leche de cabra de razas Alpino Francesa y Saanen en épocas de lluvia y seca. *Revista Salud Animal*, 29 (3): 160-166.
- Walstra, P.; Geurts, T.; Noomen, A.; Jellema, A.; van Boekel, M. (2001). Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. Cap.3:125-126 y Cap. 23: 619-622.
- 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; Cap. 23: Cheese ripening and properties. Marcel Dekker, Inc.; Nueva York, Estados Unidos, pág. 601-638.
- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, 9: 189-19.
- Walstra, P. y Jenness, R. (1987). Química y física lactológica. Acribia, Zaragoza, Pag 423.

Welsh, J. y McClelland, M. (1990). *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.

Wilbey, R.A. (1996). Estimating the degree of heat treatment given to milk. *International Journal of Dairy Technology*, 49(4): 109–112. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1996.tb02501.x>.

Yvon, M. (2006). Key enzymes for flavor formation by lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61:16-24.

Zalazar, C.A.; Candiotti, M.C.; Mercanti, D.J.; Bergamini, C.V.; Meinardi, C.A. (2006). Maduración de quesos y su control. En *Avances en Microbiología, bioquímica y tecnología de quesos*. Ed. Jorge Reimheimer y Carlos Zalazar.

Zalazar, C.; Meinardi, C.; Hynes, E. (1999). *Quesos Típicos Argentinos: Una revisión general sobre producción y características*. Centro de Publicaciones. Universidad Nacional del Litoral., Santa Fe, Argentina.

Zhang, X.; Zhang, T.; Fang, H.H.P. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82:397-414.

Zumbo A.; Chiofalo, B.; Liotta, L.; Rundo-Sotera, V.; Chiofalo, V. (2004). Quantitative and qualitative milk characteristics of Nebrodi goats. *South African Journal Animal Science*, 34(1): 155-157.