



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y TECNOLÓGICA DE CEPAS ACIDO LÁCTICAS AISLADAS DE LECHE CRUDA DE OVEJA EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE QUESO ARTESANO DE TERUEL

ISABEL LATORRE DÍEZ

ESPECIALIDAD: QUÍMICA INDUSTRIAL

DIRECTOR: CARLOS E. RUBIO NAVARRO

MAYO DE 2011



*Al Gobierno de Aragón (Grupo Investigación Consolidado AO1 07) y al
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
(Proyecto PET 2007-01-C07-07) por la financiación de este trabajo.*

A mis tutores, Carmina Rota, Susana Loran, Carlos Rubio.

A mis padres, mi hermano, Dani y a mis abuelos.

RESUMEN

Este estudio trata sobre la caracterización bioquímica y tecnológica de las cepas aisladas de la leche cruda de oveja utilizada en el proceso de elaboración de queso artesano de Teruel.

Con objeto de identificar las cepas bacterianas autóctonas que mejores características poseen, se aíslan y analizan los microorganismos para conocer qué capacidad lipolítica, acidificante, de producción de CO₂ y proteolítica poseen.

Posteriormente dichas cepas pueden ser utilizadas como cultivo iniciador para obtener un producto único y con unas características propias de las queserías de Teruel, y así, obtener una Indicación Geográfica Protegida que promulgue y ensalce el consumo y la industria de la zona.

ÍNDICE

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	4
1. EL QUESO	5
1.1. Proceso de elaboración.....	5
1.2. Fenómenos bioquímicos.....	6
1.3. Fermentos lácticos	8
1.4. Las bacterias ácido lácticas	11
1.5. El metabolismo de las bacterias ácido lácticas	12
2. QUESO DE TERUEL.....	14
3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS DE LA LECHE CRUDA.....	17
EXPERIMENTAL	20
1. MATERIAL Y REACTIVOS	21
1.1. Equipo y material.....	21
1.2. Reactivos	21
2. RECUENTO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS A PARTIR DE LECHE CRUDA.....	22
2.1. Muestras.....	22
2.2. Recuento y siembra de bacterias ácido lácticas	22
2.3. Aislamiento	23
2.4. Conservación de las cepas	24
2.5. Revivificación de las cepas	24
3. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS.....	25
3.1. Catalasa	25
3.1.1. Material y reactivos	25
3.1.2. Procedimiento experimental	26
3.2. Tinción de Gram.....	26
3.2.1. Material y reactivos	26
3.2.2. Procedimiento experimental	27
3.3. Prueba KOH.....	28
3.3.1. Material y reactivos	28
3.3.2. Procedimiento experimental	28
3.4. Identificación por Galería API	28
3.4.1. Material y reactivos	29
3.5. Galería API 20 Strep	30
3.6. Galería API 50 CH	31

ÍNDICE

QUÍMICA INDUSTRIAL

4. PRUEBAS TECNOLÓGICAS	33
4.1. Evaluación de la actividad acidificante	33
4.1.1. Materiales y reactivos.....	33
4.1.2. Procedimiento experimental	33
4.2. Evaluación de la producción de gas.....	33
4.2.1. Materiales y reactivos.....	33
4.2.2. Procedimiento experimental	34
4.3. Evaluación de la actividad lipolítica	34
4.3.1. Materiales y reactivos.....	34
4.3.2. Procedimiento experimental	34
4.4. Evaluación de la actividad proteolítica	35
4.4.1. Materiales y reactivos.....	35
4.4.2. Instrumentación.....	36
4.4.3. Procedimiento experimental	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
5. RECUENTO Y AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN LECHE CRUDA DE OVEJA	39
5.1. Recuentos	39
5.2. Aislamiento	41
6. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE LA LECHE CRUDA DE OVEJA	41
7. PRUEBAS TECNOLÓGICAS	44
7.1. Actividad acidificante.....	44
7.2. Capacidad de producción de CO ₂	45
7.3. Actividad lipolítica.....	46
7.4. Actividad proteolítica.....	46
CONCLUSIONES.....	49
BIBLIOGRAFÍA	51
ÍNDICE DE TABLAS	54
ÍNDICE DE FIGURAS.....	56

ACRÓNIMOS

ATP	Adenosín Tri Fosfato
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CE	Comunidad Europea
DOP	Denominación de Origen Protegida
IGP	Indicación Geográfica Protegida
KAA	Kanamicina Esculina Acida
MRS	<i>Man Rogosa Sharpe</i>
MSA	Manitol Sal Agar
MSE	<i>Mayeux, Sandine y Elliker</i>
NIN	Ninhidrina
OPA	o-Ftaldialdehído
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
VP	<i>Voges Proskauer</i>

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El queso es un alimento que ha perdurado a lo largo de los siglos. Los orígenes del mismo están en discusión y todavía hoy no se pueden datar con exactitud aunque se estima que se encuentran entre el año 8000 a. C. y el 3000 a. C.

Probablemente surgió como una manera de conservar la leche, aplicándole sal y presión, antes de usar un fermento por primera vez, quizás al comprobar que los quesos hechos en estómagos de animales tenían una mejor y más sólida textura (gracias al cuajo). Estos primeros quesos probablemente tendrían un fuerte sabor y estarían intensamente salados, con una textura similar a los quesos feta o requesón.

Desde entonces, el proceso de elaboración del queso ha ido evolucionando hasta convertirse en lo que es hoy en día gracias en gran medida a la aplicación de los cultivos iniciadores, fermento o *starter*. Los cultivos iniciadores se definen como un cierto número de microorganismos en cantidades y composición conocida que comienzan la elaboración del producto de forma controlada y estudiada. Éstos varían las características entre unos quesos y otros, y favorecen la industrialización y la comercialización de forma más segura y eficaz en el aspecto sanitario, tecnológico, industrial y sensorial.

En el siglo XX el sector quesero experimentó una notable modernización gracias a los descubrimientos en el campo de la bacteriología, la química y la tecnología, pero hay que destacar que el producto artesanal hoy en día no se ha perdido.

España es, a nivel mundial, uno de los países con mejor y mayor producción de queso. Contamos con 23 Denominaciones de Origen y sigue en aumento. La industria quesera española la conforman un grupo heterogéneo donde coexisten pequeñas y medianas empresas junto a grandes industrias y grupos alimenticios tecnificados. Con el objetivo de dar un impulso a la industria quesera tradicional en Teruel se pretende obtener una Indicación Geográfica Protegida (IGP) para reconocer de este modo las labores artesanales y la distinción geográfica que proporcionan a este queso sus características únicas y un reconocimiento al producto.

El proyecto fin de carrera que se va a desarrollar se encuentra enmarcado dentro del proyecto de investigación titulado: "Estudio de microorganismos con interés higiénico, sanitario y tecnológico en el proceso de elaboración de queso de la IGP "Queso de Teruel" (INIA PET-2007-01-C07-07)". Se desarrollan en el área de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Veterinaria, siendo la investigadora principal la Dra. Carmen Rota García.

Uno de los objetivos de este proyecto de investigación es la caracterización microbiológica del proceso de elaboración de queso artesano de Teruel, por su implicación en las características organolépticas de éste.

En la caracterización de los microorganismos que intervienen en el proceso de elaboración de queso artesano de Teruel, el equipo de investigación está utilizando métodos dependientes e independientes de cultivo, mediante técnicas microbiológicas clásicas y moleculares. A través de este proceso conjunto, se estudia la evolución y biodiversidad de la flora microbiana en las distintas etapas del proceso de elaboración para ver cómo varían las poblaciones de microorganismos en función del tiempo y establecer científicamente el proceso de desarrollo del producto. Se pretende así construir una colección de los microorganismos aislados de leche cruda de oveja y de queso para seleccionar aquellas especies y cepas que pueden ser utilizadas como fermento autóctono, el cual sin modificar el carácter artesanal ni afectar a la seguridad del producto permita estandarizar el proceso de elaboración exigido en las marcas de calidad diferenciada. La idea es crear una mezcla única y autóctona que se diferencie de los fermentos industriales y que potencie las características típicas del queso de Teruel. En este sentido, el fin último es proporcionar al sector empresarial un protocolo estandarizado que establezca el proceso óptimo de elaboración de este producto, aspecto realizado en el pliego de condiciones de la IGP Queso de Teruel. Algunos autores han señalado que la microflora autóctona de la leche, con su diversidad de especies y cepas, parece ser la principal responsable de las propiedades organolépticas específicas de los quesos elaborados con leche cruda^[1].

El objetivo principal de este proyecto fin de carrera es contribuir al diseño de un fermento autóctono con el fin de estandarizar, mejorar y asegurar el proceso de elaboración del Queso de Teruel, respondiendo a las exigencias de las marcas de calidad diferenciadas.

Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Aislamiento de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) a partir de leche cruda de oveja utilizada en el proceso de elaboración de queso artesano de Teruel
2. Identificar mediante pruebas bioquímicas las cepas de BAL aisladas previamente.
3. Poner a punto técnicas de evaluación de las características tecnológicas de la microbiota ácido láctica: estudio de las actividades lipolítica, proteolítica, acidificante y de producción de CO₂.
4. Caracterizar tecnológicamente las cepas BAL autóctonas de leche cruda de oveja.

INTRODUCCIÓN

1. EL QUESO

Según el Código Alimentario Español, publicado en la Orden de 29 de noviembre de 1985 [\[2\]](#), el queso es el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido por separación del suero después de la coagulación de la leche natural, de la desnatada total o parcialmente, de la nata, del suero de la mantequilla o de algunos o de todos estos productos, por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior al de la leche.

El queso es además, uno de los principales productos agrícolas del mundo. Según la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) de las Naciones Unidas, en 2010 se produjeron en el mundo más de 20,6 millones de toneladas [\[3\]](#). Esta cantidad es superior a la producción anual de granos de café, hojas de té, granos de cacao y tabaco juntos. El mayor productor de queso es Estados Unidos, que asume un 30 por ciento de la producción mundial, seguido de Alemania y Francia [\[4\]](#).

1.1. Proceso de elaboración

La transformación de la leche en queso generalmente está constituida por seis etapas, y en función de los fermentos lácticos que se añadan a la leche obtendremos unas características finales u otras [\[5\]](#). Las etapas son:

- **Coagulación:** modificaciones fisicoquímicas de micelas de caseína (proteínas de la leche) causadas por la acción de enzimas proteolíticos y/o por la disminución del pH generado por el ácido láctico que determinan la formación de un agregado proteico denominado coágulo o gel. En el interior de este coágulo quedan retenidos los lípidos, el agua y las bacterias.
- **Desuerado:** separación del suero después de la rotura mecánica del coágulo. En esta parte se produce la separación de la parte sólida (cuajada) y líquida (suero). También ayuda en este proceso el moldeado de la masa y el prensado. Esta etapa permite la regulación de la humedad y del contenido en lactosa de la cuajada mediante desmineralización y deslactosado.
- **Moldeado:** es la etapa en la que se da forma al queso llenando los moldes con la cuajada desuerada.

- **Prensado:** en este proceso se completa la etapa de desuero mediante presión de la cuajada. También permite regular el contenido en humedad.
- **Salado:** incorporación de sal (NaCl) en la superficie o en la masa, bien por inmersión en salmuera o por salado seco. Este proceso tiene efecto conservante, ya que disminuye la actividad del agua, regulando la acción microbiana y enzimática favoreciendo al mismo tiempo la formación de la corteza y al sabor final.
- **Afinado o maduración:** conjunto de transformaciones bioquímicas (lipolisis, glicolisis, proteólisis) evaporación de agua y producción de la corteza. Estas transformaciones bioquímicas serán las que producirán la neutralización parcial del pH, y la formación de compuestos aromáticos (aminoácidos libres, ácidos grasos libres, etc.).



Figura 1: Etapa de moldeado

1.2. Fenómenos bioquímicos

Durante la transformación de la leche en queso tienen lugar una serie de procesos bioquímicos que son los que dan al mismo sus características organolépticas y nutritivas. Además, en función del iniciador (*starter*) utilizado al inicio, las bacterias mayoritarias ejercerán su influencia dándonos distintos aromas, sabores y texturas. Aunque el número de fenómenos que se dan en la elaboración del queso es muy grande, únicamente se van a explicar los que analizaremos posteriormente.

La capacidad fermentativa y consiguiente disminución del pH es una de las propiedades más importantes para la producción del queso, ya que éste descenso va a influir de forma bacteriostática en la flora alterante y patógena ^[6]. También contribuye en la textura final del queso, de modo que, por ejemplo, aquellos que posean un pH comprendido entre 5,2 y 5,5 tendrán una textura elástica (agregados proteicos de mayor tamaño) ^[6] y aquellos cuyo pH está alrededor de 4,8 poseen unos agregados proteicos más pequeños y su textura es de pasta corta, no cohesiva y desmenuzable ^[6]. El pH

nos determinará en el proceso de elaboración del queso, la cantidad de sal que absorberá la pasta; así, aquellos con un pH menor, absorberán menos cantidad de sal que los que poseen valores más altos de acidez^[7], lo que habrá de tenerse en cuenta en la etapa de salado.

Las bacterias lácticas heterofermentativas son las responsables de la producción de CO₂ y consecuentemente de la producción de ojos en la pasta del queso^[7]. La producción del dióxido de carbono viene determinada por el metabolismo de cada bacteria. En función de la cantidad de bacterias lácticas que posean este tipo de metabolismo y de su actividad, se producirá mayor o menor cantidad de gas que se repartirá por la pasta del queso quedando parte disuelto en la misma, otra parte difunde hasta la superficie y otra se queda en el interior de la pasta, formando burbujas que son los llamados ojos.

La lipólisis es la capacidad de hidrolizar los lípidos y liberar ácidos grasos. Éstos infieren al queso propiedades organolépticas, tanto de sabor como de aroma por los ácidos grasos volátiles^[8,9]. El mayor efecto de sabor por actividad lipolítica es debido a los ácidos grasos de cadena corta: el ácido butírico, el caprónico y el caprílico otorgan especialmente sabores fuertes y característicos. Sin embargo, otros ácidos grasos pueden ser degradados posteriormente en aldehídos o alcoholes que otorgan al queso sabores característicos, como puede ser el sabor del queso azul.

Los cambios que ocurren en las proteínas son los más importantes y característicos de la maduración del queso. Prácticamente todos los elementos nitrogenados del queso se encuentran en forma de proteínas no solubles en agua y que según avanza la maduración, se hidrolizan mediante enzimas dando lugar a compuestos más simples que sí son solubles en agua. Como producto final de la degradación proteica, aparecen aminoácidos que son unos de los responsables de la calidad nutritiva y sensorial del queso. Además, se obtienen productos de elevado peso molecular, solubles en agua también, que infieren sabor característico y constituyen junto a los aminoácidos y péptidos la fracción de nitrógeno soluble. Esto nos ayuda a entender que dependiendo del grado de proteólisis que sufra el queso en su maduración poseerá una estructura más o menos densa; si prácticamente toda la proteína se disocia en compuestos solubles, se obtendrá un queso de consistencia más blanda (por ejemplo el Camembert), por el contrario, los quesos duros sufren mucho menos la descomposición proteica (*cheddar* o *emmental* tienen una solubilidad del 25-35%)^[10].

De esta forma con el conjunto de fenómenos bioquímicos que suceden en el proceso de elaboración del queso, se obtienen las características típicas de cada uno de ellos, teniendo en cuenta que los microorganismos utilizados como cultivo iniciador modificarán las propiedades en función de sus propias características. De este modo, bacterias que posean gran capacidad acidificante producirán mucho ácido láctico y consecuentemente una gran bajada del pH, o aquellas que posean gran capacidad

proteolítica disociarán muchas proteínas para dar lugar a aminoácidos que modificarán la textura de la pasta, o el aroma final.

1.3. Fermentos lácticos

Pasteur en 1857 fue el primero en demostrar que los procesos de fermentación que sufría la leche tenían su origen en la actividad microbiana. Hasta ese momento, aquellos procesos tenían un origen desconocido y sus resultados eran imprevisibles y con calidad desigual. En el año 1895, H.W. Conn demostró que utilizar cultivos puros de bacterias en los procesos fermentativos generaba grandes ventajas respecto de los métodos anteriormente utilizados^[11]. A partir de entonces se comenzaron a utilizar y mejorar y actualmente están extendidos en diversas industrias (cárnia, vinícola, panaria, láctica...) mejorando las características de los procesos antiguos y favoreciendo la industrialización (procesos más cortos y seguros) así como las propiedades nutricionales y organolépticas.

Los fermentos lácticos se pueden definir como cultivos puros definidos y controlados de diferentes bacterias lácticas las cuales se añaden al inicio del proceso y que al multiplicarse en la leche y en el queso garantizan las propiedades buscadas^[5,6]. La selección de los cultivos iniciadores viene determinada por una serie de factores como, las capacidades bioquímicas (proteólisis, lipólisis, capacidad acidificante etc.), resistencia a los bacteriófagos, tolerancia a la sal, producción de compuestos antibióticos, etc. definiendo de este modo las características finales que poseerá el producto.

Al tratarse de cultivos puros es preciso presentar gran atención a la posible contaminación por especies extrañas que puedan ser aportadas por distintos medios ya que pueden influir en los distintos procesos que se dan lugar. También habrá que tener en cuenta la contaminación por bacteriófagos, virus que destruyen a las bacterias y modifican las composiciones de los cultivos iniciadores^[12].



Figura 2: Dos colonias de enterococos

Aunque muchas de las cepas lácticas son utilizadas en la industria, no todas infieren unas características deseables como cultivo iniciador (*starter*). Las propiedades y composición del *starter* variarán dependiendo de las características que se quieran obtener en el producto; por ejemplo, las bacterias termófilas son más utilizadas en la elaboración de yogur y de quesos de pasta cocida^[6], así como las bacterias heterofermentativas son más utilizadas para la elaboración de quesos con ojos, etc.

No obstante, seis criterios son la base de la elección de los cultivos iniciadores. El primero es la ausencia de patogenicidad o actividad tóxica, básico para la posible comercialización, el segundo es que produzca los cambios deseados (textura, aroma, sabor...), el tercer criterio es que deben tener la capacidad de dominar a la flora competitiva (dado que no van a ser los únicos microorganismos que haya en las materias primas, pero sí deben ser los mayoritarios), también deben tener buena capacidad de multiplicación y de propagación y tener capacidad de preservación, es decir, deben ser estables a las condiciones a las que se las va a someter; por último, han de mantener las características tecnológicas propias de estos microorganismos^[13].

La principal función de los cultivos iniciadores utilizados en la elaboración de queso es la producción de ácido láctico por fermentación de azúcares presentes en la leche (lactosa principalmente), creando unas condiciones favorables para^[14]:

- Favorecer la formación de la cuajada por enzimas coagulantes.
- Estabilizar y concentrar la cuajada favoreciendo el drenaje del suero.
- Prevenir o inhibir el crecimiento de la flora patógena y alterante mediante la reducción del pH.
- Contribuir a la formación de la textura y compuestos que infieran el aroma/sabor característicos.

Por todo ello es importante la caracterización tecnológica de los fermentos para poder conocer con exactitud cuáles serán las consecuencias de añadir un cultivo iniciador, así como la composición de microorganismos que éste posea para cuantificar la acción causada por los mismos. Además se ha observado que con frecuencia la actividad de los fermentos varía según el origen de la leche utilizada.

Los consumidores aprecian los quesos artesanos por sus singulares características de sabor y aroma, que son generalmente atribuidos a la actividad metabólica de la microbiota autóctona presente en la leche^[6]. El uso de los fermentos industriales facilita y simplifica el proceso de elaboración en gran medida, pero también conlleva una progresiva pérdida de las cepas autóctonas, así como una

uniformidad final en todos aquellos productos que utilicen los cultivos iniciadores estándares^[15]. Por estos motivos las queserías buscan su propio fermento, que les proporcione unas características únicas y les diferencie de los demás productos industriales a la vez que simplifiquen el proceso y estandaricen el método.

Comercialmente se utilizan 3 tipos de fermentos^[6]:

- Los fermentos de cultivos puros, formados por una sola cepa de bacterias lácticas (estreptococos mesófilos o termófilos, leuconostoc, lactobacilos termófilos). Este tipo de fermento tiene el problema de que es sensible a los virus bacteriófagos, por tanto acaba perdiendo eficacia. Como solución a este problema se utilizan en alternancia con otras cepas que no sean sensibles a los fagos.
- Fermentos mixtos, formados por una variedad de cepas seleccionadas. La utilización de este tipo de fermentos tiene el problema de la compatibilidad de las cepas. Algunos microorganismos pueden convertirse en dominantes, bien sea por su producción de bacteriocinas o por sus caracteres de crecimiento (tiempo de latencia y de generación cortos). También se utilizan en rotación para evitar la contaminación por fagos.
- Los fermentos naturales, comúnmente utilizados en Europa y que están formados por mezclas cuya composición exacta es indeterminada. Por ejemplo los cuajos artesanos utilizados en Los Alpes contienen generalmente especies diferentes de lactobacilos y de estreptococos. La diversidad de la flora de estas mezclas y el equilibrio que parece establecerse entre las cepas, tanto resistentes como sensibles a los fagos, hace que estos fermentos sean especialmente resistentes a estos virus.

A continuación se exponen, a modo de ejemplo, algunos de los microorganismos utilizados en la elaboración de distintos quesos conocidos en la industria:

- *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* usados en el queso Provolone y en el Pecorino romano.
- *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc cremoris* y *Streptococcus diacetylactis* en el queso Gouda.
- *Streptococcus lactis* y/o *Streptococcus cremoris* en el queso cheddar.



Figura 3: En la parte superior de izquierda a derecha: Cheddar, Camembert y Manchego. En la parte inferior: Pecorino Romano, Provolone y queso azul.

1.4. Las bacterias ácido lácticas

Se llaman bacterias ácido lácticas (BAL) a aquellas bacterias Gram positivas que son ácido tolerantes (activas en rangos de pH entre 4,8 y 9,6), inmóviles, no pigmentadas, no producen catalasa, ni reducen los nitratos y no forman esporas. Además una de sus principales características es la capacidad de fermentar los azúcares y transformarlos en ácido láctico^[5,6]. Se encuentran ampliamente en la naturaleza y en el tracto digestivo de animales y humanos. Son utilizadas en la industria alimentaria para la producción de lácteos (yogures, cuajadas, leche etc.) así como para otros alimentos, como productos cárnicos curados o embutidos.

Las bacterias ácido lácticas son aero-anaerobias facultativas, esto quiere decir que su crecimiento es mejor en ausencia de O₂ pero pueden vivir en su presencia. Estas bacterias tienen necesidades nutricionales exigentes; requieren de aminoácidos específicos y vitamina B, además no son capaces de metabolizar hidratos de carbono complejos^[7,16].

En función de la cepa, su morfología puede ser cocoide o bacilar (en forma de esfera o de bastón respectivamente), las podemos encontrar agrupadas en cadenas (estrepto, cadenas flexibles), por parejas, en tétradas, grupos o racimos; pueden ser mesófilas o termófilas (temperatura óptima de crecimiento de 30 a 37 °C o de 45 °C respectivamente), halotolerantes serán aquellas que toleran la sal y no halotolerantes aquellas que en presencia de la misma no pueden crecer. También pueden ser homofermentativas o heterofermentativas en función del tipo de fermentación de los hidratos de carbono^[5,16].

Según el criterio taxonómico genético hay 12 géneros de bacterias lácticas que comprenden *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* y *Weissella*^[17]. De todas ellas normalmente cuatro se encuentran en los cultivos lácticos iniciadores: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Un quinto género, *Enterococcus*, se encuentra en algunos fermentos o cultivos iniciadores mixtos debido a su efecto beneficioso en el desarrollo del aroma, sabor y textura de los productos lácteos^[17].

1.5. El metabolismo de las bacterias ácido lácticas

Las BAL pueden clasificarse en función de su metabolismo fermentativo “en homofermentativas y heterofermentativas” (Figura 4)^[5,6]. Las primeras generan dos moles de ATP por cada mol de glucosa consumida y con un uso de oxígeno limitado. Utilizan la vía glucolítica de *Embden-Meyerhof-Pamas* para formar dos moles ácido láctico. Dentro de las bacterias con metabolismo homofermentativo se encuentran *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*.

Las BAL heterofermentativas utilizan la ruta de la pentosa fosfato, en la que un mol de glucosa-6-fosfato es deshidrogenada a 6-fosfogluconato y luego descarboxilada para producir un mol de CO₂. El resultante, pentosa-5-fosfato, se disocia y se metaboliza luego en ácido láctico, tal como en la reacción de los homofermentadores. Teóricamente, los productos finales (incluyendo el ATP) son producidos en cantidades equimolares a partir de la síntesis de un mol de glucosa. Las BAL heterofermentativas incluyen: *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* y el grupo III de *Lactobacillus*.

En quesería, las bacterias del fermento aseguran la predominancia de la fermentación homoláctica, aunque habrá ciertos microorganismos que produzcan la vía heteroláctica. El ácido láctico y los lactatos formados como consecuencia de la fermentación de la lactosa, pueden ser a su vez metabolizados posteriormente por los mohos y levaduras presentes en el queso, a CO₂ y H₂O a través del ciclo de *Krebs*. Por ejemplo, los mohos del género *Propionibacterium* lo transforman en acetato, propionato y CO₂, siendo los responsables de la “abertura” de los quesos de pasta cocida (fermentación propiónica)^[6].

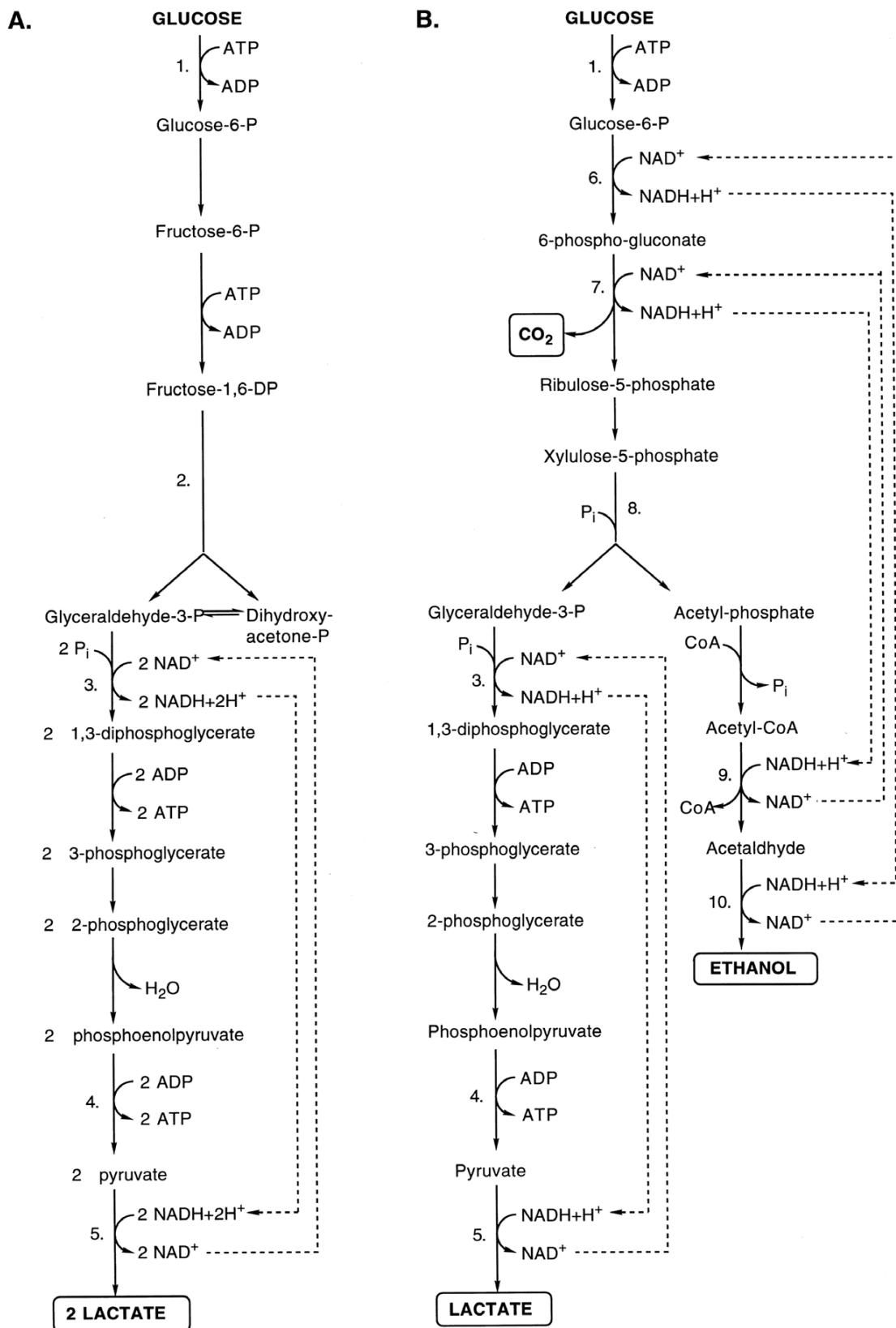


Figura 4: Tipos de fermentación de azúcares de las BAL: camino seguido por las homofermentativas (A); fermentación heteroláctica (B)

2. QUESO DE TERUEL

La pluralidad geográfica y climática de España ha permitido el desarrollo de numerosas variedades de quesos, algunos de ellos de renombre internacional. A lo largo de toda la geografía encontramos quesos de leche de vaca, cabra y oveja o de mezclas de ellas. Los hay frescos y curados, de pasta prensada o no, de leche cruda y pasteurizada, cremosos, azules. Algunas regiones son más conocidas por sus quesos que otras, siendo singularmente conocido el queso manchego. No obstante hay 23 quesos con denominación de origen en España y muchísimos más que carecen de ella [\[18\]](#).

La industria quesera española, la conforman un grupo bastante heterogéneo en donde coexisten pequeñas y medianas empresas, de carácter local y artesanal, junto a grandes industrias y grupos alimenticios altamente tecnificados. El sector tradicional ha experimentado una enorme transformación en su estructura. A pesar de tratarse de un segmento de producción limitada, su acusado carácter artesanal sigue actuando de transmisor de la esencia de la cultura española [\[18\]](#).

En la Comunidad Autónoma de Aragón hay en la actualidad una apuesta clara por el queso artesanal de Teruel, producto en torno al cual se va conformando un sector que aúna tradición, ideas, ilusión y calidad [\[18\]](#). Los artesanos del queso salpican toda la provincia de Teruel, unos nutriéndose de saberes ancestrales, otros dotándose de conceptos y técnicas novedosas en producción lechera y comercialización quesera. Todos ellos son conscientes de que el consumo aumenta y la calidad es el lugar común de quienes apuestan por el futuro y la sostenibilidad [\[18\]](#).



Figura 5: Queso artesano de Teruel

En este sentido, las Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) e Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) constituyen el sistema utilizado en España para el reconocimiento de la calidad diferenciada como consecuencia de características propias debidas al medio geográfico en el que se

producen las materias primas, se elaboran los productos y se considera el factor humano que participa de las mismas ^[19].

El Reglamento (CE) 510/2006 del Consejo, de 20 de marzo de 2006, sobre protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios, establece las definiciones de Denominación de Origen Protegida (DOP) y de Indicación Geográfica Protegida (IGP).

Así, en dicho Reglamento se define una DOP como:

El nombre de una región, de un lugar determinado o, en casos excepcionales, de un país, que sirve para designar un producto agrícola o un producto alimenticio:

- Originario de dicha región, de dicho lugar determinado o de dicho país,
- Cuya calidad o características se deben fundamental o exclusivamente al medio geográfico con sus factores naturales y humanos, y
- Cuya producción, transformación y elaboración se realicen en la zona geográfica delimitada.

Y una IGP como:

El nombre de una región, de un lugar determinado o, en casos excepcionales, de un país, que sirve para designar un producto agrícola o un producto alimenticio:

- Originario de dicha región, de dicho lugar determinado o de dicho país,
- Que posea una calidad determinada, una reputación u otra característica que pueda atribuirse a dicho origen geográfico, y
- Cuya producción, transformación o elaboración se realicen en la zona geográfica delimitada

En este contexto, la producción de Queso de Teruel está todavía en alza, con muchas posibilidades y que debe ampararse en la IGP para obtener mayores beneficios. La obtención de esta denominación de calidad asegura y protege la diferenciación del producto turolense y además obliga a aplicar todas las normas comunes en las fases de producción y transformación. Esta estricta normativa impide los fraudes y la competencia desleal y facilita la cooperación entre productos y empresas amparadas bajo la IGP.

El pliego de condiciones de la Indicación Geográfica Protegida “Queso de Teruel” (mayo, 2007) en trámite de solicitud, define el producto como queso de pasta prensada, graso, curado y elaborado con leche cruda de oveja o cabra; establece una forma lobulada cuyas cuñas representarán un corazón. Esta forma octogonal inspirada en la estrella de ocho puntas enraíza con la historia mudéjar de Teruel y garantiza al consumidor la procedencia del producto a simple vista [\[18\]](#).

La corteza es dura, de color marfil o amarillo o de color ceniciente por la proliferación de mohos durante la fase de maduración. El olor se caracteriza por matices a cítricos, frutos secos y notas florales, presentando un sabor equilibrado e intenso y el aroma recuerda el sabor de la leche madurada que se hace más patente cuanto mayor es la salivación. Es característico una ligera acidez y moderado picor. En cuanto al método de elaboración se indica que se podrán añadir en un futuro fermentos autóctonos previo estudios de los mismos y siempre que el queso mantenga sus características tradicionales [\[18\]](#).



Figura 6: Queso artesanal vista interior y exterior

La grasa de la leche es el nutriente que más influye en el sabor del queso. La leche entera es la más rica en grasas, pero en ciertos casos para poder reducir el contenido graso de los quesos se usa su versión desnatada o semidesnatada, lo cual también puede disminuir el sabor del producto final.

La materia prima con la que se elabora el Queso de Teruel que nos ocupa es la leche de oveja cruda. La leche de oveja se diferencia de otras leches principalmente en su composición de materia grasa y de proteínas. Las propiedades nutricionales de la leche varían en función de numerosos parámetros, como el clima, la alimentación, la raza de las ovejas etc., pero básicamente está compuesta por:

- Agua: 860 g/L
- Materia grasa: de 70 a 75 g/L
- Proteínas: de 55 a 60 g/L
- Lactosa: de 45 a 50 g/L

- Minerales: de 10 a 12 g/L
- Extracto seco: 190 g/L



Figura 7: Ganadería ovina

La leche de oveja es muy buena como materia prima para la elaboración de quesos dado que presenta unas propiedades óptimas para su tratamiento. Debido a la gran cantidad de minerales, éstos actúan como reactivos tampón y conservan el pH de la leche fresca. Además, recién ordeñada, la leche posee unas sustancias antimicrobianas (lectinas) que preservan la calidad microbiana para que éstos no aumenten y se deteriore. Este mecanismo de protección puede ser contraproducente ya que pueden actuar en contra de los fermentos lácticos que se añadirán en los primeros pasos del proceso^[6].

La leche de oveja produce una cuajada dura, que produce una pasta de aspecto blanco y no posee sabores amargos^[7]. Los sabores primordiales de este tipo de quesos se deben principalmente al elevado contenido en materia grasa (sobre todo de ácidos grasos caprílico y cáprico).

Dado su elevado contenido en grasa y proteínas su rendimiento quesero es casi el doble que en el caso de la leche de vaca, así se obtiene el doble de pasta de queso para la misma cantidad de leche^[5].

3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS DE LA LECHE CRUDA

Son varios los trabajos que han llevado a cabo el aislamiento e identificación de cepas lácticas a partir de la leche y/o el proceso de maduración del queso, tanto con el objetivo de conocer los microorganismos que intervienen en la elaboración del queso y estudiar su presencia y evolución a lo largo del proceso de maduración de este alimento^[20], como para caracterizar tecnológicamente estas cepas e incluirlas posteriormente en los fermentos iniciadores^[7,21]. La metodología utilizada para el análisis e identificación de estos microorganismos ha experimentado un notable avance en los últimos años, lo que está ligado sin duda al desarrollo de las técnicas de biología molecular.

El análisis microbiológico se realiza en las distintas etapas del proceso de elaboración para ver cómo varían las poblaciones microbianas en función de la maduración y establecer científicamente el proceso de desarrollo del producto.

Estas bacterias poseen necesidades nutricionales específicas, son sensibles a los cambios de pH, presencia de sal, de carbohidratos, necesitan vitaminas para su crecimiento (especialmente la vitamina B) etc. Por este motivo, hay gran cantidad de medios de cultivo distintos para el aislamiento de las BAL.

Inicialmente, la muestra debe diluirse en un medio que no favorezca el crecimiento de las bacterias y se mantengan estables antes de su inoculación en el medio sólido, para su recuento y aislamiento. Algunos de los medios comúnmente utilizados, como puede ser el tampón fosfato pueden dañar a las bacterias y de este modo obtener recuentos menores de los que realmente se tiene. Tanto el agua de peptona al 0,1% como el citrato de sodio al 2% pueden utilizarse para la dilución de las BAL. Este último, estabiliza mejor aquellas muestras que poseen mayor cantidad de grasa, como es el caso de la leche de oveja cruda [\[12\]](#).

Los medios sólidos son muy importantes en esta fase de aislamiento ya que gracias a ellos podemos hacer una primera selección de los microorganismos, en función de sus necesidades nutricionales. Así, dependiendo de las bacterias que se desean aislar, se utilizan medios con nutrientes que favorezcan su crecimiento. También la temperatura será un factor determinante para la obtención de microorganismos.

Por ello los medios de cultivo más utilizados para el recuento y aislamiento de bacterias ácido lácticas son: *Man Rogosa Sharpe* (MRS) para el aislamiento del género *Lactobacillus*, M17 suplementado con azúcares para el aislamiento de los géneros *Lactococcus* y *Streptococcus*. Para favorecer el crecimiento del género *Leuconostoc* y *Enterococcus* se utilizan los medios *Mayeux, Sandine y Elliker* (MSE) y Kanamicina Esculina Acida (KAA), respectivamente.

Las colonias tienen un aspecto morfológico muy similar unas a otras, siendo casi todas de aspecto blanco brillante o amarillento, de pequeño tamaño y forma redondeada. El único medio que produce algún tipo de coloración o de variación en el aspecto de las colonias es el KAA, que al poseer esculina, ésta reacciona con las bacterias dando un aspecto a las colonias de color negro/gris metálico con el centro más oscuro que los bordes, pudiendo diferenciarlas así de las distintas cepas bacterianas favoreciendo un primer *screening* de las colonias.

Estas técnicas de aislamiento clásicas han sido utilizadas ampliamente a lo largo de la historia de la microbiología y ha ido evolucionando y modificando los nutrientes para, como en el caso del KAA,

mostrar de manera más visible y efectiva las cepas que se quieren aislar, y no un grupo de colonias que se parecen entre sí.

Sin embargo, los métodos más efectivos en la detección y la identificación son aquellos llamados métodos de biología molecular. Éstos extraen el ADN de las bacterias, lo multiplican mediante una serie de procesos y finalmente lo leen comparándolo con un patrón de una base de datos. Así se conoce con total exactitud cuál es la cepa que se está analizando.

EXPERIMENTAL

1. MATERIAL Y REACTIVOS

A continuación se enumeran los equipos y reactivos que se han utilizado a lo largo del desarrollo experimental de este trabajo. Los empleados en las distintas técnicas ensayadas se citan junto con éstas en sus correspondientes apartados.

1.1. Equipo y material

- Estufa de cultivo 30 °C de J.P.Selecta (2000237).
- Estufa de cultivo 37 °C de Memmert (D06062).
- Estufa de cultivo 45 °C de J.P.Selecta (modelo 207).
- Congelador de Sanyo (MDF-U32865).
- Asas de siembra de acero.
- Espátulas de acero inoxidable.
- Balanza granatario monoplato Kern 440-45N, con una exactitud de 0,1 g.
- Placas de Petri estériles de Gosselin (BP93B-15).
- Rotatubos. IKA (03.169125).
- Pipetas de vidrio graduadas de distintos volúmenes (1 mL, 5 mL, 10 mL, y 25 mL).
- Tubos de ensayo de vidrio de distintos volúmenes.
- Micropipetas 20-200 µL y 100-1000 µL de Dragon Med.
- Crioviales de congelación de Nirco S.L. (CL2ARBEPS).

1.2. Reactivos

Los reactivos y disolventes empleados fueron los siguientes:

- Agua, resistividad 18,2 MΩ cm (25 °C), carbono orgánico total (COT) 1-5 ppb, obtenida a partir de un sistema de purificación Milli-Q Gradient.

- Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) de Panreac (121656.1211).
- Cloruro de sodio (NaCl) de Panreac (131659.1211) del 99,5% de pureza.
- M17 agar de Merck (1.15108.0500).
- Kanamicina Esculina Acida (KAA) agar de Merck (105222).
- *Mayeux, Sandine y Elliker* (MSE) de Biokar Diagnostics (2914-01-12).
- Medio *Man Rogosa Sharpe* (MRS) caldo de Merck (110661).
- Medio MRS agar de Merck (110660).
- Medio *Brain Heart Infusion* (BHI) caldo de Merck (110493).
- Medio BHI agar de Merck (113825).

2. RECUENTO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS A PARTIR DE LECHE CRUDA

2.1. Muestras

La leche cruda de oveja *Assaf* objeto de estudio, proviene de dos queserías situadas en la provincia de Teruel y pertenece a tres lotes diferentes de fabricación. La muestra se almacena en condiciones estériles y debe mantenerse en refrigeración (entre 0 y 4 °C) hasta su llegada al laboratorio y posterior análisis, el cuál debe realizarse en un tiempo inferior a 24 h.

2.2. Recuento y siembra de bacterias ácido lácticas

Para el recuento de las bacterias ácido lácticas presentes en la leche de oveja cruda, se parte de 10 mL de leche cruda de oveja más 90 mL del diluyente, citrato de sodio al 2%, para realizar la dilución 1:10 (dilución 1). Una vez diluida la muestra, se realizan otras tres diluciones decimales mediante siembra de un 1 mL en 9 mL de solución salina al 0,9%.

A partir de las diluciones anteriores se siembra en placa, por duplicado, bien mediante siembra en masa o extensión en superficie. Para la siembra en masa se parte de 1 mL de inóculo y posteriormente se añade el medio de cultivo. Para el método por extensión en superficie, se siembra 0,1 mL de inóculo sobre la superficie del medio que se homogeniza mediante asa de Drigalsky. Los diferentes medios de

cultivo específicos para cada grupo microbiano, así como las condiciones adecuadas de incubación se indican en la Tabla 1.

Tabla 1: Siembra, medio y condiciones de cultivo para algunas BAL

Género	Siembra	Medio	Condiciones de incubación
<i>Lactobacillus</i>	Masa	MRS	30 °C / 48-72 h.
<i>Lactococcus</i>	Superficie	M17 + 0,5% lactosa	25 °C / 48-72 h.
<i>Streptococcus</i> mesófilos	Superficie	M17 + 0,5% lactosa	37 °C / 48-72 h.
<i>Streptococcus</i> termófilos	Superficie	M17 + 0,5% lactosa	45 °C / 48-72 h.
<i>Enterococcus</i>	Superficie	KAA	37 °C / 24-48 h.
<i>Leuconostoc</i>	Superficie	MSE	30 °C / 72 h.

2.3. Aislamiento

Tras el recuento de colonias se seleccionan aquellas que poseen distintas morfologías. Para ello se arrastran con asa de siembra, se inoculan en caldo de cultivo y se incuban a la temperatura óptima para cada grupo microbiano. Una vez crecidas en el medio líquido se siembran en agar nutritivo y se observa el crecimiento tras la incubación para comprobar que se trata de cultivo puro (Figura 9).

- MRS a 30 °C: G^{os} *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*.
- BHI a 37 °C: G^{os} *Enterococcus* y *Streptococcus* mesófilos.
- BHI a 45 °C: G^o *Streptococcus* termófilos.

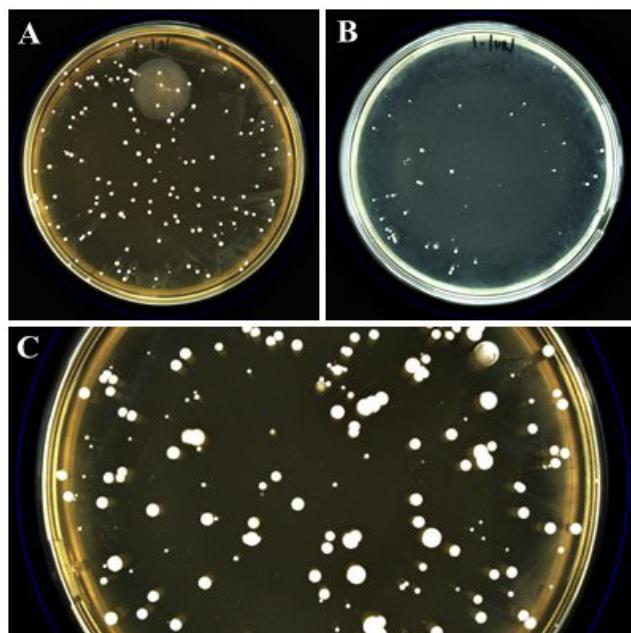


Figura 8: Placa con colonias de lactococcus (A); placa con leuconostoc (B); Streptococcus mesófilos (C)

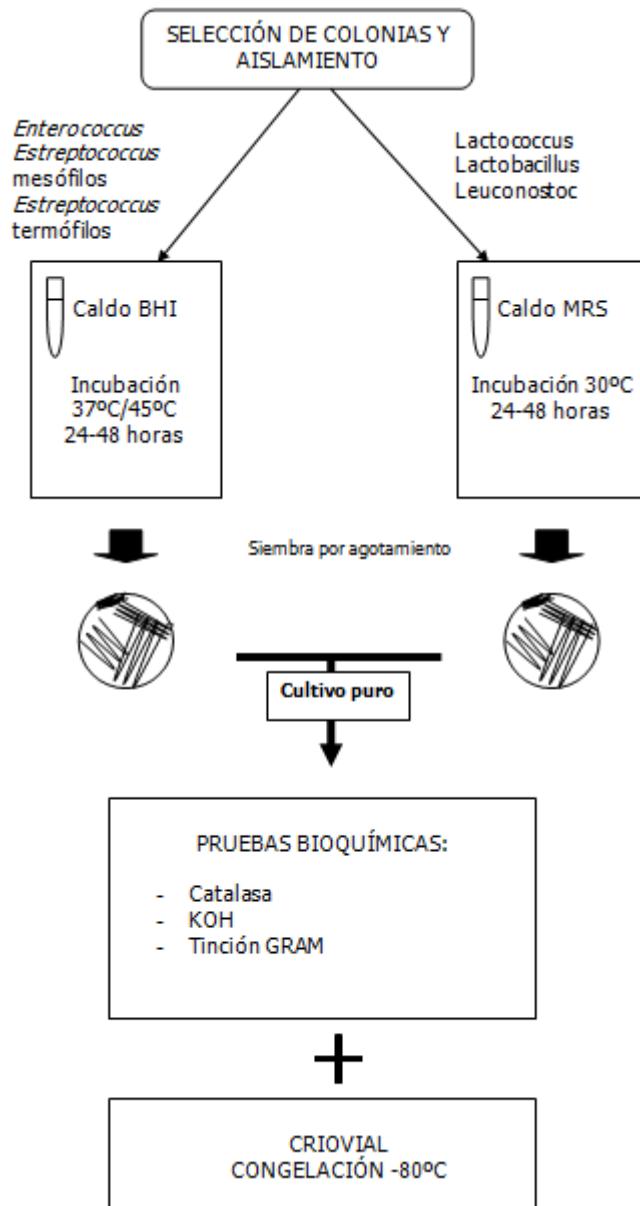


Figura 9: Selección de colonias y aislamiento

2.4. Conservación de las cepas

Las cepas aisladas fueron conservadas en congelación en viales de criocongelación a -80 °C. Cada vial está compuesto por una serie de bolitas de vidrio poroso y de líquido criogénico. La finalidad de dichos materiales es facilitar la adherencia de los microorganismos y asegurar la supervivencia del máximo número de bacterias posibles mientras se encuentran almacenados ^[7].

2.5. Revivificación de las cepas

Para la revivificación de las cepas guardadas en congelación, se extrae del criovial con ayuda de aguja estéril, una de las bolas en la que se encuentran adheridas las bacterias y se introduce en el caldo

de cultivo óptimo para cada bacteria (MRS o BHI). La siembra se realiza dentro de la cámara de flujo laminar y cerca del mechero para tener ambiente aséptico. Posteriormente, se incuba cada tubo en estufa a 30 °C o 37 °C (MRS y BHI respectivamente) durante 24-48 horas.

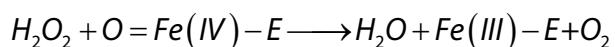
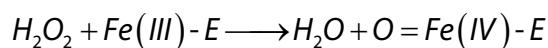
3. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS

Las pruebas bioquímicas son un primer paso para la identificación microbiana. Se parte de los organismos obtenidos en la muestra de leche y se utilizan diferentes pruebas bioquímicas para confirmar o descartar los microorganismos aislados.

3.1. Catalasa

La catalasa es una enzima que cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno H_2O_2 en oxígeno O_2 y agua H_2O . El peróxido de hidrógeno se encuentra en el metabolismo de muchos organismos vivos como consecuencia del uso de azúcares por vía oxidativa, y es utilizado, entre otras cosas, como reactivo antimicrobiano. Casi todas las bacterias aerotolerantes son catalasa positivas, excepto la mayoría de las bacterias lácticas^[22].

La reacción de descomposición se realiza en dos etapas:



Donde Fe-E representa el núcleo de hierro del grupo hemo unido a la enzima que actúan como cofactores.

De esta manera, a partir de una prueba sencilla, se puede realizar un primer proceso de selección, descartando aquellos organismos que resulten catalasa positivos.

3.1.1. Material y reactivos

- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% p/v de Panreac (141077).
- Portaobjetos de vidrio.

3.1.2. *Procedimiento experimental*

El procedimiento de la prueba de la catalasa consiste en añadir una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos de vidrio. Posteriormente se obtiene mediante raspado en placa de agar una colonia del cultivo (puro) a analizar y se deposita sobre la gota de agua en el portaobjetos. Mezclando la colonia con el agua, se observa en segundos la aparición de burbujas de O₂. Si aparecen burbujas la prueba resulta positiva, y si no, el resultado será catalasa negativa [\[15\]](#).

3.2. *Tinción de Gram*

Esta prueba bioquímica es una de las más importantes dentro de la microbiología y es ampliamente utilizada para la clasificación de microorganismos. Debe su nombre al bacteriólogo Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884.

Mediante la observación al microscopio se puede determinar el tipo de microorganismo, bacteria o levadura, su morfología (coco o bacilo), el tipo de agrupaciones que presenta y las características de su membrana celular.

La diferencia entre bacterias Gram positivas y Gram negativas fue determinada por Woese en 1987, quien concluyó que ambas se diferenciaban debido a la capacidad que tienen las Gram positivas de retener los iones de azul violeta en presencia de alcohol. Esto se debe a las diferencias que existen entre ambas pareces celulares [\[23\]](#). Así, la membrana de las bacterias Gram positivas es más gruesa que la de las Gram negativas, y sus composiciones también son muy distintas. Las bacterias Gram negativas poseen una membrana celular compuesta principalmente por lipopolisacáridos, fosfolípidos, proteínas, lipoproteínas y menos del 10% de peptidoglucanos. Sin embargo, las membranas de las bacterias Gram positivas contienen mayoritariamente peptidoglucanos (más del 30%), polisacáridos, ácido teicoico o ácido teicurónico (o sulfano de mercurio). Como vemos estas últimas apenas tienen lípidos en sus membranas celulares.

3.2.1. *Material y reactivos*

- Portaobjetos de vidrio
- Kit de tinción Gram de Merck (1.18855.0001) compuesto por:
 - Azul violeta
 - Lugol

- Solución decolorante
- Safranina
- Microscopio Laborlux 11. Leitz.

3.2.2. *Procedimiento experimental*

El procedimiento comienza añadiendo una gota de agua destilada estéril a un portaobjetos y recogiendo, mediante asa de siembra, una colonia de una placa de agar con crecimiento puro. Una vez extendida la colonia con la gota de agua, se realiza el secado de la misma y la fijación de la colonia; con este proceso sobre el mechero, las bacterias mueren y quedan fijas en el portaobjetos. Éste se lleva al lugar donde se realiza la tinción. Primero se añade azul violeta encima de la colonia y se deja penetrar durante 1,5 min. Con este tinte todas las bacterias, tanto Gram positivas como negativas se tiñen de azul púrpura. Se enjuaga con abundante agua y se escurre. Posteriormente se añade lugol (solución de I_2+KI con concentración de 150 mg/mL), un mordiente cuya función es penetrar en las células y formar un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta. Se espera 2 minutos y se enjuaga el lugol. Una vez escurrido se añade la solución decolorante, se deja reposar de 15 a 20 segundos y se enjuaga con agua nuevamente. Por último, se añade una tinción de contraste como es la safranina que dejará un color rosa-rojo a las bacterias que no han podido retener el azul violeta dentro de su membrana celular; éstas son las Gram negativas; se espera 1,5 min y se aclara con abundante agua.

Una vez seco el portaobjetos, se le añade una gota de aceite y se mira al microscopio con objetivo de 1000 aumentos.

Las bacterias que se observen de color azul-violeta corresponden a las Gram positivas, y aquellas que se vean de color rosa-rojizo serán las Gram negativas.

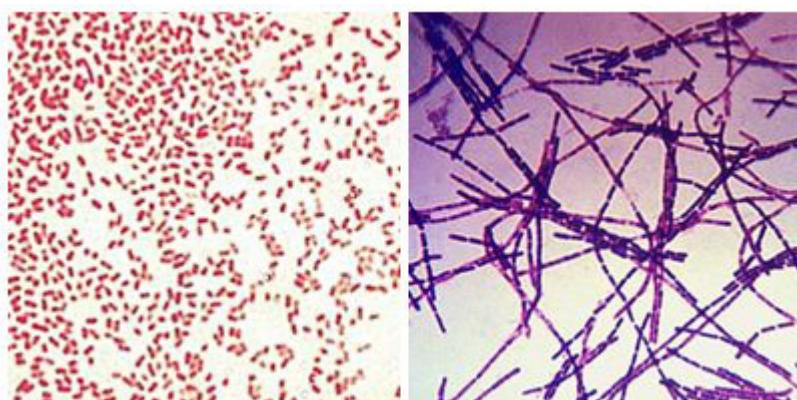


Figura 10: Izquierda: pseudomonas Gram (-). Derecha: cadenas de bacilos Gram (+)

3.3. Prueba KOH

Esta prueba es un método rápido de confirmación de la tinción Gram. La ausencia de formación de hilo mucoide nos informa de la resistencia de la pared bacteriana a la solución alcalina, de modo que si la prueba KOH nos da resultado negativo (no hay hilo mucoide), la bacteria será Gram positiva, y viceversa.

3.3.1. *Material y reactivos*

- Hidróxido de potasio (KOH) de Panreac (181521.1211).
- Portaobjetos de vidrio

3.3.2. *Procedimiento experimental*

El método utilizado es similar al de la catalasa. Se recoge por raspado una colonia de la placa de agar con la cepa crecida y se lleva a un portaobjetos. Se le añade una gota de KOH al 3% y se observa la aparición de hilo mucoide.

3.4. Identificación por Galería API

Las galerías API son unos test comercializados por la casa bioMerieux que simplifican los análisis bioquímicos realizando la identificación microbiana mediante un sistema multipruuebas. Son unas tiras con unos pocillos que contienen reactivos deshidratados que, en función del microorganismo que se inocula y se introduzca, reaccionarán produciendo unos colores u otros. De este modo, con comparación colorimétrica se puede obtener qué microorganismo se ha analizado y con qué porcentaje de seguridad.

Para conocer el microorganismo analizado y su porcentaje de fiabilidad se llevan los datos obtenidos en las lecturas a la base de datos de la página web de los sistemas API^[24].



Figura 11: Galería API 50 CH a las 48 h de incubación

3.4.1. Material y reactivos

- Galería API 20 Strep de Biomerieux (20600).
- Galería API 50 CH de Biomerieux (50300).
- Medio API GP compuesto por:
 - L-cistina 0,5 g.
 - Triptona 20 g.
 - Cloruro sódico 5 g.
 - Sulfito sódico 0,5 g.
 - Rojo de fenol 0,17 g.
 - Agua desmineralizada c.s.p. 1000 mL, pH= 7,4-7,6
- Medio API CHL compuesto por (para 10 mL):
 - Polipeptona (origen ovino/porcino) 10 g.
 - Extracto de levadura 5 g.
 - Tween 80 1 mL.
 - Fosfato dipotásico 2 g.
 - Acetato sódico 5 g.

- Citrato diamónico 2 g.
- Sulfato de magnesio 0,20 g.
- Sulfato de manganeso 0,05 g.
- Púrpura de bromocresol 0,017 g.
- Agua desmineralizada 1000 mL, pH= 6,7-7,1.
- Parafina líquida estéril de Panreac (141003.1211).
- Pipetas Pasteur de vidrio estériles.
- Patrones de turbidez McFarland.
- NIN (ninhidrina + metanol (CH_3OH) + dimetilsulfóxido (DMSO)) de Biomerieux (70491).
- VP1 Voges Proskauer 1 (hidróxido potásico KOH + H_2O) y VP2 Voges Proskauer 2 (α -naftol+etanol) de Biomerieux (70422).
- ZYM A (tris-hidroximetil-aminometano + ácido clorhídrico (HCl) al 37% + laurilsulfato Na + H_2O) de Biomerieux (70494).
- ZYM B (Fast Blue BB (materia viva)+ Metanol (CH_3OH) + Dimetilsulfóxido (DMSO)) de Biomerieux (70493).

3.5. Galería API 20 Strep

La Galería API 20 Strep en concreto se utiliza para la identificación de los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus*. En la Tabla 2 se recogen los compuestos que se dan lugar en cada una de las pruebas. Los microorganismos metabolizan los reactivos produciendo un resultado colorimétrico mediante el cual se podrá configurar un perfil para cada uno de ellos y posteriormente una identificación tras la lectura en la base de datos.

Tabla 2: Pruebas de la galería API 20 Strep

Ensayo	Componentes activos	Ensayo	Componentes activos
VP	Piruvato sódico	RIP	D-ribosa
HIP	Ácido hipúrico	ARA	L-Arabinosa
ESC	Esculina Citrato de hierro	MAN	D-manitol
PYRA	Ácido piroglutámico-β-naftilamida	SOR	D-sorbitol
α-GAL	6-Bromo-2-naftil-α-D-galactopiranosida	LAC	D-lactosa (origen bovino)
β-GUR	Ácido naftol-ASBI-glucurónico	TRE	D-trehalosa
β-GAL	2-Naftil-β-D-galactopiranosida	INU	Inulina
PAL	2-Naftil fosfato	RAF	D-rafinosa
LAP	L-Leucina-β-naftilamida	AMD	Almidón
ADH	L-Arginina	GLYG	Glicógeno

Para realizar la prueba, se debe humedecer ligeramente el fondo de la cámara de incubación, asegurándose que se mantengan, por tensión superficial, llenos de agua los orificios que posee. Éste proceso tiene como fin suministrar cierta humedad a los microorganismos para su mejor crecimiento. Con la cepa aislada y crecida en medio agarado, se realiza una suspensión turbia de 5 mL en agua destilada estéril raspando con el asa de siembra las colonias crecidas en la placa (la turbidez debe ser mayor o igual que el patrón nº 4 de la escala McFarland), y con una pipeta de vidrio se llenan los primeros 10 pocillos. A continuación se traspasa el volumen restante de la suspensión a la ampolla del medio GP que te proporciona la galería, se mezcla y se terminan de llenar los pozos restantes. Como algunas de las pruebas necesitan ausencia de O₂, (ADH, RIP, ARA, MAN, SOR, LAC, TRE, INU, RAF, AMD, GLYG) se les añade parafina líquida estéril. Las galerías se incuban a 37 °C.

La primera lectura de esta prueba debe realizarse a las 4 horas. Se necesitan unos reactivos (ZYM A, ZYM B, NIN, VP 1 VP 2) que añadidos a los pocillos reaccionarán con el inóculo mostrando distintos colores, o ausencia de los mismos. Se anotan los datos siguiendo la explicación proporcionada en las instrucciones para cada prueba, anotando si es positiva o negativa en función del color obtenido, y se vuelve a dejar en la estufa para realizar otra lectura a las 24 h. Los perfiles obtenidos se comprueban en la página web y se obtiene la identificación.

3.6. Galería API 50 CH

Se trata de un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos. En combinación con el medio API 50 CHL, identifican *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y organismos próximos.

Los ensayos que se realizan son los que se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3: Pruebas bioquímicas de la galería API 50 CH

Tubo	Ensayo	Componentes activos	Tubo	Ensayo	Componentes activos
0		TESTIGO	25	ESC	Esculina Citrato férrico
1	GLY	Glicerol	26	SAL	Salicina
2	ERY	Eritritol	27	CEL	D-celobiosa
3	DARA	D-arabinosa	28	MAL	D-maltosa
4	LARA	L-Arabinosa	29	LAC	D-lactosa (origen bovino)
5	RIB	D-ribosa	30	MEL	D-melibiosa
6	DXYL	D-xilosa	31	SAC	D-sacarosa
7	LXYL	L-Xilosa	32	TRE	D-trehalosa
8	ADO	D-adonitol	33	INU	Inulina
9	MDX	Mentill- β -D-xilopiranosida	34	MLZ	D-melacitosa
10	GAL	D-galactosa	35	RAF	D-rafinosa
11	GLU	D-glucosa	36	AMD	Almidón
12	FRU	D-fructosa	37	GLYG	Glicógeno
13	MNE	D-mannosa	38	XLT	Xilitol
14	SBE	L-Sorbosa	39	GEN	Gentiobiosa
15	RHA	L-Rhamnosa	40	TUR	D-turanosa
16	DUL	Dulcitol	41	LYX	D-lixosa
17	INO	Inositol	42	TAG	D-tagatosa
18	MAN	D-manitol	43	DFUC	D-fucosa
19	SOR	D-sorbitol	44	LFUC	I-Fucosa
20	MDM	Metil- α -D-manopiranosida	45	DARL	D-arabitol
21	MDG	Metil- α -D-glucopiranosida	46	LARL	I-Arabitol
22	NAG	n-Acetilglucosamina	47	GNT	Gluconato potásico
23	AMY	Amigdalina	48	2KG	2-Cetogluconato potásico
24	ARB	Arbutina	49	5KG	5-Cetogluconato potásico

Es un método muy similar al anterior compuesto por una cámara de incubación (fondo y tapa), unas tiras de pruebas, constituidas por cinco filas con 10 pocillos numerados, y un medio API 50 CHL.

A partir de una placa de cultivo puro de la cepa a analizar, se recogen con un asa de siembra estéril varias colonias que se llevan a un tubo de ensayo con 2 mL de agua destilada estéril. Este procedimiento debe repetirse varias veces, hasta que se observe en el medio una turbidez igual o mayor al patrón 4 de la escala McFarland. Partiendo de ésta solución, se trasvaza mediante pipeta Pasteur de vidrio a otro tubo con 5 mL de agua destilada, la cantidad de inóculo necesaria hasta obtener una suspensión de turbidez 2 en la escala McFarland (en ambiente aséptico). Contar y anotar las gotas añadidas ('n').

Una vez obtenida la segunda suspensión, se trasvasan '2n' gotas de la misma, al medio de inoculación (medio API 50 CHL) y se homogeneíza.

Para la inoculación de las galerías se debe repartir la suspensión bacteriana del medio específico en los 50 pocillos, sin llenarlos completamente, dejando un espacio en la cúpula del tubo. Del mismo modo, se debe evitar la formación de burbujas apoyando la punta de la pipeta en el borde de los pocillos. Al igual que en el método anterior, la cámara de incubación debe de humedecerse previamente.

Con el fin de obtener anaerobiosis se recubren todos los ensayos con aceite de parafina hasta que se observe menisco en la cúpula del pocillo. Incubar las galerías a la temperatura óptima de crecimiento, 30 °C o 45 °C. Se realizarán lecturas a las 24 y las 48 h y los resultados se leen en la página web.

4. PRUEBAS TECNOLÓGICAS

4.1. Evaluación de la actividad acidificante

La finalidad de esta prueba es seleccionar las cepas que produzcan un mayor descenso del pH como propiedad tecnológica fundamental de los fermentos.

4.1.1. *Materiales y reactivos*

- Medio *skim-milk* de DIFCO (759668).
- pH-metro GLP 21+. CRISON.

4.1.2. *Procedimiento experimental*

La actividad acidificante se ha determinado mediante inoculación al 1% de cada una de las cepas previamente crecidas en caldo (MRS o BHI), en 7 mL de medio de leche desnatada (*skim-milk* al 10% (m/v)) estéril y posterior incubación a 30 °C. Para evaluar la actividad acidificante se determina el valor de pH del medio a las 0, 6 y 24 h de incubación. Debe limpiarse el electrodo cuidadosamente una vez realizada cada medida para eliminar cualquier rastro biológico en su superficie. Los análisis se realizan por duplicado.

4.2. Evaluación de la producción de gas

Mediante esta prueba se determinan las cepas que producen CO₂, responsable de la producción de ojos en la pasta del queso. Las cepas productoras de CO₂ son principalmente las heterofermentativas^[7].

4.2.1. *Materiales y reactivos*

- Campanas Durham.
- Medio MRS caldo de Merck (110661).

- Lactosa 1-hidrato ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 1H_2O$) de Panreac (141375.1210).

4.2.2. Procedimiento experimental

Para evaluar la capacidad de producción de gas de las cepas lácticas utilizamos tubos de ensayo con 10 mL de caldo MRS más 5% de lactosa y campana de Durham. Los tubos se inoculan con 0,1 mL del medio en que se ha revitalizado la cepa objeto de estudio y se incuban durante 4 días a 30 °C. Se observa cada 24 h la producción o no de gas mediante la aparición de burbuja en la campana Durham. Se analiza cada cepa por duplicado.

4.3. Evaluación de la actividad lipolítica

El objetivo de la prueba es encontrar y seleccionar aquellas cepas que posean la capacidad de hidrolizar los lípidos de la leche y liberar ácidos grasos que infieren al queso propiedades organolépticas, tanto de sabor como de aroma por los ácidos grasos volátiles ^[8,9].

Para evaluar la capacidad lipolítica de las cepas lácticas se ha utilizado el medio de cultivo Agar Nata, elaborado en nuestro laboratorio siguiendo el procedimiento descrito por Morais ^[25].

4.3.1. Materiales y reactivos

- Nata de cocina UHT al 35% de materia grasa.
- Medio MRS agar de Merck (110660).

4.3.2. Procedimiento experimental

Para la evaluación de la actividad lipolítica, se siembra en placa y en superficie, en agar nutritivo suplementado con nata (1%), cada una de las cepas objeto de estudio (Figura 12). Posteriormente se incuban durante 72 h a 30 °C observando cada 24 horas la formación de un halo lipolítico alrededor de las siembras.



Figura 12: Placa de actividad lipolítica

4.4. Evaluación de la actividad proteolítica

Con ésta prueba se seleccionan las cepas con proteinasas asociadas a la pared celular, las cuales hidrolizan principalmente la caseína^[22]. Las bacterias lácticas tienen una actividad proteolítica débil en comparación con otros microorganismos, pero de gran utilidad en la industria quesera. Esta prueba se ha realizado siguiendo el procedimiento espectrofotométrico propuesto por Church *et al.* en 1989, basado en el reactivo o-ftaldialdehído (OPA) y utilizado posteriormente en otros estudios^[14,26].

4.4.1. Materiales y reactivos

- Embudos de vidrio
- Papel de filtro Whatman nº 1 de Whatman (1001.125).
- Cloruro de sodio (NaCl) del 99,5%, de Panreac (131659.1211).
- Ácido tricloroacético (CCl₃COOH) del 99,5%, de Panreac (131067.1611).
- o-Ftaldialdehído de Merck (1.11452.0005).
- Metanol (CH₃OH) de Lab-Scan calidad HPLC (C17C11X).
- SDS (NaC₁₂H₂₅O₄) de Serva (20760).
- Tetraborato de sodio (Na₂B₄O₇·10H₂O) de Panreac (131644).

- β -Mercaptoetanol de Merck (8.05740.0005).
- Matraces aforados de vidrio de distintos volúmenes (10 mL, 50 mL, 100 mL, y 1000 mL).
- Vasos de precipitados de vidrio de 50 mL y 100 mL.
- Tubos de vidrio con tapón rosado y junta de teflón de 20 mL de capacidad.
- Cubetas de plástico de 3 mL de Labbox (MAPM-010-100).
- Tubos de centrífuga estériles de Labbox (CTSP-E50-050).

4.4.2. *Instrumentación*

- Balanza analítica monoplato Sartorius CP 224 S.
- Espectrofotómetro. Helios Gamma. Electron Corporation (100-240).
- Centrífuga Jouan 4R11.

4.4.3. *Procedimiento experimental*

Para determinar la actividad proteolítica de las cepas objeto de estudio, se realiza en primer lugar un lavado celular del medio de las bacterias ácido lácticas. De este modo, eliminamos las posibles trazas de proteínas que éste pudiera contener y que pueden dar lugar a interferencias en la medida de la absorbancia. Este proceso se realiza centrifugando 5 mL del inoculo con 5 mL de NaCl 0,9% a 5500 r. p. m. durante 30 minutos. Posteriormente se elimina el sobrenadante y el pellet obtenido, se redissuelve en otros 5 mL de NaCl 0,9%.

Una vez realizado el lavado, se añaden 0,2 mL del inóculo a un tubo de ensayo con 10 mL de leche desnatada y se incuba durante 24 h en estufa a 30 °C.

Para el análisis proteolítico se toman 5 mL de leche con la cepa en crecimiento y se añaden 10 mL de ácido tricloroacético 0,75 N más 1 mL de agua destilada estéril. Tras la homogenización, se deja reposar la mezcla durante 10 min. A continuación, ésta se filtra por gravedad en embudo de vidrio y con papel Whatman nº 1.

Terminada la filtración, se añaden en la cubeta espectrofotométrica 150 μ L del filtrado con las proteínas disociadas por las bacterias, junto con 3 mL del reactivo OPA preparado con anterioridad. Se

deja reposar y se procede a la lectura en espectrofotómetro a 340 nm antes de 3 minutos. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

La actividad proteolítica de las cepas objeto de estudio, se valora cuantificando el incremento de absorbancia medido con respecto al de la leche control (sin adición de inóculo). Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Para la preparación del OPA se mezclan 25 mL de solución 10 mM de tetraborato de sodio a la que añadimos 2,5 mL de SDS al 20% (v/v). Se añaden 100 μ L de β -mercaptoetanol y se pesan 40 mg de OPA que debe ser disuelto en 1 mL de metanol. Se enrasa con agua destilada a un volumen de 50 mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RECUENTO Y AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN LECHE CRUDA DE OVEJA

5.1. Recuentos

El recuento de los distintos grupos microbianos se incluye en la Tabla 4 expresados como el logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro de leche (log ufc/mL):

Tabla 4: Recuento grupos microbianos log ufc/mL

Grupos microbianos	Lote I		Lote II		Lote III	
	Quesería A	Quesería B	Quesería A	Quesería B	Quesería A	Quesería B
<i>Lactobacilos</i>	3,89	4,36	2,83	3,83	3,90	3,98
<i>Lactococcos</i>	4,76	4,72	4,61	4,76	4,36	4,76
<i>Estreptococos mesófilos</i>	4,69	4,49	3,98	3,45	4,26	4,36
<i>Estreptococos termófilos</i>	3,86	4,51	3,69	3,00	3,78	3,98
<i>Leuconostoc</i>	3,78	4,00	2,70	3,74	3,67	3,51
<i>Enterococos</i>	3,11	3,30	2,40	3,04	2,81	2,74

Los grupos microbianos dominantes en leche cruda son: Lactococos, Estreptococos, Lactobacilos y Leuconostoc, con recuentos que oscilan entre 3 y 4,7 unidades logarítmicas, excepto el lote II de la quesería A, con recuentos algo más bajos. En ambas queserías y en los tres lotes estudiados, el grupo de los Enterococos es el que presenta los recuentos más bajos (Tabla 4, Figura 13 y Figura 14).

También se observa que los recuentos de todos los grupos microbianos estudiados en los tres lotes de la quesería B, son constantes y más elevados que la quesería A.

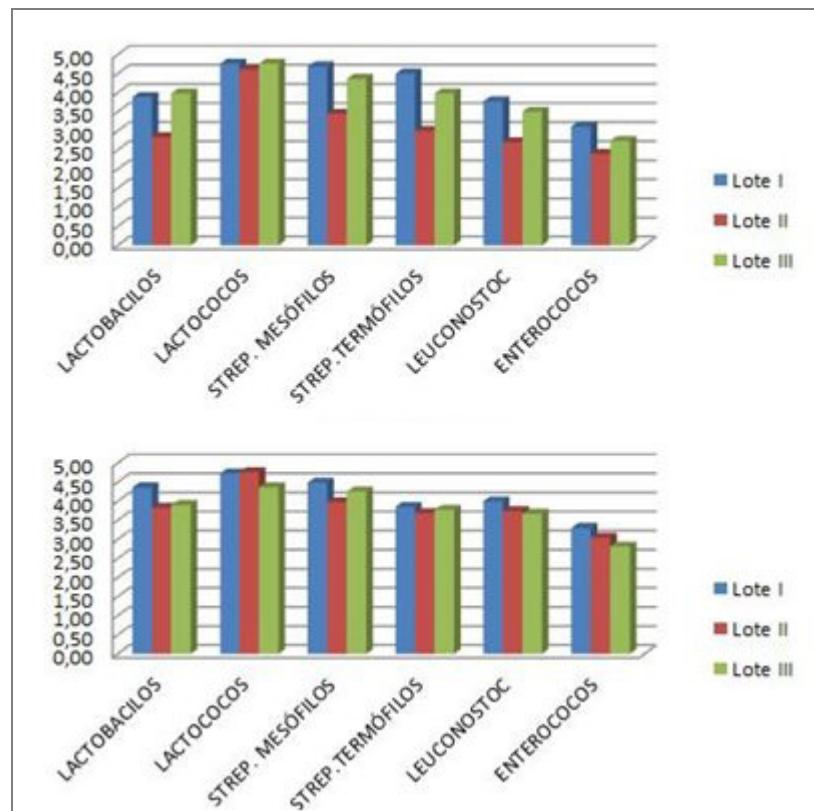


Figura 13: Recuentos queserías A (arriba) y B (abajo)

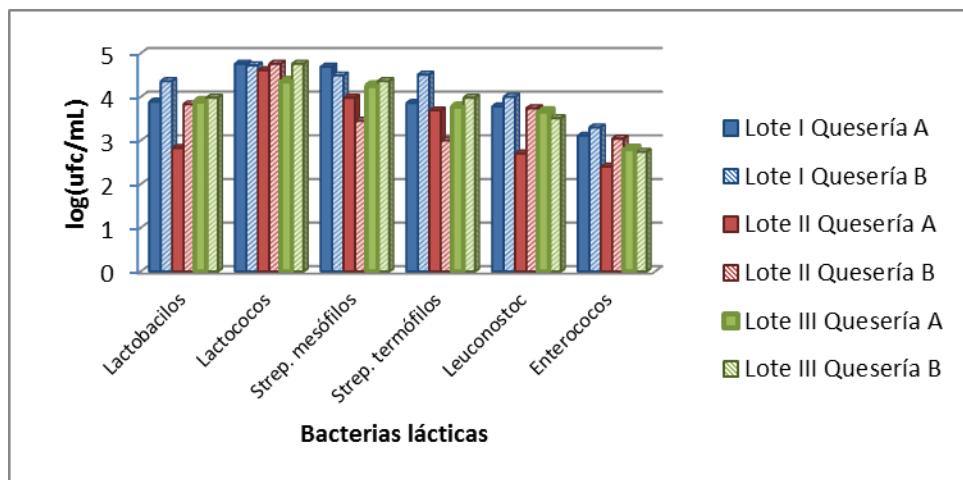


Figura 14: Comparación de recuentos entre queserías y lotes

5.2. Aislamiento

Tabla 5: Aislamiento de colonias por grupo y medio de cultivo

Grupos microbianos (medio de cultivo)	Lote I		Lote II		Lote III	
	Quesería A	Quesería B	Quesería A	Quesería B	Quesería A	Quesería B
<i>Lactobacilos</i> (MRS)	0	0	0	1	1	0
<i>Lactococos</i> (M17+ 0,5% lactosa)	2	3	0	1	0	0
<i>Estreptococos mesófilos</i> (M17+ 0,5% lactosa)	1	1	1	3	1	1
<i>Estreptococos termófilos</i> (M17+ 0,5% lactosa)	0	0	0	0	3	0
<i>Leuconostoc</i> (MSE)	0	1	0	1	0	0
<i>Enterococos</i> (KAA)	2	2	1	2	2	2
Total	5	7	2	8	7	3
Número total cepas = 32						

Tras el recuento de los diferentes grupos microbianos (Tabla 5) se aislaron un total de 32 colonias con morfologías diferentes, a partir de los distintos medios de cultivo: Enterococos (11), Estreptococos mesófilos (8), Lactococos (6), Estreptococos termófilos (3), Lactobacilos (2) y Leuconostoc (2).

6. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE LA LECHE CRUDA DE OVEJA

En la Tabla 6 se observan los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas de identificación microbiana.

Tabla 6: Identificación bioquímica de las cepas bacterianas

Cepa	Catalas a	Tinción Gram *	KOH	Galería API
1	Negativa	Gram (+): cocos P: S, P,C, G	Negativa	API 50CHL: <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> (99,9%)
2	Negativa	Gram (+): cocos P: S,P,C,G	Negativa	API 50CHL: <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> (99,9%)
3	Negativa	Gram (+): cocos G: S,P,C,G	Negativa	API 50CHL: <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> (97,9%)
4	Negativa	Gram (+): cocos pequeños: P,C	Negativa	API 50CHL: <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> (99,9%)
5	Negativa	Gram (+), levaduras	Negativa	*
6	Negativa	Gram (+): cocos grandes: S, P, C, G	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus durans</i> (69,4%)
7	Negativa	Gram (+): cocos pequeños : S, P, C, G, R	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus faecium</i> (72,6%)
8	Negativa	Gram (+): cocos: P, C, G, S	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus durans</i> (98,6%)
9	Negativa	Gram (+): cocos P,G	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus avium</i> (52,8%)
10	Negativa	Gram (+): bacilos cortos: C, P, G, S	Negativa	API 20 Strep: <i>Streptococcus mutans</i> (90,6%)
11	Negativa	Gram (+): cocos P,G,T	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus durans</i> (99,5%)
12	Negativa	Gram (+): cocos P: S, P, C, G	Negativa	API 50 CHL: <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> (99,9%)
13	Negativa	Gram (+): cocos grandes, P, G, S	Negativa	API 50 CHL: <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> (90%)
14	Negativa	Gram (+): bacilos cortos, P, C	Negativa	API 50 CHL: <i>Lactobacillus plantarum</i> (60,9%)
15	Negativa	Gram (+): bacilos, G, P	Negativa	API 50 CHL: <i>Weisella viridescens</i> (97,4%)
16	Negativa	Gram (+): cocos, P, G	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus durans</i> (69,4%)
17	Negativa	Gram (+): cocos P: S, P, C, G	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus durans</i> (99,5%)
18	Negativa	Gram (+): cocos P: S, P, C, G	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus faecium</i> (96,6%)
19	Negativa	Gram (+): cocos P: S, P, C, G	Negativa	API 20 Strep: <i>Aerococcus viridans</i> (88,8%)
20	Negativa	Gram (+): cocos P: S, P, C, G	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus faecalis</i> (99,7%)
21	Negativa	Gram (+): bacilos, P, T, R, G	Negativa	API 50 CHL: <i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i> (99,8%)
22	Negativa	Gram (+): cocos P, G, R	Negativa	API 50 CHL: <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> (99,9%)
23	Negativa	Gram (+): cocos, P, T,R,S	Negativa	API 50 CHL: <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> (99,9%)
24	Negativa	Gram (+): cocos pequeños, P, G	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus faecium</i> (92,6%)
25	Negativa	Gram (+): cocos, P, G	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus durans</i> (99,5%)
26	Negativa	Gram (+): cocos P, T, C, R	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus durans</i> (99,4%)
27	Negativa	Gram (+): cocos, P, G, C	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus avium</i> (96,6%)
28	Negativa	Gram (+): cocos alargados, G, T, P	Negativa	API 50 CHL: <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> (99,2%)
29	Negativa	Gram (+): cocos, P, C, G	Negativa	API 50 CHL: <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> (99,9%)
30	Negativa	Gram (+): cocos, P, C, G	Negativa	API 50 CHL: <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> (99,2%)
31	Negativa	Gram (+): cocos, P, R, G	Negativa	API 20 Strep: <i>Enterococcus faecalis</i> (99,7%)
32	Negativa	Gram (+): cocos, P, G	Negativa	API 20 Strep <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> (86,8%)

* Las siglas indican los tipos de agrupaciones que se observan en las tinciones:

P= parejas, G= grupos, R= racimos, S= solos, C= cadenas

Tras la identificación bioquímica se descartaron dos cepas, la número 2 y 5. La primera se descartó debido a que se obtuvo de la misma placa que la cepa número 1 y tenían una morfología similar, hecho que tras la identificación bioquímica muestra que realmente se trataban de la misma cepa bacteriana.

La número 5 en cambio se aisló y, tras observarla al microscopio con la tinción de Gram, se vio que no se trataba de una bacteria, sino de una levadura; por tanto no se procedió a la caracterización tecnológica. El resto de las cepas bacterianas (30) fueron identificadas bioquímicamente por Galería API 50CH y API Strep.

Los resultados de la identificación de las 30 cepas se presentan en la Tabla 6, donde se indica el porcentaje de fiabilidad de dicha identificación.

El microorganismo predominante es *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* (36,66%). Son varios los autores que señalan la presencia mayoritaria de este género bacteriano, y con unas proporciones similares a las obtenidas en nuestro estudio [29,32]. Según varios artículos publicados es común encontrar cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* en las fases primeras de la producción (leche cruda y cuajada) y posteriormente durante la maduración [31,32]. Éste microorganismo se establece como bacteria dominante durante estas fases pudiendo alcanzar en el queso valores elevados, por lo cual es interesante investigar sus propiedades tecnológicas para conocer cómo influye esta especie en las características sensoriales del queso de Teruel.

Dentro del género *Lactobacillus* se han identificado dos especies, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* y *Lactobacillus plantarum*. La presencia de estas especies bacterianas en la leche quedó descrita por Medina *et al.* [29], los cuales señalan que el 92% de los *lactobacilos* detectados en la leche de oveja corresponden a la especie *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* y el 8% restante a *Lactobacillus acidophilus*. En nuestro caso, ambas especies son identificadas en la misma proporción (50%), aunque sin presencia de la especie *Lactobacillus acidophilus*. Algunos autores asilaron 5 cepas de *Lactobacillus plantarum* en leche de oveja, que presentaron buenas aptitudes enzimáticas en queso [31].

El género *Enterococcus* representó el 46,66%, de las cepas identificadas: 5 cepas de *Enterococcus durans*, 3 cepas de *Enterococcus faecium*, 2 cepas de *Enterococcus avium* y 2 de *Enterococcus faecalis*. Según C. Arizcun *et al.* [30] es frecuente la presencia de este grupo en leche cruda de oveja, sobre todo las especies *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. durans*. Este género microbiano forma parte de la microbiota natural de la leche cruda [30]. Se suelen utilizar como probióticos, contribuyendo a la mejora del balance gastroenterítico en animales y personas, así como en cultivos iniciadores responsables de las características sensoriales de alimentos fermentados (por su actividad proteolítica y producción de compuestos volátiles aromáticos). Las especies más comúnmente utilizadas como cultivos iniciadores son *E. faecium* y *E. faecalis* debido a sus buenas aptitudes acidificantes y/o proteolíticas [30], sin embargo en comparación con otros microorganismos estas capacidades parecen quedar en segundo plano y restarles importancia dentro de los cultivos iniciadores. Otros autores también aislan *E. durans* en la flora de la leche cruda aunque en menor proporción que las otras especies [32].

También se identificaron otras especies bacterianas, como son *Streptococcus mutans*, *Weissella viridescens* y *Aerococcus viridans*. No se han encontrado referencias bibliográficas en las que se cite la presencia de estos microorganismos.

Las características tecnológicas de las bacterias ácido lácticas se asocian más a nivel de cepa que de especie microbiana, por lo que en estos momentos, todos esos microorganismos están siendo identificados mediante técnicas moleculares (RAPD-PCR) que permiten conocer dicha diferenciación.

7. PRUEBAS TECNOLÓGICAS

7.1. Actividad acidificante

La actividad acidificante ensayada en las 30 cepas, mostró que algunos microorganismos coagulaban en tan solo 24 h el medio de *skim-milk*. En la Tabla 7 se muestran los valores de pH obtenidos para cada una de las cepas estudiadas. Se observa un gran descenso del pH, superior a 2 unidades, en las cepas 1, 3, 12, 22, 23 y 29, todas ellas identificadas como *Lactococcus lactis* *ssp.lactis*; siendo las dos últimas las que mayor disminución alcanzan a las 24 h (pH: 4,0 y 4,1, respectivamente).

Para el análisis de leche, y más concretamente para el análisis de la acidez, se suele utilizar la medida denominada grados Dornic. Estas unidades indican la cantidad de ácido láctico que posee la leche, de este modo 0,10% p/v de ácido láctico equivalen a 10 °Dornic.

Para considerar que los cultivos iniciadores tienen buena capacidad acidificante e incluirlos como cultivos iniciadores, algunos autores, como Núñez *et al.*^[20] y Requena *et al.*^[27], tuvieron en cuenta aquellas cepas de *Lactococcus lactis* *ssp. lactis* que produjeron ácido láctico en leche hasta 25 °Dornic después de 6 h de incubación a 30 °C, ya que el uso de estos microorganismos aseguraba una correcta acidificación de la cuajada favoreciendo el desuerado y evitando la proliferación de la microbiota indeseable. Por otro lado, Caridi^[33] adecuadas aquellas cepas que disminuyeron el pH a valores inferiores a 5 después de 24 h de incubación a 30 °C. Siguiendo la línea que marcó Caridi, para este trabajo se observa que el *Lactococcus lactis* *ssp. lactis* aislado alcanza pH cercanos a 4, siendo las cepas 1, 3 y 23 las que menor pH final alcanzan.

El segundo grupo que presentó actividad acidificante fue el de los Enterococos, ya que 5 de las cepas ensayadas (41,6%) alcanzaron un pH inferior a 5,0 tras 24 horas de incubación. Las especies implicadas fueron *E. faecium* (100%), *E. faecalis* (50%) y *E. avium*, (50%). Este efecto había sido ya señalado por otros autores^[35].

Por otro lado, algunos autores indican que aunque los microorganismos del Gº *Lactobacillus* no poseen buena actividad acidificante, se utilizan como cultivo *starter* debido a otras propiedades tecnológicas relacionadas con las características organolépticas del queso^[27].

Tabla 7: Resultados actividad acidificante

Nº	Actividad acidificante			
	pH (0 h)	pH (6 h)	pH (24 h)	Δ pH
1	6,28	5,48	4,20	2,08
3	6,27	5,47	4,19	2,07
4	6,24	5,23	4,33	1,91
6	5,85	5,66	5,50	0,35
7	6,40	5,97	4,62	1,78
8	6,42	6,20	5,78	0,64
9	6,32	5,93	4,86	1,45
10	6,41	5,97	4,64	1,77
11	6,45	6,25	5,61	0,83
12	6,35	5,48	4,25	2,10
13	6,29	5,50	4,49	1,80
14	5,85	5,39	4,48	1,37
15	6,39	5,72	4,50	1,89
16	6,13	6,03	5,85	0,28
17	6,30	6,10	5,60	0,69
18	6,27	5,90	4,59	1,68
19	6,28	5,77	4,69	1,59
20	6,28	5,74	4,94	1,34
21	6,35	6,08	5,47	0,87
22	6,32	5,44	4,26	2,05
23	6,24	5,00	4,09	2,15
24	6,33	5,74	4,63	1,69
25	6,32	6,08	5,77	0,54
26	6,34	5,96	5,74	0,60
27	6,32	6,27	6,10	0,22
28	6,33	5,37	4,34	1,99
29	6,33	5,36	4,19	2,13
30	6,33	5,49	4,40	1,92
31	6,32	6,11	5,73	0,59
32	6,24	6,12	5,95	0,29

7.2. Capacidad de producción de CO₂

La mayoría de las cepas bacterianas a las que se les realizó la prueba no produjeron gas. Únicamente 7 cepas distintas (1, 3, 4, 14, 28, 29 y 30) mostraron producción de CO₂, todas ellas identificadas como *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y la cepa 14 como *Lactobacillus plantarum*.

En la bibliografía consultada, el género que produce mayor cantidad de CO₂ es Leuconostoc. Ninguna de las cepas identificadas pertenece a este género microbiano. Teniendo en cuenta el metabolismo de las especies obtenidas en el aislamiento de la leche no podemos considerar que las cepas encontradas posean una amplia capacidad para producir CO₂, ya que todas son homofermentativas y, por tanto, no productoras de gas en la fermentación de azúcares. Sin embargo existen otros tipos de vías fermentativas secundarias que pueden producir gas, como pueden ser la propiónica o la butírica, pero en menor medida que la vía heterofermentativa y daría explicación a la aparición de burbujas de gas en presencia de microorganismos homofermentativos.

7.3. Actividad lipolítica

El aumento de la concentración de ácidos grasos libres durante la maduración del queso tiene una gran influencia sobre las características organolépticas del queso ^[22]. Es necesaria una concentración mínima de ellos, pero si ésta es excesiva o existen con un perfil incorrecto el sabor obtenido puede considerarse indeseable para muchos quesos, como el Gouda o el Cheddar ^[21].

Tras la realización de dicha prueba, ninguna de las cepas aisladas de la leche mostraron halo de inhibición en el medio de cultivo utilizado y por tanto ninguna producía lipolisis. Para otros autores, como Morais los resultados en los análisis de actividad lipolítica mostraron que de 169 cepas aisladas, únicamente una cepa mostró lipolisis (*Lactobacillus curvatus*).

Aunque generalmente es aceptado que las bacterias lácticas poseen poca actividad lipolítica, algunos autores han mostrado que existen cepas de lactobacilos y alguna de lactococos que poseen lipasas y/o esterasas capaces de hidrolizar la grasa de la leche ^[22]. Otros autores, utilizando otros métodos de análisis semicuantitativos (API-ZYM), observaron que las actividades de lipasas, esterasas y esterasas-lipasas de los lactococos y leuconostoc aislados de ciertos quesos artesanos fue negativa o extremadamente débil ^[21,27,32]. Por otro lado sí se detectó cierta actividad en algunas cepas de lactobacilos, como *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei*. En este proyecto sólo se identificaron 2 cepas de estas especies y ninguna de ellas ha producido lipolisis.

7.4. Actividad proteolítica

En la Tabla 8 se muestra el incremento de absorbancia con respecto a la leche control de las cepas objeto de estudio en las que se observó actividad proteolítica.

Tabla 8: Actividad proteolítica

Nº	Variación de absorbancia
1	0,003
3	0,0067
4	0,008
6	-
7	-
8	-
9	0,0135
10	-
11	-
12	-
13	0,0135
14	-
15	0,0045
16	0,0145
17	0,0005
18	0,02
19	0,0175
20	0,003
21	0,011
22	0
23	0,0155
24	0,0045
25	0,0025
26	0,0025
27	0,001
28	-
29	-
30	0,018
31	-
32	0,005

Como se observa en la Tabla 8, la actividad proteolítica de las cepas bacterianas es nula o escasa. La mayoría de ellas muestran un incremento de absorbancia respecto de la leche desnatada sin inocular negativo, o muy cercano a cero, siendo las especies de lactobacilos los que parecen sobresalir ligeramente de los demás resultados.

Al igual que en nuestro caso, algunos autores describen el género *Lactobacillus* como el que mayor actividad proteolítica presenta frente a otros géneros estudiados de bacterias ácido lácticas ^[25,36]. Por el contrario, para otros autores ^[21,27] los lactococos son las cepas lácticas que presentan una mayor actividad proteolítica aunque con bastante diversidad entre las distintas especies.

En cualquier caso, parece que su empleo como cultivos iniciadores produce mejoras en el sabor de los quesos, además de una reducción del amargor ^[10]. También desde el punto de vista higiénico-sanitario los lactobacilos mesófilos son considerados beneficiosos, ya que son capaces de inhibir el crecimiento de algunas bacterias patógenas gracias a la producción de bacteriocinas ^[33].

Asimismo, dependiendo del grado de proteólisis que sufra el queso en su maduración poseerá una estructura más o menos densa; si prácticamente toda la proteína se disocia en compuestos solubles, se obtendrá un queso de consistencia más blanda (por ejemplo, el Camembert); por el contrario, los quesos duros sufren mucho menos la descomposición proteica.

Por otro lado, Mayo^[37] realizó un estudio de caracterización del queso de Cabrales basándose en los *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y concluyó que aquellas cepas que producían un gran descenso del pH eran también aquellas que poseían buena capacidad proteolítica. En este proyecto se observa como las cepas que mostraron capacidad acidificante muestran incrementos en la absorbancia positivos.

CONCLUSIONES

Primera.- Aproximadamente el 23% de las cepas aisladas de leche cruda de oveja, presentan una muy buena actividad acidificante; todas ellas son pertenecientes al Gº *Lactococcus* (*Lactococcus lactis* subespecie *lactis*). *Lactococcus lactis* subsp *lactis* forma parte del fermento utilizado en la producción de este tipo de queso, por lo que la gran capacidad de acidificación de estas cepas autóctonas posibilitaría su uso como fermentos lácticos, ya que la capacidad de producir ácido por las LAB, está asociada a nivel de cepa y no de especie.

Segunda.- Otro de los géneros que ha demostrado actividad acidificante es *Enterococcus*, ya que 5 de las 12 cepas estudiadas alcanzaron un pH inferior a 5 tras 24 horas de incubación. Este hecho, junto a la implicación de las especies *E. faecium* y *E. faecalis* en las características organolépticas del queso, podría ser de interés para su utilización como fermento autóctono, que permita alcanzar una calidad diferenciada a este alimento fermentado.

Tercera.- La limitada y pobre producción de gas por seis cepas de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* y una cepa de *Lactobacillus plantarum* es considerada una propiedad deseable de la bacterias autóctonas en este tipo de queso, ya que este producto fermentado de Teruel se caracteriza por presentar una pasta compacta con un número escaso de ojos repartidos desigualmente.

Cuarta.- Las cepas lácticas autóctonas aisladas a partir de leche cruda de oveja Assaff no muestran actividad lipolítica, ya que no producen halo de lipólisis característico en Agar nata. De forma similar, ninguna de las cepas presenta actividad proteolítica con el método utilizado en este trabajo. Estos resultados sugieren la necesidad de ampliar el estudio a un mayor número de cepas tanto de leche cruda de oveja, como del proceso de elaboración del queso; así como, la puesta a punto y aplicación de metodologías que permitan una caracterización más completa para la caracterización tecnológica de dichas cepas.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Grappin, R., y Beuvier, E.** 1997. *Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese: A review*. Bulletin of the International Dairy Federation, 327: 16-19.
2. **BOE 6/12/85.** [En línea][Citado el 20 de febrero de 2011]. <http://www.boe.es>
3. **FAO.** [En línea][Citado el 3 de enero de 2011]. http://www.fao.org/index_es.htm
4. **Wikipedia.** [En línea][Citado el 15 febrero de 2011]. <http://es.wikipedia.org/wiki/Queso>
5. **Assenat, L.** 1991. *Leche y productos lácteos*. Edit. Acribia, 8420006955.
6. **Eck, André.** 1990. *El queso*. Omega, 978-84-282-0838-3.
7. **Stanley, G y Early, R.** 1998. *Tecnología de los productos lácteos*. Edit. Acribia. 978-84-200-0915-5.
8. **Gilles, J.** 1976. *Control of salt in moisture levels in Cheddar cheese*. Dairy Science Technolgy, Vol. 11, 219-222.
9. **Farkye, N.Y.y Fox, D.F.** 1990. *Objectives of cheese ripening*. Trends in Food Science & Technology, Vol. 8, 37-40.
10. **McSweeney y Sousa**, 2000. *Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening*. Lait, Vol. 80, 293-324.
11. **Conn, H.W.** 1895. *Dairy Bacteriology*. Vol. 25. Washington D.C. Department of Agriculture Office of Experiment Stations.
12. **Compairé, F.C.** 1976. *Queso, tecnología y control de calidad*. Edit. Publicaciones de Extensión Agraria.
13. **Koneman.** 2008. *Diagnóstico microbiológico*. Edit. Médica Panamericana, 9500608952.
14. **Olarte, C.** 1999. Tesis doctoral: *Caracterización del queso de Cameros*. Universidad de La Rioja. Logroño, España.
15. **Beauvier, E. et al.** 1997. *Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk*. International Dairy Journal, Vol. 7, 311-323.
16. **Axselsson, L.T.** 1993. *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker. Nueva York. 1-64.
17. **Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. y McSweeney, P.L.H.** 2000. *Fundamentals of cheese science, An Aspen Publication, USA*.
18. **Mainar, M.A.** 2006. *Teruel también es queso*. Agroalimentaria.
19. **Gobierno de España.** Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. [En línea] [Citado el: 27 de enero de 2011.] <http://www.mapa.es/es/alimentacion/pags/Denominacion/htm/informacion.htm>.
20. **Núñez, M., Medina, M. y Moreno, J.L.** 1981. *Testing of Streptococcus lactic as starter for manufacture of Manchego-type cheese*. Serie Ganadera, Vol. 12, 303-321.

21. **Herreros, M.A., Fresno, J.M., González Prieto, M.J., Tornadijo, M.E.** 2003. *Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese*. International Dairy Journal, Vol. 13, 469-479.
22. **Fox, P.F., Stepaniak, L.** 1993. *Enzymes in cheese technology*. International Dairy Journal, Vol. 4, 509-530.
23. **Woese, C.R.** 1987. *Bacterial evolution*. Microbiological Reviews, Vol. 51, 221-271.
24. **API web.** [En línea] MDEO. <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate>.
25. **Morais, J.** 2004. Tesis doctoral: *Estudio de adecuación de cepas ácido lácticas autóctonas de la leche cruda de oveja Guirra*. Barcelona, España.
26. **Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H. y Catignani, G.L.** 1983. *Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins*. Journal Dairy Science, Vol. 66, 1219-1227.
27. **Requena, T., Peláez, C. y Desmazeaud, M.J.** 1991. *Characterization of lactococci and lactobacilli isolated of semi-hard goats' cheese*. Journal of Dairy Research, Vol. 58, 137-145.
28. **Centeno, J.A., Cepeda, A. y Rodríguez-Otero, J.L.** 1996. *Lactic acid bacteria isolated from Arzúa cow's milk cheese*. International Dairy Journal, Vol. 6, 65-78.
29. **Medina, R., Katz, M., González, S. y Oliver, G.** 2001. *Characterization of acid lactic bacteria in ewe's milk and cheese from northwest Argentina*. Journal of Food Protection, Vol. 64, 241-247.
30. **Arizcun, C., Barcina, Y. y Torre, P.** 1997. *Identification and characterization of proteolytic activity of Enterococcus spp. isolated from milk and Roncal and Idiazábal cheese*. International Journal of Food Microbiology, Vol. 38, 17-24.
31. **Alais, Ch.** 1985. *Ciencia de la leche*. Barcelona. Ed. Reverté, 8429118152.
32. **González, J., Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Rebollo, J.E., Cáceres, P.** 2003. *Autochthonous starter effect on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of Ibores goat's milk cheeses*. Lait, Vol. 82, 193-202.
33. **Caridi, A.** 2003. *Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro*. Journal of Dairy Technology, Vol. 56, 105-110.
34. **Menéndez, S. et al.** 1999. *Caracterización de cepas de lactobacilos aisladas del queso Arzúa-Ulloa*. Alimentaria, Vol. 1, 51-56.
35. **Gómez de la Cruz, M.J.** 2001. Tesis doctoral: *Degradación de pépticos hidrófobos por bacterias lácticas, aplicación en la eliminación del sabor amargo en queso*. Madrid. Área de tecnología de alimentos Cnitia.
36. **Awad, D., Ahmed, N., El Soda, M.** 2007. *Evaluation of isolated starter lactic acid bacteria in Ras cheese ripening and flavour development*. Food Chemistry, Vol. 104, 1192-1199.
37. **Mayo, B., Hardisson, C. y Braña, A.F.** 1990. *Characterization of wild strains of Lactococcus lactis subsp. lactis isolated from Cabrales cheese*. Journal of Dairy Research, Vol. 57, 125-134.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Siembra, medio y condiciones de cultivo para algunas BAL.....	23
Tabla 2: Pruebas de la galería API 20 Strep	31
Tabla 3: Pruebas bioquímicas de la galería API 50 CH.....	32
Tabla 4: Recuento grupos microbianos log ufc/mL.....	39
Tabla 5: Aislamiento de colonias por grupo y medio de cultivo	41
Tabla 6: Identificación bioquímica de las cepas bacterianas.....	42
Tabla 7: Resultados actividad acidificante	45
Tabla 8: Actividad proteolítica	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Etapa de moldeado	6
Figura 2: Dos colonias de enterococos.....	8
Figura 3: En la parte superior de izquierda a derecha: Cheddar, Camembert y Manchego. En la parte inferior: Pecorino Romano, Provolone y queso azul.....	11
Figura 4: Tipos de fermentación de azúcares de las BAL: camino seguido por las homofermentativas (A); fermentación heteroláctica (B)	13
Figura 5: Queso artesano de Teruel.....	14
Figura 6: Queso artesanal vista interior y exterior.....	16
Figura 7: Ganadería ovina	17
Figura 8: Placa con colonias de lactococcus (A); placa con leuconostoc (B); Streptococcus mesófilos (C)	23
Figura 9: Selección de colonias y aislamiento	24
Figura 10: Izquierda: pseudomonas Gram (-). Derecha: cadenas de bacilos Gram (+)	27
Figura 11: Galería API 50 CH a las 48 h de incubación.....	29
Figura 12: Placa de actividad lipolítica.....	35
Figura 13: Recuentos queserías A (arriba) y B (abajo)	40
Figura 14: Comparación de recuentos entre queserías y lotes	40