



## Bacterias ácido lácticas nativas como cultivo iniciador para la elaboración de queso crema mexicano<sup>1</sup>

### Native lactic acid bacteria as a starter culture for the production of Mexican cream cheese

Rodrigo Cobo-Monterroza<sup>2</sup>, Raymundo Rosas-Quijano<sup>2</sup>, Didiana Gálvez-López<sup>2</sup>, Lourdes Adriano-Anaya<sup>2</sup>, Alfredo Vázquez-Ovando<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Recepción: 26 de septiembre, 2018. Aceptación: 6 de marzo, 2019. Este trabajo formó parte de la tesis de Ingeniero Biotecnólogo del primer autor. Universidad Autónoma de Chiapas, Instituto de Biociencias, México.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Chiapas, Instituto de Biociencias. Boulevard Príncipe Akishino S/N. Colonia Solidaridad 2000. CP 30798 Tapachula, Chiapas, México. [cobomr92@gmail.com](mailto:cobomr92@gmail.com), [rrquijano@yahoo.fr](mailto:rrquijano@yahoo.fr) (<https://orcid.org/0000-0002-5769-8775>), [didiana.galvez@unach.mx](mailto:didiana.galvez@unach.mx) (<https://orcid.org/0000-0003-2206-9108>), [maria.adriano@unach.mx](mailto:maria.adriano@unach.mx), [jose.vazquez@unach.mx](mailto:jose.vazquez@unach.mx) (autor para correspondencia; <https://orcid.org/0000-0003-1397-3349>).

## Resumen

**Introducción.** Los cultivos bacterianos iniciadores son empleados exitosamente en la elaboración de quesos artesanales, ayudan a mantener las características sensoriales *sui generis*, además, controlan la presencia de patógenos. Se ha reportado que las cepas nativas son las mejores opciones para realizar esta función. **Objetivo.** El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la adición de bacterias ácido lácticas (BAL), aisladas del proceso artesanal de elaboración de queso como iniciadoras en la elaboración de queso crema a partir de leche pasteurizada. **Materiales y métodos.** El trabajo se realizó en la región de Ocosingo, Chiapas, México, durante los meses de febrero a noviembre del año 2016. Se aislaron 37 cepas de diferente morfología, provenientes de leche, queso y suero, de las cuales 21 fueron Gram positivas, catalasa y peroxidasa negativas. Por su capacidad acidificante, se seleccionaron ocho cepas con las cuales se formularon seis tratamientos (combinaciones de tres cepas). **Resultados.** El tratamiento que sensorialmente fue más aceptado por los consumidores, se reestructuró en tres nuevos tratamientos (tres combinaciones de dos cepas). De estos nuevos tratamientos, aquel (T8) donde se combinaron dos BAL (2S y 30Q) fue similar en color, firmeza y contenido de grasa al testigo (queso crema elaborado con leche sin pasteurizar). Fueron ligeramente diferentes en el contenido de proteína, humedad y cenizas, sin embargo, los panelistas expertos no encontraron diferencias (prueba de discriminación A no A) significativas entre el queso crema T8 y el testigo. Este mismo tratamiento promovió en el queso crema recuentos microbiológicos (mesófilos aerobios, coliformes totales, mohos y levaduras) inferiores a las establecidas por las normas sanitarias. **Conclusión.** El uso de las BAL 2S y 30Q como cultivo iniciador permitió obtener un queso crema a partir de leche pasteurizada con características similares al queso crema tradicional, pero que resultó microbiológicamente inocuo.

**Palabras clave:** análisis organoléptico, leche pasteurizada, bacterias coliformes, reglamentaciones.

## Abstract

**Introduction.** The bacterial starter cultures are successfully used in the production of artisan cheeses, since they help to maintain *sui generis* sensory characteristics, as well as controlling the presence of pathogens. It has been reported that natives strains are the best options to perform this function. **Objective.** The aim of this research



was to evaluate the effect of the addition of lactic acid bacteria (LAB) isolated from the traditional process of cheese making, as a starters in the manufacture of cream cheese from pasteurized milk. **Materials and methods.** The research was done in the Ocosingo city, Chiapas, Mexico, during the months of February to November from 2016. 37 strains with different morphology were isolated, from milk, cheese and whey, of which 21 were Gram positive, catalase and peroxidase negative. For their acidifying capacity, eight strains were selected, with which six treatments were formulated (combinations of three strains). **Results.** The treatment that was most accepted by consumers was restructured into three new treatments (three combinations of two strains). Of these new treatments, that one (T8) where two LABs (2S and 30Q) were combined was similar in color, firmness and fat content to the control (cream cheese made with unpasteurized milk). Although they were slightly different in protein, moisture and ash content, however, expert panels found no significant differences (proof of discrimination A not A) between the T8 cream cheese and the control. This same treatment promoted microbiological counts (aerobic mesophilic, total coliforms, and molds and yeasts) lower than those established by the sanitary standards. **Conclusion.** The use of BAL 2S and 30Q as starter culture allowed a cream cheese to be obtained from pasteurized milk with similar characteristics to traditional cream cheese, besides microbiologically safe.

**Keywords:** organoleptic analysis, pasteurized milk, coliform bacteria, regulations.

## Introducción

Los cultivos iniciadores, de arranque o *starters*, pueden definirse como preparaciones de gran número de células, ya sea de un solo tipo o mezcla de dos o más microorganismos que son aplicados a los alimentos con el fin de aprovechar los compuestos o productos derivados de su metabolismo o actividad enzimática (Leroy y De-Vuyst, 2004). Estos han sido objeto de estudio y se han empleado con el fin de reducir los tiempos de fermentación, homogenizar procesos, potenciar sabores, aromas y lograr características sensoriales deseables en los productos finales (Karimi et al., 2012). Actualmente, se emplean en la industria alimentaria en la producción y transformación de carnes, vegetales fermentados, cereales, cervecera, vinificación, destilería, panificación, elaboración de alimentos a base de cereales y, principalmente en los productos lácteos (Brandt, 2014). Los tipos de microorganismos que generalmente se emplean incluyen a las bacterias, levaduras y mohos.

En la industria láctea se usan principalmente bacterias y mohos, los cuales se aplican en yogurt, leches ácidas, mantequillas y diversos tipos de quesos, desde frescos (queso crema) hasta quesos añejos como el gouda (Leboš et al., 2012; Oh et al., 2016). Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen la mayor proporción de microorganismos empleados como cultivos iniciadores, debido al papel que desempeñan en la producción de ácido láctico, además contribuyen con la formación de la cuajada, la inhibición del desarrollo de patógenos y al desarrollo de sabor y aroma, debido a su acción proteolítica, lipolítica, etc. (Smit et al., 2005; Bourdichon et al., 2012; Alegría et al., 2016). Su potencial ha provocado que sea común encontrar diversos cultivos iniciadores comerciales, los cuales están estandarizados y permiten un buen control de ciertos procesos y homogenización en las características de los productos. Así se emplean en la elaboración de los quesos: mexicano tipo pasta filata (queso Oaxaca), gouda, Camembert, pecorino y de cabra (Galli et al., 2016; Guarcello et al., 2016; Oh et al., 2016; Miloradovic et al., 2017). Sin embargo, el uso de los cultivos iniciadores comerciales en la elaboración de quesos artesanales, en la mayoría de los casos, resulta en cambios drásticos en las características sensoriales del producto (Leboš et al., 2012). Esta razón hace que en México, aún hoy, muchos quesos artesanales se elaboren con leche no pasteurizada, lo cual es contrario a lo establecido en las prácticas de higiene para el procesado de alimentos (Secretaría de Salud, 2010b), y que compromete gravemente la inocuidad de los quesos y finalmente la salud de los consumidores. Así ocurre con el queso crema de Ocosingo, que es un queso fresco prensado, de color blanco, de textura suave y

cremosa, con sabor ácido y salado (González-Córdova et al., 2016), al cual se le reduce su aceptabilidad cuando se elabora con leche pasteurizada y sin la adición de cultivos iniciadores.

Se ha reportado que el uso de microorganismos aislados de los mismos procesos artesanales de elaboración del queso (cepas nativas) resultan convenientes, debido a que presentan actividad metabólica adaptada, lo que influye en que las propiedades organolépticas típicas de los quesos puedan ser reintegradas (Alegría et al., 2016), y la preferencia de los consumidores no se vea alterada.

Recientemente se demostró que el uso de bacterias ácido lácticas autóctonas como cultivo iniciador permitió igualar las características de sabor, así como reducir los recuentos de patógenos en el Queso Bola de Ocosingo artesanal mexicano (Vázquez-Velázquez et al., 2018). Este mismo enfoque de investigación podría ser extrapolado hacia otros quesos que actualmente se elaboran con leche no pasteurizada y que representan un riesgo potencial a la salud de los consumidores, pues se ha demostrado que los quesos no pasteurizados pueden transmitir patógenos de gran importancia en la salud pública (Guzmán-Hernández et al., 2016). El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la adición de bacterias ácido lácticas (BAL), aisladas del proceso artesanal de elaboración de queso como iniciadoras en la elaboración de queso crema a partir de leche pasteurizada.

## Materiales y métodos

El presente estudio sobre bacterias ácido lácticas nativas como cultivo iniciador para la elaboración de queso crema mexicano, se llevó a cabo durante los meses de febrero a noviembre del año 2016.

### Recolección de muestras

Con material aséptico se recolectaron muestras por triplicado de leche (L, 500 ml), suero (S, 500 ml) y queso (Q, 500 g) en dos diferentes queserías, Peña y Wala de la ciudad de Ocosingo, Chiapas, México. El queso muestreado como fuente de bacterias ácido lácticas fue producido de forma artesanal a partir de leche fresca sin pasteurizar de vaca. Las muestras debidamente etiquetadas fueron transportadas a 4 °C al Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas en la ciudad de Tapachula, Chiapas, México, para ser procesadas.

### Aislamiento y selección de cepas

A partir de 100 g de queso o 100 ml de leche o suero, se hicieron diluciones seriadas hasta 0,0001 con solución salina para reducir la carga de bacterias. Después se tomaron 100  $\mu$ l de las diluciones 0,001 y 0,0001, y se vertieron en placas de Petri conteniendo medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) sólido específico para bacterias ácido lácticas (Vázquez-Velázquez et al., 2018). Con una paleta trifásica estéril se distribuyó la solución bacteriana por toda la placa Petri, para después ser puestas en incubación a 37 °C en condiciones anaerobias por 24 h. Una vez que las colonias crecieron, se comenzó con el proceso de aislamiento, tomando con un asa las colonias que fueron diferentes una de otra y que presentaron morfología de BAL: formas circulares e irregulares, bordes ondulados y lisos, superficies planas y convexas, de colores traslúcidos, opacos y brillantes, blancos, cremosos, amarillentos, anaranjados y rojizos. Estas se sembraron en medio MRS sólido nuevo y se colocaron en condiciones de anaerobiosis por 24 h hasta su crecimiento, el cual una vez logrado se resembró y verificó hasta obtener cultivos axénicos. Para la selección de las cepas presuntamente ácido lácticas, se hicieron pruebas de tinción de Gram, de catalasa y de peroxidasa, además se analizó la morfología típica de las células en microscopio óptico con analizador

de imágenes. Se seleccionaron las colonias que dieron coloración violeta en la tinción de Gram, catalasa negativo, peroxidasa negativo, además de morfología bacilar o de cocos (Vázquez-Velázquez et al., 2018).

### Evaluación de la capacidad acidificante de las cepas seleccionadas

A las cepas seleccionadas de la etapa previa, se evaluó les la capacidad de disminución del pH a temperatura ambiente de la leche pasteurizada. Primeramente, las cepas fueron sembradas en medio de cultivo MRS líquido, y se dejaron en crecimiento hasta lograr una concentración de  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ . Posteriormente, se tomaron 500  $\mu\text{l}$  de caldo de cada una de las cepas y se inocularon en matraces con 50 ml de leche entera pasteurizada. Se incubaron a temperatura ambiente con agitación a 125 rpm y se midió el pH a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48 y 72 h. Se seleccionaron cepas con base en su capacidad de acidificar la leche después de 24 h y 72 h (Terzić-Vidojević et al., 2015; Vázquez-Velázquez et al., 2018).

### Formulación de los cultivos iniciadores

Se seleccionaron ocho cepas, cuatro que disminuyeron el pH durante las primeras 24 h, y otras cuatro que lo hicieron después de 72 h. Con la combinación de estas ocho cepas se prepararon seis cultivos iniciadores (tratamientos), cada uno con tres cepas diferentes y que fueron evaluados en la etapa 1 de la investigación como se muestra en el Cuadro 1. Basado en los resultados de la etapa 1, se seleccionó el tratamiento mejor evaluado por panelistas sensoriales y, dado que no logró igualar las características sensoriales del queso testigo, se procedió a rediseñarlo con base en tres tratamientos nuevos, en esta ocasión (etapa 2) cada tratamiento compuesto por dos cepas diferentes (Cuadro 1). Para conocer el mecanismo fermentativo de las cepas 2S y 30Q empleadas en la formulación del T8, se les realizó prueba de producción de gas a las 24 h en caldo MRS (König y Fröhlich, 2017).

**Cuadro 1.** Combinaciones de cepas que conformaron cada tratamiento evaluado como cultivo iniciador en la elaboración del queso crema de Ocosingo, Chiapas, México. 2016.

**Table 1.** Combinations of strains that make up each treatment as starter culture in the making of Ocosingo cream cheese, Chiapas, Mexico. 2016.

Tratamiento	Cepas (etapa 1)	Cepas (etapa 2)
T1	2S, 20Q, 30Q	na
T2	2S, 25Q, 31Q	na
T3	20Q, 32Q, 35Q	na
T4	2S, 20Q, 25Q	na
T5	2S, 30Q, 31Q	na
T6	2S, 30Q, 33L	na
T7 (testigo)	-----	-----
T8	na	2S, 30Q
T9	na	2S, 31Q
T10	na	30Q, 31Q

La letra que acompaña al número en el código de la cepa indica su procedencia. L: leche, S: suero y Q: queso, na: no aplica / The letter next to the number in the code of the strain indicates its origin. L: milk, S: whey and Q: cheese, na: not applicable.

## Elaboración del queso

Para preparar los cultivos iniciadores, las BAL se cultivaron de manera individual en medio de cultivo MRS líquido por 24 h, hasta alcanzar una concentración de  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ . Posteriormente, se tomaron 500  $\mu\text{l}$  del inóculo de cada cepa y se combinaron según el tratamiento en 100 ml de leche pasteurizada, se etiquetaron debidamente y se mantuvieron por 24 h a  $35 \pm 5$  °C, luego se transportaron al sitio de manufactura de los quesos. La elaboración del queso crema se llevó a cabo de manera artesanal, se siguió el procedimiento tradicional en las instalaciones de una quesería local en la ciudad de Ocosingo, Chiapas, México. Se empleó leche fresca para la elaboración de los quesos, es decir, transcurrieron menos de 4 h desde el ordeño hasta el procesamiento, pues el ordeño de las vacas se realiza en las instalaciones de la misma empresa. Se pasteurizaron 20 l de leche por tratamiento, para lo cual se calentó la leche a 63 °C durante 30 min, seguido de enfriamiento inmediato a  $35 \pm 2$  °C. Inmediatamente después, se agregó el cultivo iniciador (0,5 % v/v), se le añadió cuajo (Cuamix™) en proporción 1:10 000 v/v, se adicionó 60 g de NaCl y se dejó reposar por 6 h. Transcurrido este tiempo se cortó la cuajada y se dejó reposar 18 h más. Se introdujo la cuajada en bolsas de manta para escurrirlas durante 24 h para obtener consistencia semidura, se le agregó NaCl gradualmente de manera manual hasta obtener el salado deseado (4-6%). Terminado el proceso, se emplearon los quesos para las pruebas sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas respectivas.

## Evaluación sensorial

Para evaluar el efecto de los cultivos iniciadores en las características sensoriales del queso crema de Ocosingo, se realizaron pruebas hedónicas de discriminación y descriptivas. En la primera etapa se realizó una prueba de aceptación, con un panel de jueces no entrenados, se convocó a 79 personas que usualmente consumen este tipo de queso en Ocosingo, con un rango de edad de entre veinte y cincuenta años. Se les proporcionaron raciones de 1  $\text{cm}^3$  de cada uno de los quesos elaborados (T1-T6), más el testigo, todos identificados con códigos de tres dígitos, y se les pidió que mostraran su nivel de agrado en una escala hedónica estructurada de 7 puntos, donde 1 = me disgusta mucho y 7 = me gusta mucho (Lawless y Heymann, 2010).

Para la segunda etapa, los quesos de los tratamientos T8-T10 y el testigo se analizaron mediante una prueba de discriminación “A no A”, con un panel integrado por diez jueces expertos (queseros con más de quince años de experiencia). Para esto, se les proporcionaron a los jueces una muestra del testigo llamada “A” y nueve muestras de los quesos realizados (tres de cada tratamiento), cada muestra etiquetada con códigos de tres dígitos diferentes uno del otro, y se les pidió que memorizaran los atributos sensoriales de la muestra “A” y, posteriormente degustaran una por una las demás muestras e indicaran si era igual o no a “A”. Se registró el número de aciertos contra el número de errores para luego compararlos estadísticamente (Lawless y Heymann, 2010).

De los resultados de la prueba “A no A”, se seleccionó al tratamiento donde los panelistas no fueron capaces de encontrar diferencias con el testigo, se elaboró nuevamente el queso y se empleó para evaluar atributos que describen el queso crema comparado contra el queso elaborado con leche sin pasteurizar (testigo), mediante una prueba de análisis descriptivo cuantitativo. Los mismos diez panelistas expertos evaluaron mediante una escala estructurada de 5 puntos, el gusto salado, la cremosidad, el amargor y la intensidad de olor. Por atributo se consideró a cada panelista como una réplica, y se registró la calificación otorgada para cada descriptor.

### **Análisis microbiológico**

Con material aséptico se recolectaron muestras por triplicado de 250 g de queso elaborado a partir de leche pasteurizada (T8) y de queso elaborado tradicionalmente con leche bronca, ambos del mismo día de elaboración. Se determinó mediante conteo en placa la carga de mesofílicos aeróbicos, hongos y levaduras, así como de coliformes totales, siguiendo los procedimientos establecidos en el manual analítico de bacteriología de la FDA (2011).

### **Características fisicoquímicas y composición proximal de quesos**

A quesos recién elaborados de los tratamientos T8 y testigo se les determinó el color mediante un colorímetro MiniScan EZ, firmeza con un penetrómetro Force gauge Extech 475044 y, además, se determinaron con base en los procedimientos descritos por la AOAC (2010) los contenidos de humedad (método 926,08), cenizas (método 935,42), grasa (método 933,05) y proteína por determinación de nitrógeno total por el método de Kjeldah (método 2001,14).

### **Análisis de datos**

Los datos obtenidos de las pruebas sensoriales se analizaron mediante procedimientos de estadística no paramétrica. Los datos de la prueba de aceptación se sometieron a la prueba de Kruskal Wallis  $\alpha=0,5$  y posterior comparación de rangos. Los datos obtenidos de la prueba "A no A" se analizaron mediante prueba de  $\chi^2$ . Los datos de la prueba descriptiva se estudiaron mediante la prueba de Wilcoxon (U de Mann Whitney). Los datos de las pruebas instrumentales y de composición se compararon mediante una prueba t de Student. Todos los análisis se realizaron mediante el empleo del software estadístico Infostat v.2016.

## **Resultados**

### **Aislamiento y selección de cepas**

A partir de las muestras de queso, suero, y leche no pasteurizada, sembrados en medio MRS sólido, se seleccionaron aproximadamente 300 colonias con morfología aparente de BAL. Por comparación visual, para evitar redundancia y reducir el número de colonias, se sembraron de manera consecutiva hasta obtener 37 cepas morfológicamente diferenciadas, las cuales se enumeraron secuencialmente (1-37) y se acompañaron de una letra que indicó la muestra de procedencia (L: leche, S: suero, Q: queso). Posterior a realizar las pruebas preliminares de selección y observar la morfología microscópica, se descartaron las cepas que dieron positivo a las pruebas de catalasa y peroxidasa, fueron Gram negativas o presentaron morfología microscópica de levadura. Así, finalmente se seleccionaron 21 bacterias Gram positivas, catalasa y peroxidasa negativas, presuntivamente BAL (Cuadro 2).

### **Evaluación de la capacidad acidificante de las cepas seleccionadas**

De las 21 cepas previamente seleccionadas, solo 17 cepas se sometieron a la evaluación de la capacidad acidificante, debido a que cuatro de estas no lograron ser reactivadas ni en medio de cultivo MRS fresco ni en leche pasteurizada. En la Figura 1 se muestra la cinética del pH de leche pasteurizada e inoculada con BAL. Se observó la formación de dos grupos de bacterias, uno que tuvo mayor capacidad acidificante, en el cual las bacterias

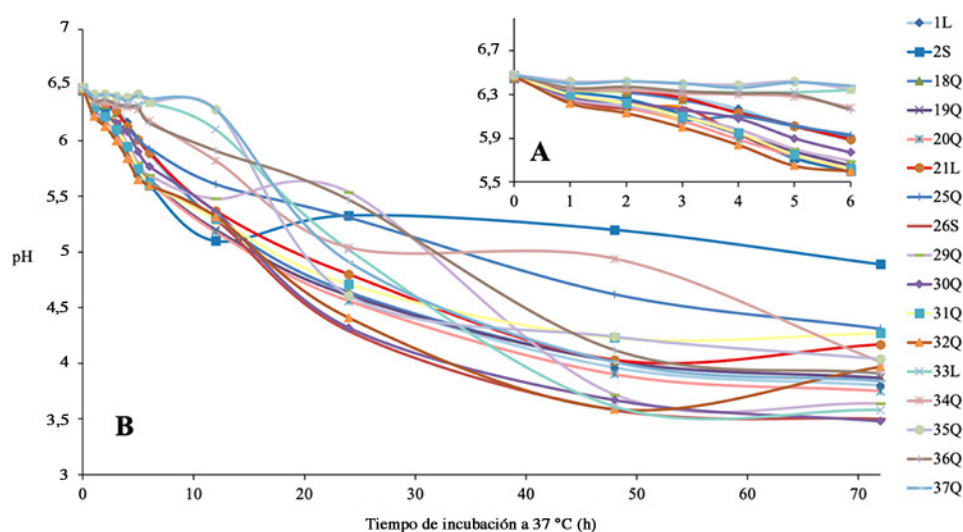
**Cuadro 2.** Clasificación de las cepas de bacterias ácido lácticas (BAL), aisladas del proceso de elaboración de queso crema en función de los resultados a las pruebas de catalasa, peroxidasa y tinción Gram. Ciudad de Ocosingo, Chiapas, México. 2016.

**Table 2.** Classification of strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from the process of making cream cheese based on the results of the catalase, peroxidase and Gram stain tests. Ocosingo city, Chiapas, Mexico. 2016.

	Catalasa y peroxidasa +	Catalasa y peroxidasa -	Gram +	Gram -	Colección final de BAL
Cepas	5S,7L,8L, 11S, 13L, 14S, 16S, 17S, 22Q, 23L, 24L, 27S, 28L	1L, 2S, 3L, 4S, 6S, 9L, 10S, 12L, 15L, 18Q, 19Q, 20Q, 21L, 25Q, 26S, 29Q, 30Q, 31Q, 32Q, 33L, 34Q, 35Q, 36Q, 37Q	1L, 2S, 3L, 4S, 5S, 8L, 10S, 12L, 16S, 17S, 18Q, 19Q, 20Q, 21L, 25Q, 26S, 29Q, 30Q, 31Q, 32Q, 33L, 34Q, 35Q, 36Q, 37Q	6S, 7L, 9L, 11S, 13L, 14S, 15L, 20Q, 21L, 25Q, 27S, 28L	11L, 2S, 3L, 4S, 10S, 12L, 18Q, 19Q, 20Q, 21L, 25Q, 26S, 29Q, 30Q, 31Q, 32Q, 33L, 34Q, 35Q, 36Q, 37Q

La letra que acompaña al número en el código de la cepa indica su procedencia. L: leche, S: suero y Q: queso / The letter next to the number in the code of the strain indicates its origin. L: milk, S: whey and Q: cheese.

durante las primeras 6 h de crecimiento mostraron un mayor descenso en el pH (Figura 1A), en contraste con las demás bacterias cuyo descenso en el pH fue menos marcado y ocurrió después de las 15 h. Algunas bacterias como cepa 30Q acidificaron más la leche al final del proceso (72 h), bajando el pH hasta valores cercanos a 3,48 (Figura



**Figura 1.** Cinética de acidificación de las bacterias ácido lácticas (BAL), aisladas de leche y queso fresco. A: Comportamiento del pH de 0 a 6 h. B: Comportamiento del pH de 0 a 72 h. Ciudad de Ocosingo, Chiapas, México. 2016.

La letra que acompaña al número en el código de la cepa indica su procedencia. L: leche, S: suero y Q: queso.

**Figure 1.** Acidification kinetics of lactic acid bacteria LAB isolated from milk and fresh cheese. A: pH behavior from 0 to 6 h. B: pH behavior from 0 to 72 h. Ocosingo city, Chiapas, Mexico. 2016.

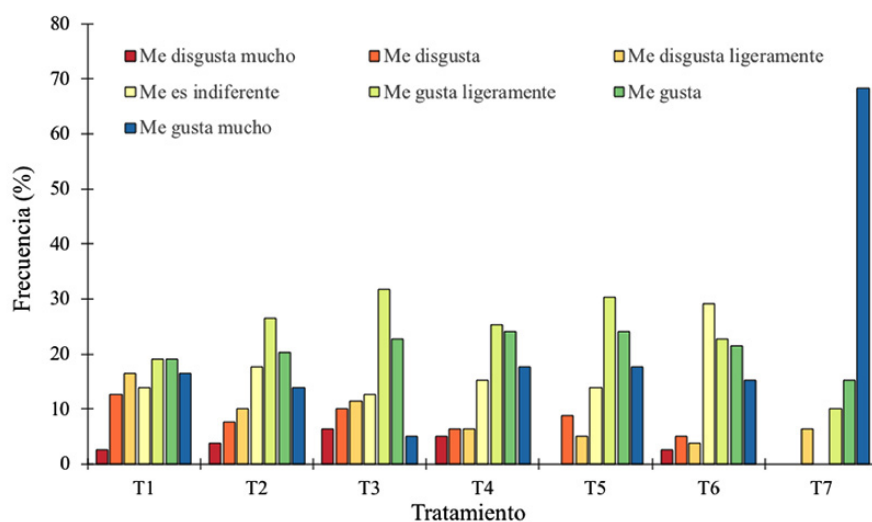
The letter next to the number in the code of the strain indicates its origin. L: milk, S: whey and Q: cheese.

1B). Además, se encontró una cepa con un comportamiento particular (cepa 2S), pues a pesar de que durante las primeras 6 h logró bajar el pH (Figura 1A), después de las 10 h, la variación en el mismo fue atípica, y al final de la prueba dicha cepa resultó ser la BAL que menos acidificó la leche (pH= 4,89; Figura 1B).

Para la selección de las cepas empleadas en la formulación de los cultivos iniciadores, se empleó como principal criterio la capacidad acidificante a diferentes tiempos, partiendo del hecho que, la velocidad de producción de ácido láctico puede estar relacionada de manera directa con la ruta metabólica empleada por las distintas BAL. Así, se seleccionaron las cepas que acidificaron durante las primeras 6 h (25Q, 31Q, 35Q), aquellas que acidificaron más al cabo de las 72 h (20Q, 30Q, 32Q, 33L); y una cepa con menor capacidad acidificante (2S).

### Evaluación sensorial de los quesos elaborados con iniciadores

En la etapa 1 se incluyó un queso elaborado con leche no pasteurizada de manera convencional (testigo, T7), para comparar el grado de aceptación de los quesos elaborados con leche pasteurizada y adicionados con iniciadores, frente al queso que los consumidores habitualmente degustan. El queso del tratamiento testigo resultó la muestra mejor evaluada, pues el 68 % de las personas del panel le otorgaron la calificación de “me gusta mucho” y 0 % de “me disgusta mucho” (Figura 2).



**Figura 2.** Frecuencia de calificaciones hedónicas otorgadas a seis (T1-T6) quesos elaborados con leche pasteurizada, cultivos iniciadores y un tratamiento testigo (T7). Ciudad de Ocosingo, Chiapas, México. 2016.

T1 (cepas 2S, 20Q, 30Q), T2 (2S, 25Q, 31Q), T3 (20Q, 32Q, 35Q), T4 (2S, 20Q, 25Q), T5 (2S, 30Q, 31Q), T6 (2S, 30Q, 33L), T7 (queso elaborado con leche no pasteurizada, sin adición de cultivos iniciadores). La letra que acompaña al número en el código de la cepa indica su procedencia. L: leche, S: suero y Q: queso.

**Figure 2.** Frequency of hedonic ratings given to six (T1-T6) cheeses made with pasteurized milk and starter cultures and a control treatment (T7). Ocosingo city, Chiapas, Mexico. 2016.

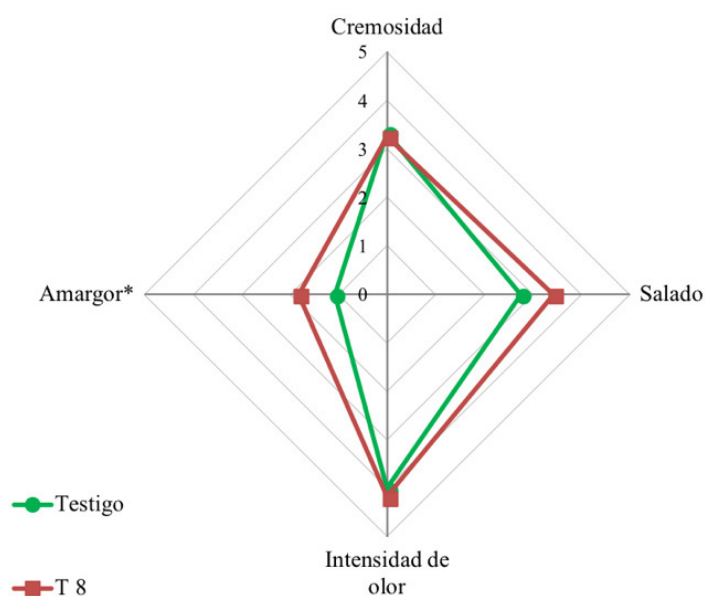
T1 (strains 2S, 20Q, 30Q), T2 (2S, 25Q, 31Q), T3 (20Q, 32Q, 35Q), T4 (2S, 20Q, 25Q), T5 (2S, 30Q, 31Q), T6 (2S, 30Q, 33L), T7 (cheese made with unpasteurized milk, without starters). The letter next to the number in the code of the strain indicates its origin. L: milk, S: whey and Q: cheese.

El tratamiento T5 resultó el mejor evaluado después del testigo (17 % de evaluaciones como “me gusta mucho” y 0 % de “me disgusta mucho”, Figura 2). La puntuación promedio de este tratamiento fue de 5 (dato no mostrado).



Para los quesos elaborados en la etapa 2, después de la prueba de discriminación “A no A”, los panelistas expertos (queseros) encontraron que de los tres tratamientos reformulados (T8-T10), solo el tratamiento 8 mostró igualdad estadística al tratamiento testigo ( $X^2$  calculada = 1,232, frente a  $X^2$  de tablas = 3,84), lo que sugiere que aún los panelistas expertos en 12 de 15 juicios detectaron como iguales los quesos de los tratamientos T8 y el testigo. Los otros dos tratamientos fueron detectados como diferentes, para el tratamiento 9 el valor de la  $X_c^2$  fue de 19,22 y para el tratamiento 10  $X_c^2 = 4,832$ .

En la prueba descriptiva, de los cuatro atributos evaluados y que mejor describen al queso crema, solo para el atributo amargo se encontró diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre la muestra (T8) y el testigo (Figura 3), los valores para los demás atributos fueron iguales estadísticamente ( $p > 0,05$ ). La ligera diferencia que se observó entre muestras para el atributo salado, no fue significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 3.** Comparación de atributos sensoriales de los quesos testigo (elaborado tradicionalmente) y T8 (elaborado a partir de leche pasteurizada, con la adición de cultivos iniciadores). Ciudad de Ocosingo, Chiapas, México. 2016.

\*Diferencia significativa entre tratamientos (prueba de Wilcoxon para muestras independientes,  $p < 0,05$ ).

**Figure 3.** Comparison of sensory attributes of control cheeses (traditionally elaborated) and T8 (made from pasteurized milk, adding starter cultures). Ocosingo city, Chiapas, Mexico. 2016.

\*Significant difference among treatments (Wilcoxon test for independent samples,  $p < 0,05$ ).

### Análisis microbiológico

Las muestras de queso elaborado a partir de leche pasteurizada y adicionados con el cultivo iniciador (T8), para las tres cuentas microbiológicas, estuvieron dentro de los límites establecidos por la legislación mexicana (Cuadro 3). Por el contrario, las muestras del queso elaborado a partir de leche sin pasteurizar (testigo) estuvieron por arriba de los límites permitidos.

**Cuadro 3.** Cuenta en placa (UFC g<sup>-1</sup>) para coliformes totales, mesófilos aerobios y mohos y levaduras del queso crema elaborado con leche sin pasteurizar (testigo) y con leche pasteurizada adicionado con cultivo iniciador (T8). Ciudad de Ocosingo, Chiapas, México. 2016.

**Table 3.** Plate count (CFU g<sup>-1</sup>) for total coliforms, aerobic mesophiles and molds and yeasts of cream cheese made with unpasteurized milk (control) and with pasteurized milk added with starter culture (T8). Ocosingo city, Chiapas, Mexico. 2016.

	Testigo	T8	Límite máximo
Coliformes totales	975	100	100
Mesófilos aerobios	14 250	775	1000
Mohos y levaduras	38 350	350	500

Ensayos por triplicado empleando las diluciones seriadas de 1: 100, 1: 1000, 1: 10000 / Triplicate tests using serial dilutions of 1: 100, 1: 1000, 1: 10000.

Límite máximo según la Secretaría de Salud (2010a) / Maximum limit according to the Secretaría de Salud (2010a).

### Características fisicoquímicas de quesos

Los valores de los parámetros evaluados de las características fisicoquímicas de los quesos se presentan en el Cuadro 4. Para casi todos los parámetros se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre muestras, exceptuando la firmeza y el contenido de grasa. Aunque las diferencias fueron significativas, los valores no se encontraron tan distantes entre tratamientos.

**Cuadro 4.** Parámetros evaluados de las características fisicoquímicas de los quesos elaborados de manera convencional y con cultivos iniciadores. Ciudad de Ocosingo, Chiapas, México. 2016.

**Table 4.** Evaluated parameters of the physicochemical characteristics of cheeses traditionally made and with starter cultures. Ocosingo city, Chiapas, Mexico. 2016.

Parámetros	Quesos			
	Testigo		T8	
Color				
<i>L</i> *	93,59	±0,35 <sup>a</sup>	90,97	±0,48 <sup>b</sup>
<i>a</i> *	0,88	±0,16 <sup>a</sup>	-0,15	±0,07 <sup>b</sup>
<i>b</i> *	15,94	±0,56 <sup>b</sup>	18,57	±0,28 <sup>a</sup>
Firmeza (N)	4,57	±0,35 <sup>a</sup>	4,68	±0,15 <sup>a</sup>
Humedad (%)	46,33	±1,26 <sup>a</sup>	51,32	±1,61 <sup>b</sup>
Cenizas (% b.s.)	1,70	± 0,04 <sup>b</sup>	3,02	±0,00 <sup>a</sup>
Grasa (% b.s.)	27,77	±3,26 <sup>a</sup>	25,74	± 2,41 <sup>a</sup>
Proteína (N x 6,38; % b.s.)	19,94	±0,08 <sup>b</sup>	21,26	±0,34 <sup>a</sup>

b.s.: base seca / b.s.: dry base.

Testigo: queso elaborado a partir de leche sin pasteurizar. T8: queso elaborado con leche pasteurizada y cultivos iniciadores (cepas 2S y 30Q) / Control: cheese made from unpasteurized milk. T8: cheese made from pasteurized milk and starter cultures (2S and 30Q strains).

## Discusión

El comportamiento acidificador (descenso de pH) de la bacteria ácido láctica (BAL) codificada como 30Q (Figura 1B), hizo suponer que esta bacteria posee un metabolismo homofermentativo (resultó negativo en la prueba de producción de gas) que produce ácido láctico como principal producto de la fermentación (Leroy y De-Vuyst, 2004). El resultado del comportamiento del pH obtenido en el presente estudio fue similar al reportado por Ramos-Izquierdo et al. (2009) para bacilos aislados de queso crema de Tabasco, México, quienes reportan un rango de pH de 4-5 a las 72 h de fermentación. Por el contrario, el comportamiento acidificador de la BAL 2S parece típico de algunas BAL del tipo *Enterococcus* (Akabanda et al., 2014), y podría estar asociado con la velocidad de duplicación de estas BAL, que resultaron de lento crecimiento y además dieron negativo en la prueba de producción de gas. Se ha reportado que bacterias con características similares resultan útiles en la producción de productos lácteos (Tsakalidou et al., 1993), pues pueden presentar actividad hidrolítica. Esta fue la principal razón para seleccionar a esta cepa para formular algunos de los cultivos iniciadores en la elaboración del queso, aún cuando su capacidad acidificante fue limitada.

Se sugiere que el uso de BAL con actividad hidrolítica podría ser benéfico en los cultivos iniciadores, debido precisamente a que producen compuestos que intensifican el sabor y aroma (Mukisa et al., 2017). Incluso, los resultados de la prueba de discriminación sensorial donde no se encontró diferencia entre muestras, apoyarían esta hipótesis, pues el tratamiento T8 estuvo conformado por estas dos BAL (Cuadro 1). Se ha descrito que los principales géneros de bacterias ácido lácticas que se han aislado de quesos crema mexicanos son *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus* (Morales et al., 2011; González-Córdova et al., 2016). La tendencia en el comportamiento de acidificación de las cepas, resultó similar a lo reportado en otros estudios con BAL (Alegría et al., 2016; Guarcello et al., 2016). Sin embargo, en dichos estudios se reportaron valores de pH finales de entre 4,09-4,26 a las 48 h para quesos de naturaleza similar, mientras que con las BAL que se evaluaron en el presente estudio para ese mismo tiempo (48 h), se obtuvieron valores de pH de hasta 3,58. Esta característica es deseable cuando se quiere que las bacterias ácido lácticas, además de contribuir como potenciadoras de características sensoriales del queso donde se adicionan, participen en la coagulación de la leche e inhiban el desarrollo de microorganismos no deseables (patógenos), los cuales, al incorporarse durante el procesamiento, comprometen la inocuidad del producto final (Akabanda et al., 2014).

Los resultados obtenidos de la prueba sensorial en la etapa 1 eran parcialmente esperados, pues se trata de la muestra consumida regularmente y los consumidores tienden a preferir lo tradicional cuando detectan ligeras diferencias (Guerrero et al., 2009), pero también demuestra que la adición de los cultivos iniciadores a la leche pasteurizada en las muestras T1-T6, no logró igualar las características del queso elaborado con leche no pasteurizada, ya que pudo modificar algunas características sensoriales del queso y, consecuentemente la preferencia de los consumidores. La calificación promedio obtenida por el tratamiento T5 (el segundo en nivel de agrado, después del testigo), se consideró aceptable, pues valores promedio por arriba de 5 en escalas hedónicas de 7 puntos (Granato et al., 2010) o de 6 en escalas de 9 puntos (Felicio et al., 2016), se consideran válidos para considerar preferencia.

La ligera diferencia observada entre muestras para el atributo salado durante la prueba descriptiva (Figura 3), puede deberse a que, durante la elaboración del queso, más específicamente durante el salado, al ser un proceso artesanal no se mide la cantidad exacta de sal que se le incorpora al producto, por tanto, se espera hasta cierto punto ligeras variaciones en la percepción de este sabor, incluso de un lote a otro (González-Córdova et al., 2016). Aún con esto, la diferencia no fue significativa.

Los resultados obtenidos para el atributo de amargor pueden explicarse como un efecto de las BAL adicionadas, ya que en caso de ser hidrolíticas como se supone para la cepa 2S, se estarían produciendo mayor cantidad de enzimas con actividad proteolítica específica. Esta actividad enzimática puede contribuir al desarrollo del sabor,

pero al tratarse de un queso fresco, la actividad proteolítica de la cepa se pudo haber favorecido por la presencia del suero en la cuajada (mayor humedad) por más tiempo (12 h). Esta condición se ha demostrado que favorece la proliferación de las bacterias, y en este caso, posiblemente la producción de pequeños péptidos que aportan al gusto amargo (Celik y Tarakci, 2017). Al respecto, existen reportes que aluden el uso de cultivos iniciadores durante la elaboración de queso gouda, dichos iniciadores contribuyeron al desarrollo de péptidos y ácidos orgánicos y por consecuencia al desarrollo de los aromas y sabores (Oh et al., 2016). Sin embargo, para los consumidores la sensación de sabor amargo es una característica indeseable, por lo que el nivel de agrado se reduce cuando aparece este sabor en el queso. No obstante, al ser el queso crema un producto de consumo prácticamente inmediato (queso fresco), la presencia de estos sabores no resulta alarmante, ya que, al ser consumido rápidamente, no existe la posibilidad que estos péptidos se sigan produciendo con el tiempo, como ocurre en quesos añejos (Karametsi et al., 2014), donde el gusto amargo llega a ser una razón de rechazo del producto.

En el presente estudio los panelistas expertos no encontraron al queso diferente en la prueba de discriminación “A no A”, lo cual sugiere que, en la evaluación global del queso, el gusto amargo puede estar siendo parcialmente enmascarado por los demás atributos sensoriales del queso, mejorando así la aceptabilidad general del producto.

Los recuentos de los microorganismos indicadores revelan alta eficiencia del proceso para mantener la inocuidad de los quesos. Además, es notable que los valores de mesófilos y coliformes en los quesos testigo fueron bajos con respecto a los que se reportan en quesos de tipo crema tropical elaborados con leche cruda, donde se han obtenido valores mayores a  $3,6 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$  para el caso de mesófilos aerobios (Rangel-Ortega, 2011). El procesamiento casi inmediato (4 h) de la leche para elaborar los quesos puede ser una de las razones de los bajos recuentos, pues la leche al no pasar por un periodo de resguardo y transporte (como ocurre en la mayoría de las empresas productoras de queso), no se da la oportunidad de que se desarrollen los microorganismos que acompañan a la leche hasta cuentas tan elevadas como las que se reportan en otros estudios de diferentes tipos de quesos (fresco, crema, doble crema, panela y poro) elaborados con leche no pasteurizada, en donde incluso se ha reportado la presencia de *E. coli* y *Salmonella* (Guzmán-Hernández et al., 2016). Para verificar este supuesto es necesario evaluar la adición del cultivo iniciador aquí formulado con leches que han sido resguardadas por periodos más prolongados, pues esta es una práctica común en el transporte y acopio de la leche entre los pequeños productores de los países en vías de desarrollo. Otra razón que podría explicar las cuentas bajas de estos indicadores, son las prácticas de manufactura, ya que aún cuando las cuentas sean bajas en la materia prima (leche), durante el proceso se puede incrementar notablemente el desarrollo de los microorganismos (Lendenbach y Marshall, 2009). La inspección visual del espacio de manufactura donde se elaboraron los quesos de la presente investigación hizo especular sobre esta hipótesis.

Con respecto a mohos y levaduras, el testigo presentó hasta casi ochenta veces el valor permitido por la normativa. Lo anterior sugiere que la pasteurización de la leche seguida de la adición del cultivo iniciador fue efectiva para contrarrestar el crecimiento de este grupo de microorganismos. La presencia de este tipo de microorganismos se debe a que son capaces de crecer en medio ácido (principalmente levaduras), el cual se favorece con la acumulación de suero durante la formación de la cuajada. Es posible, por tanto, que las BAL inoculadas pudieron estar produciendo otros metabolitos diferentes a los ácidos orgánicos como péptidos y peróxido de hidrógeno, los cuales se ha reportado sirven para controlar el crecimiento de mohos y/o levaduras (Dalié et al., 2010; Digaitiene et al., 2012).

Debido a que existen factores que no se pueden controlar y que contaminan la leche o el queso, deben aumentarse las precauciones en aquellos factores que sí pueden controlarse, como la pasteurización, el manejo y procesamiento de la cuajada hasta el empacado del producto. Esto con el objetivo de reducir aún más el número de microorganismos contaminantes en los quesos que se elaboran bajo el esquema propuesto en este trabajo.

El contenido de grasa del queso crema elaborado, se encuentra dentro de lo establecido por el *Codex Alimentarius* (FAO, 2011) para quesos crema. La igualdad entre muestras puede ser explicada por el hecho de que

ambos quesos fueron elaborados con materias primas (leche, cuajo, sal) provenientes del mismo lote. Sin embargo, las diferencias en los demás parámetros podrían ser un indicio del efecto de las BAL adicionadas al proceso. Aunque se observó diferencia entre muestras en los parámetros de color ( $L^* a^* b^*$ ), esto no influyó en la evaluación sensorial, ya que los panelistas no hicieron referencia a este atributo como un criterio para emitir su juicio. Se ha demostrado que se requieren diferencias mayores en los parámetros de color para que los panelistas perciban la diferencia (Wadhvani y McMahon, 2012). La diferencia pudo deberse a la presencia de las BAL que se agregaron y pudieron producir algunos metabolitos que imparten color (Irlinger y Mounier, 2009). Con respecto a la humedad, las diferencias entre el tratamiento y el testigo pueden deberse a varios factores; se ha reportado que el tratamiento térmico de la leche favorece la retención de humedad (Morales-Celaya et al., 2012). Otra explicación puede ser que las BAL adicionadas al T8 sean productoras de exopolisacáridos, los cuales se ha reportado que incrementan la retención de humedad en los quesos (Cárdenas et al., 2014).

Respecto al contenido de proteína, la diferencia pudo ser debida al proceso de pasteurización, ya que se ha reportado que tratamientos térmicos de la leche por encima de los 60 °C, promueven la desnaturalización de las proteínas del suero de la leche, lo que al final da como resultado la transferencia de proteínas del suero a la cuajada (Morales-Celaya et al., 2012). Otra explicación posible es que los microorganismos presentes en el queso testigo, al encontrarse en cantidad elevada, hayan promovido mayor degradación de las proteínas de la cuajada con la consecuente pérdida de productos nitrogenados hacia el suero (Centeno et al., 1999).

## Conclusiones

Partiendo de leche y queso de Ocosingo, fue posible aislar bacterias ácido lácticas que resultaron útiles en la elaboración de queso crema a partir de leche pasteurizada. El tratamiento formulado con las cepas 2S y 30Q (T8), resultó sensorialmente similar al queso elaborado tradicionalmente (con leche cruda) cuando se aplicó una prueba de discriminación. El único atributo que fue descrito como diferente en una prueba descriptiva fue el amargor. No se encontraron diferencias entre las muestras para el contenido de grasa y la firmeza de la pasta. El uso de las cepas en el queso crema de Ocosingo aumentó el contenido de proteína, cenizas y humedad. Además, la pasteurización de la leche y la adición del cultivo iniciador permitió obtener un queso crema inocuo, con cuentas de mesófilos aerobios, coliformes fecales y hongos y levaduras por debajo de los límites establecidos por las normas mexicanas.

## Literatura citada

- Akabanda, T., J. Owusu-Kwarteng, K. Tano-Debrah, C. Parlouda, and L. Jespersen. 2014. The use of lactic acid bacteria starter culture in the production of *nunu*, a spontaneously fermented milk product in Ghana. *Int. J. Food Sci.* 2014:ID721067. doi:10.1155/2014/721067
- Alegría, A., P. González, S. Delgado, A.B. Flórez, A.L. Hernández-Barranco, A. Rodríguez, and B. Mayo. 2016. Characterization of the technological behavior of mixtures of mesophilic lactic acid bacteria isolated from traditional cheeses made of raw milk without added starters. *Int. J. Dairy Technol.* 69:507-519. doi:10.1111/1471-0307.12253
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 2010. Dairy products. Chapter 33. In: W. Horwitz, and G. Latimer, editors, *Official methods of analysis of association of official analytical chemists*. 18th ed. AOAC Int., Gaithersburg, MD, USA. p. 1-95.
- Brandt, M.J. 2014. Starter cultures for cereal based foods. *Food Microbiol.* 37:41-43. doi:10.1016/j.fm.2013.06.007

- Bourdichon, F., S. Casaregola, C. Farrokh, J.C. Frisvad, M.L. Gerds, W.P. Hammes, J. Harnett, G. Huys, S. Laulund, A. Ouwehand, I.B. Powell, J.B. Prajapati, Y. Seto, E.T. Schure, A. Van-Boven, V. Vankerckhoven, A. Zgoda, S. Tuijelaars, and E.B. Hansen. 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 154:87-97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030
- Cárdenas, N., J. Calzada, A. Peirotén, E. Jiménez, R. Escudero, J. Rodríguez, M. Medina, and L. Fernández. 2014. Development of a potential probiotic fresh cheese using two *Lactobacillus salivarius* strains isolated from human milk. *Biomed. Res. Int.* 2014:801918. doi:10.1155/2014/801918
- Celik, O.F., and Z. Tarakci. 2017. The effects of starter cultures on chemical, biochemical and sensory properties of low-fat tulum cheeses during ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 70:583-591. doi:10.1111/1471-0307.12377
- Centeno, J.A., S. Menendez, M. Hermida, and J.L. Rodríguez-Otero. 1999. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 48:97-111. doi:10.1016/S0168-1605(99)00030-6
- Dalié, D.K.D., A.M. Deschamps, and F. Richard-Forget. 2010. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* 21:370-380. doi:10.1016/j.foodcont.2009.07.011
- Digaitiene, F., A.S. Hansen, G. Juodeikiene, D. Eidukonyte, and J. Josephsen. 2012. Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocin-like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi. *J. Appl. Microbiol.* 112:732-742. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05249.x
- FAO. 2011. Codex alimentarius: Milk and milk products. 2nd ed. FAO, Rome, ITA.
- FDA (Food and Drugs Administration). 2011. Bacteriological analytical manual (BAM). FDA, USA. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm> (accessed Jan. 20, 2017).
- Felicio, T.L., E.A. Esmerino, V.A. Vidal, L.P. Cappato, R.K. Garcia, R.N. Cavalcanti, M.Q. Freitas, C.A. Conte-Junior, M.C. Padilha, M.C. Silva, R.S. Raices, D.B. Arellano, H.M. Bollini, M.A. Pollonio, and A.G. Cruz. 2016. Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic minas cheese added with arginine. *Food Chem.* 196:628-637. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.102
- Galli, B., J.G. Martin, P.P. da-Silva, E. Porto, and M.H. Spoto. 2016. Sensory quality of camembert-type cheese: Relationship between starter cultures and ripening molds. *Int. J. Food Microbiol.* 234:71-75. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.025
- González-Córdova, A.F., C. Yescas, A.M. Ortiz-Estrada, M.A. De-la-Rosa-Alcaraz, A. Hernández-Mendoza, and B. Vallejo-Cordoba. 2016. Invited review: artisanal Mexican cheeses. *J. Dairy Sci.* 99:3250-3262. doi:10.3168/jds.2015-10103
- Granato, D., J.C. Ribeiro, I. Castro, and M.L. Masson. 2010. Sensory evaluation and physicochemical optimization of soy-based desserts using response surface methodology. *Food Chem.* 121:899-906. doi:10.1016/j.foodchem.2010.01.014
- Guarcello, R., N. Carpino, R. Gaglio, A. Pino, T. Rapisarda, C. Caggia, G. Marino, R.L. Randazzo, L. Settani, and M. Todaro. 2016. A large factory-scale application of selected autochthonous lactic acid bacteria for PDO Pecorino Siciliano cheese production. *Food Microbiol.* 59:66-75. doi:10.1016/j.fm.2016.05.011
- Guerrero, L., M.D. Guàrdia, J. Xicola, W. Verbeke, F. Vanhonacker, S. Zakowska-Biemans, M. Sajdakowska, C. Sulmont-Rossé, S. Issanchou, M. Contel, M.L. Scalvedi, B.S. Granli, and M. Hersleth. 2009. Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study. *Appetite* 52:345-354. doi:10.1016/j.appet.2008.11.008
- Guzmán-Hernández, R., A. Contreras-Rodríguez, R. Hernández-Vélez, L. Perez-Martínez, A. López-Merino, M.B. Zaidi, and T. Estrada-García. 2016. Mexican unpasteurised fresh cheeses are contaminated with *Salmonella* spp., non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* and potential uropathogenic *E. coli* strains: a public health risk. *Int. J. Food Microbiol.* 237:10-16. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.018

- Irlinger, F., and J. Mounier. 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20:142-148. doi:10.1016/j.copbio.2009.02.016
- Karametsi, K., S. Kokkinidou, I. Ronningen, and D.G. Peterson. 2014. Identification of bitter peptides in age cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* 62:8034-8041. doi:10.1021/jf5020654
- Karimi, R., A.M. Mortazavian, and A. Amiri-Rigi. 2012. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. *Food Microbiol.* 29:1-9. doi:10.1016/j.fm.2011.08.008
- König, H., and J Fröhlich. 2017. Lactic acid bacteria. In: H. König et al., editors, *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. 2nd ed. Springer, Gewerbestrasse, CHE. p. 3-41.
- Lawless, H.T., and H. Heymann. 2010. *Sensory evaluation of food principles and practices*. 2nd ed. Springer, NY, USA.
- Leboš, P.A., J. Beganović, B. Kos, K. Uroić, M. Blažić, and J. Šušković. 2012. Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production. *Food Technol. Biotechnol.* 50:141-151.
- Leroy, F., and L. De-Vuyst. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15:67-78. doi:10.1016/j.tifs.2003.09.004
- Lendenbach, L.L., and R.T. Marshall. 2009. Microbiological spoilage of dairy products. In: W.H. Sperber, and M.P. Doyle, editors, *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. Springer, NY, USA. p. 41-67.
- Miloradovic, Z., N. Kljajevic, J. Miocinovic, N. Tomic, J. Smiljanic, and O. Macej. 2017. High heat treatment of goat cheese milk. The effect on yield, composition, proteolysis, texture and sensory quality of cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 68:1-8. doi:10.1016/j.idairyj.2016.12.004
- Morales, F., J.I. Morales, C.H. Hernández, and H. Hernández-Sánchez. 2011. Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164:889-905. doi:10.1007/s12010-011-9182-6
- Morales-Celaya, M.F., C. Lobato-Calleros, J. Alvarez-Ramírez, and E.J. Vernon-Carter. 2012. Effect of milk pasteurization and acidification method on the chemical composition and microstructure of a Mexican pasta filata cheese. *LWT - Food Sci. Technol.* 45:132-141. doi:10.1016/j.lwt.2011.08.015
- Mukisa, I.M., Y.B. Byaru, C.M.B.K. Muyanja, T. Langsrud, and J.A. Narvhus. 2017. Production of organic flavor compounds by dominant lactic acid bacteria and yeasts from Obushera, a traditional sorghum malt fermented beverage. *Food Sci. Nutr.* 5:702-712. doi:10.1002/fsn3.450
- Oh, N.S., J.Y. Joung, J.Y. Lee, S.H. Kim, and Y. Kim. 2016. Characterization of the microbial diversity and chemical composition of gouda cheese made by potential probiotic strains as an adjunct starter culture. *J. Agric. Food Chem.* 64:7357-7366. doi:10.1021/acs.jafc.6b02689
- Ramos-Izquierdo, B., A. Bucio-Galindo, C. Bautista-Muñoz, E. Aranda-Ibañez, y F. Izquierdo-Reyes. 2009. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Univ. Cienc.* 25:159-171.
- Rangel-Ortega, S.C. 2011. *Identificación y caracterización de los consorcios microbianos del queso crema tropical*. Tesis MSc., CIAD, Sonora, MEX.
- Secretaría de Salud. 2010a. Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Secretaría de Salud, MEX. <http://www.economia-noms.gob.mx/normas/noms/2010/243ssa12010.pdf> (consultado 10 set. 2017).
- Secretaría de Salud. 2010b. Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009: Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Secretaría de Salud, MEX. <http://www.economia-noms.gob.mx/normas/noms/2010/251ssa12010.pdf> (consultado 12 set. 2017).

- Smit, G., B.A. Smit, and W.J. Engels. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:591-610. doi:10.1016/j.femsre.2005.04.002
- Terzić-Vidojević, A., K. Tonković, P.A. Leboš, J. Beganović, I. Strahinić, M. Kojić, K. Veljović, N. Golić, B. Kos, N. Čadež, L. Gregurek, J. Šušković, P. Raspor, and L. Topisirović. 2015. Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. *LWT - Food Sci. Technol.* 63:298-306. doi:10.1016/j.lwt.2015.03.050
- Tsakalidou, E., E. Manolopoulou, V. Tsilibari, M. Georgalaki, and G. Kalantzopoulos. 1993. Esterolytic activities of *Enterococcus durans* and *Enterococcus faecium* strains isolated from Greek cheese. *Netherlands Milk Dairy J.* 47:145-150.
- Vázquez-Velázquez, R., M. Salvador-Figueroa, M. Adriano-Anaya, G. DeGyves-Córdova, and A. Vázquez-Ovando. 2018. Use of starter culture of native lactic acid bacteria for producing an artisanal Mexican cheese safe and sensory acceptable. *CyTA - J. Food* 16:460-468. doi:10.1080/19476337.2017.1420694
- Wadhvani, R., and D.J. McMahon. 2012. Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. *J. Dairy Sci.* 95:2336-2346. doi:10.3168/jds.2011-5142