



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA
QUÍMICA

VIABILIDAD Y DESARROLLO DE CEPAS DE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM*
EN LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO CAMEMBERT.

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

FELIPE IGNACIO PEÑA PEÑA

PROFESOR GUÍA:
LUIS PUENTE DIAZ

VALDIVIA – CHILE
2018

VIABILIDAD Y DESARROLLO DE CEPAS DE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* EN LA ELABORACIÓN Y MADURACIÓN DEL QUESO CAMEMBERT.

En la actualidad el consumidor ya no solo busca alimentos saludables que complementen una dieta balanceada y es cada vez más común ver en las vitrinas de supermercados y locales de venta de alimentos productos que cumplen un sinfín de funciones, más allá de su aporte nutricional. Esta tendencia mundial ha influenciado e impactado al mercado nacional, el cual se desea posicionar como una de las potencias alimentarias a nivel global, impulsando la búsqueda y el desarrollo de nuevos productos que satisfagan las necesidades de los consumidores, tales como los alimentos probióticos, los cuales se caracterizan por presentar cepas bacterianas que tiene la capacidad de colonizar un compartimiento del hospedero (consumidor), modificando la flora bacteriana natural, brindando una serie de beneficios a la salud.

En este proyecto se evaluó la factibilidad de producir un queso tipo camembert inoculado con una cepa probiótica (*Bifidobacterium bifidum*), determinando la viabilidad y desarrollo de ésta en el proceso de elaboración y maduración de este tipo de queso. Para ello se procedió a elaborar inicialmente cultivos madres de esta cepa los cuales fueron utilizados para inocular la leche que posteriormente se utilizó para la elaboración del queso camembert.

Los resultados fueron positivos, comprobando que si es posible elaborar este tipo de queso alcanzando una concentración de la cepa *Bifidobacterium bifidum* superior a 10^6 UFC/g para que el alimento elaborado pueda tener la característica de probiótico. Además, se evaluó si la incorporación de esta cepa alteraba las características sensoriales típicas de este tipo de quesos, llegando a la conclusión que los jueces que realizaron la evaluación sensorial no advirtieron diferencias significativas entre el queso inoculado y uno elaborado de forma tradicional.

Cabe destacar que para estudios futuros se puede evaluar la factibilidad de una producción a gran escala de este tipo de queso y la sustentabilidad económica que conlleva este proceso.

TABLA DE CONTENIDOS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Queso Camembert	3
2.1.1	Origen	3
2.1.2	Características del queso Camembert	3
2.1.3	Composición química del queso Camembert	3
2.2	Proceso de elaboración del queso Camembert	4
2.2.1	Materia prima	4
2.2.2	Estandarización	4
2.2.3	Tratamiento térmico	4
2.2.4	Aditivos incorporados en el procesamiento	5
2.2.4.1	Cloruro de calcio	5
2.2.5	Adición de cultivos lácticos y fúngicos	5
2.2.6	Coagulación de la leche y cuajos usados	5
2.2.7	Tratamiento de la cuajada	6
2.2.7.1	Corte, reposo y agitación de la cuajada	6
2.2.8	Moldeo y volteo	6
2.2.9	Tratamiento del queso	6
2.2.9.1	Salado	7
2.2.9.2	Maduración	7
2.3	Contexto nacional de los alimentos funcionales	7
2.4	Probióticos (definición)	8
2.4.1	Microorganismos usados como probióticos	8
2.4.2	Efectos benéficos de los microorganismos probióticos	11
2.4.3	Características de las bifidobacterias	13
2.5	Propiedades del queso beneficiosas para el crecimiento de	13

	bifidobacterias	
2.6	Incorporación de bifidobacterias en quesos	15
2.7	Motivo de la Memoria	16
3	MATERIAL Y METODO	17
3.1	Cepa utilizada	17
3.2	Preparación y manejo de los cultivos madres	17
3.2.1	Activación de las cepas	17
3.2.2	Medio dilución y de cultivo	17
3.2.3	Siembra de <i>Bifidobacterium bifidum</i>	19
3.2.4	Recuento de <i>Bifidobacterium bifidum</i>	21
3.2.5	Expresión de resultados	21
3.3	Elaboración queso Camembert	21
3.4	Análisis microbiológicos	22
3.4.1	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	22
3.4.2	Recuento de hongos y levaduras.	23
3.4.3	Recuento de coliformes.	23
3.5	Determinación de pH en queso Camembert	23
3.6	Evaluación sensorial de queso Camembert	23
3.7	Análisis estadístico de datos	23
4	RESULTADOS	24
4.1	Tiempo de incubación	24
4.2	Efecto de la dilución de los cultivos madres en la leche para la elaboración de queso Camembert	25
4.3	Viabilidad de <i>Bifidobacterium bifidum</i> durante la maduración del queso	26
4.4	Desarrollo de la concentración microbiana en el queso Camembert durante el período de maduración	28
4.5	Análisis de indicadores microbiológicos	30
4.6	Determinación de pH en queso Camembert	31
4.7	Evaluación sensorial del queso Camembert con probióticos	32

5	CONCLUSIONES	34
6	BIBLIOGRAFIA	35
7	ANEXOS	40
7.1	Anexo 1: Diagrama de flujo de elaboración de queso Camembert	40
7.2	Anexo 2: Diagrama de flujo para la elaboración de cultivos madres	41
7.3	Anexo 3: Análisis estadístico de la variación de la concentración logarítmica de probiótico entre las muestras en un determinado tiempo	42
7.4	Anexo 4: Análisis estadístico de la variación de la concentración logarítmica de probiótico en los conjuntos de muestra en función del tiempo de maduración	45
7.5	Anexo 5: Cálculo de Chi Cuadrado (X^2).	46
7.6	Anexo 6: Ficha de evaluación sensorial	47

1. INTRODUCCIÓN

El estilo de vida es, entre otros, el responsable del aumento de determinadas enfermedades, sobre todo de las causadas por microorganismos. La falta de actividad física, el consumo de alimentos ricos en hidratos de carbono refinados y grasas, y el escaso aporte de fibra en la dieta son la base de muchas enfermedades en la actualidad.

La dieta consumida hace un millón de años por nuestros antecesores contenía un 50% menos de proteínas, un 75% menos de grasas saturadas y un 90% menos de sodio. El hombre del Paleolítico consumía entre 4 y 10 veces más fruta y fibra que el actual, lo que le aportaba 10 veces más vitaminas y antioxidantes. Pero la más llamativa diferencia con nuestros ancestros es que en su dieta ingerían diariamente más de 10^9 UFC de bacterias beneficiosas para la salud, entre las que se encontraban distintas especies de *Lactobacillus*. Este aporte de microorganismos era debido a que estos alimentos, sobre todo vegetales, eran almacenados durante mucho tiempo produciendo fermentaciones, entre ellas la fermentación láctica. Algunos de estos alimentos se siguen consumiendo en la actualidad como el *ogi* (Africa), el *kenkey* (Ghana) y el pozol (México).

La búsqueda de beneficios que contribuyan al mejoramiento de la salud, como el ejercicio físico y el consumo de alimentos sanos se han convertido en partes importantes de la vida humana. Este comportamiento ha venido en aumento y el mercado nacional e internacional ofrece una amplia gama de productos con distintas ventajas nutricionales, como es el caso de los **alimentos funcionales probióticos**, productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped.

El consumo de alimentos vegetales fermentados en los países desarrollados está en franco receso, tan sólo en algunos países se consume *sauerkraut* y salsa de soja, entre otros. En cambio, el consumo de productos lácteos fermentados va en aumento, siendo los países del este de Europa los mayores consumidores. Ilya Metchnikoff, en 1900, centró sus estudios en demostrar que el consumo de uno de estos alimentos, el yogur, era el responsable de la gran longevidad de los habitantes de Bulgaria.

Desde entonces ha crecido el interés por estos alimentos con microorganismos beneficiosos para la salud, y más concretamente por los productos lácticos fermentados y madurados.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Queso Camembert.

El Camembert, como señala el diccionario de la RAE, es un queso de origen francés de pasta blanda, untuosa y suave. Se trata de una denominación genérica para este queso, que actualmente se elabora en todo el mundo. Francia no ha solicitado la protección del término genérico «Camembert», pero sí de uno en particular, que es el Camembert de Normandie. Este queso pertenece al grupo de los quesos denominados pasta blanda, de “corteza enmohecida” (SCOTT, 2002).

2.1.1 Origen. El Camembert es un queso francés fabricado originalmente en Normandía. Debe su nombre a la ciudad de Camembert, cerca de Vimoutiers en el departamento de Orne. Se comenzó a fabricar en 1791 por una granjera de Camembert, Marie Harel, siguiendo los consejos de un sacerdote de Brie que estaba refugiado en su casa (SCOTT, 2002).

2.1.2 Características del queso Camembert. El queso Camembert es un queso de pasta blanda, pero no desmenuzable, de forma de un cilindro plano recubierto de mohos blancos (CODEX ALIMENTARIUS, 2010). Normalmente es elaborado a partir de leche pasteurizada de vaca, pero también pueden ser elaborados con leche cruda. El Codex (2010) describe el cuerpo del queso como uniforme y de un color de blanco a amarillo cremoso.

Para la formación de la cuajada se le adicionan los cultivos lácticos a la leche y posteriormente se le agrega cuajo en forma líquida. Luego la cuajada se suele pasar a los moldes para el drenaje del suero inmediatamente después del corte sin previa agitación. A medida que el suero drena en los moldes la cuajada encoge y se moldea (SCOTT, 2002).

La formación de la corteza y la maduración (proteolisis) de la superficie hacia el centro se debe principalmente a la actividad de *Penicillium camemberti*. El tamaño del queso debe tener una altura máxima de 5 cm de altura y su peso por lo general va de 80 a 500 g. (CODEX ALIMENTARIUS, 2010)

2.1.3 Composición química del queso Camembert. En el siguiente cuadro (CUADRO 1) se puede apreciar la composición química del queso camembert:

CUADRO 1. Composición química del queso Camembert por cada 100 g.

<i>Parámetro</i>	<i>(g)</i>
Materia grasa	23
Proteínas	18,5
Sal	2,5
Cenizas	3,8
Sólidos totales	47,5
Humedad	52,5
pH	4,7 – 5,5

FUENTE: Elaboración propia resumida a partir de FOX. 2000.

2.2 Proceso de elaboración del queso Camembert

En el Anexo 1 se puede apreciar el diagrama de flujo del proceso de elaboración de queso Camembert.

2.2.1 Materia prima. El queso Camembert es elaborado a partir de leche pasteurizada o con leche cruda (SCOTT, 2002; MIL, 1996).

2.2.2 Estandarización. El contenido de grasa y proteína de la leche en varios casos es el principal responsable de las diferencias entre un tipo de queso y otro, además de mejorar su calidad nutricional, por lo que se recomienda estandarizar su contenido dependiendo de los requerimientos del tipo de queso a elaborar. Se suele estandarizar el contenido de grasa de la leche el cual debe estar entre un 40 a un 60% de la materia seca (WALSTRA, 1999).

2.2.3 Tratamiento Térmico. El tratamiento térmico de la leche constituye un intento de estandarización de su calidad biológica mediante la destrucción de los microorganismos y enzimas no deseados. La leche se pasteuriza por un procedimiento LTH (pasterización baja) a 60 – 63°C durante 30 min. (SCOTT; 2002). En otras publicaciones se aplican pasteurizaciones HTST temperaturas de 72°C durante 15 s (WALSTRA, 1999; MIL, 1996). En el manual de la industria láctea (MIL) recomiendan aplicar un proceso de termización (65°C durante 15 s) previo a la pasteurización en leches las cuales han sido almacenadas durante periodos superiores a 24 h. El almacenamiento bajo

condiciones de refrigeración y durante varias horas produce un decaimiento en el contenido nutricional de la leche, debido principalmente a la precipitación del calcio como fosfato, lo cual es reversible al aplicar un tratamiento térmico leve previamente.

2.2.4 Aditivos incorporados en el procesamiento. Aparte de las bacterias del cultivo láctico, hongo de crecimiento superficial y los coagulantes, existen varios aditivos empleados en la preparación de la leche para el queso y en la cuajada del queso (SCOTT, 2002; MIL, 1996).

2.2.4.1 Cloruro de calcio. Es una sal, la cual es agregada a la leche como una solución estandarizada cuando existe una deficiencia o una alteración de calcio a consecuencia del tratamiento a que es sometida la leche, ya sea el calentamiento o enfriamiento. El propósito de la utilización del cloruro de calcio es la de obtener una coagulación satisfactoria. La cantidad de cloruro de calcio usado es de 0,02% como máximo (SCOTT, 2002; MIL, 1996). Al agregar el cloruro de calcio la temperatura es ajustada a 38°C (SCOTT, 2002).

2.2.5 Adición de cultivos lácticos y fúngicos. En la elaboración de este tipo de queso se emplean cultivos mixtos mesófilos compuestos por *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*. La cantidad de cultivo láctico varía, pero por lo general está entre 1 y 2 % (SCOTT, 2002). En otras publicaciones (WALSTRA, 1999) recomiendan agregar un 0,3% del cultivo en la etapa de la pre-acidificación. Al agregar el cultivo láctico la temperatura de la leche debe ser ajustada a 32°C (WALSTRA, 1999). En el Manual de la Industria Láctea recomiendan ajustar la temperatura a 30°C.

Adicionalmente se utiliza también un cultivo fúngico que incluye *Penicillium camemberti* y/o *Penicillium candidum*. Estos cultivos se extienden sobre la superficie del queso, donde tiene lugar su crecimiento, desde el exterior al interior de la masa. La inoculación del cultivo de mohos se suele hacer en el momento de la pre-maduración de la cuajada, aunque adicionalmente se puede realizar durante el salado o en la sala de maduración (WALSTRA, 1999). La cantidad de cultivo es de 0,5 a 1%.

2.2.6 Coagulación de la leche y cuajos usados. El objetivo de la adición de cuajo a la leche es la de formar una cuajada firme que sea posible cortar en cubos regulares. Esta cuajada tiene la particularidad que con agitación, fermentación y aumento de la temperatura elimina el agua que se atrapa en su interior, permitiendo la concentración de los sólidos de la leche (MIL, 1996).

Para agregar el cuajo, la temperatura de la leche debe mantenerse a 32- 34°C (WALSTRA, 1999). La cantidad de cuajo depende de su fuerza, pero oscila

entre 10 a 15 ml por cada 100 litros de leche (SCOTT, 2002). Según el Manual de Industria Láctea la cantidad de cuajo a agregar no debe ser mayor a 30 ml por cada 100 L de leche. En otras publicaciones se indica que la cantidad debe ser alrededor del 0,015% (WALSTRA, 1999). Posteriormente la leche se deja en reposo y la tina se mantiene cubierta hasta que la cuajada adquiera una firmeza adecuada, tiempo que va de 35 a 45 min. (SCOTT, 1981; MIL, 1996). Es recomendable agitar la leche durante 2 a 3 min. inmediatamente después de agregar el cuajo para asegurar una buena distribución de este por toda la leche (MIL, 1996).

2.2.7 Tratamiento de la cuajada. Esta etapa del proceso de elaboración se refiere al manejo a la cual esta sometido el gel una vez alcanzado la consistencia apropiada y se extiende hasta la obtención del queso.

2.2.7.1 Corte, reposo y agitación de la cuajada. Cuando el coágulo adquiere la firmeza adecuada se procede al corte. Para determinar el punto en el cual el coágulo debe ser cortado, se utilizan varios métodos, uno de ellos, hundiendo la mano en la cuajada, otros utilizan el mismo termómetro, el cual es hundido por debajo de la cuajada y luego levantando, causando la rotura en una línea de división (SCOTT, 2002).

Para SCOTT (2002), la cuajada debe ser cortada en cubos de 1-2 cm. Según WALSTRA (1999), los cortes deben ser de 2 a 2,5 cm. Posteriormente la cuajada debe quedar en reposo por 30-50 min. antes de comenzar la agitación suave.

2.2.8 Moldeo y volteo. La cuajada se pasa a los moldes que son de una sola pieza fabricados en acero inoxidable o Policloruro de Vinilo (PVC) duro, abiertos en ambos extremos, los que son colocados en una superficie que permita la salida del suero. A medida que el suero drena en los moldes la cuajada encoge y se moldea (SCOTT, 2002). En esta etapa se elimina entre un 20 a un 40% del suero (WALSTRA, 1999).

La cuajada, que permanece en los moldes a una temperatura de 26-28°C, se voltea en los mismos al cabo de 2 h. Este proceso dura entre 26-28 h, lográndose una caída del pH hasta 4,5-5. Posteriormente los quesos son colocados en una cámara fría a aproximadamente 12°C para enfriarlos (WALSTRA, 1999).

2.2.9 Tratamiento del queso. Una vez obtenidos los quesos, éstos son sometidos a tratamientos tales como el salado y la maduración, para finalmente ser enviados a la sala de maduración.

2.2.9.1 Salado. El objetivo del salado es dar al queso su sabor característico, regular el desarrollo de los microorganismos y regular la función de las enzimas (MIL, 1996).

Existen varios tipos de salado, para el caso particular de este queso se hace un salado en seco, el cual se efectúa en la superficie del queso frotando la sal a fin de distribuirla uniformemente. Los quesos de 250 g. precisan unos 6 a 9 g. de sal (SCOTT, 2002). En otras publicaciones (WALSTRA, 1999) indican que el salado puede ser mediante una salmuera, aunque no especifican el tiempo ni la concentración de sal de la salmuera para el queso camembert en específico. El contenido de sal final debe variar entre 1-2% (WALSTRA, 1999; MIL, 1996).

2.2.9.2 Maduración. La maduración del queso incluye todos los cambios químicos y físicos que ocurren después de su elaboración. Esto incluye cambios en su estructura y composición, desarrollo de propiedades organolépticas, tanto de origen bioquímico como microbiológico. El desarrollo de las propiedades del queso, como los cambios en la consistencia, el sabor y olor están atribuidos a los cambios bioquímicos ocurridos a la lactosa, grasa y proteínas (WALSTRA, 1999).

Según SCOTT (2002), el queso se deja secar durante 2 d a 18°C a una humedad relativa de 70 a 80 % y seguidamente se maduran durante 10 a 12 d a 12 -13°C en una humedad relativa de 90 a 95% para favorecer el crecimiento de mohos en la corteza. Durante este período el moho comienza a desarrollarse desde la superficie del queso hacia el interior. La maduración se completa entre 21 a 35 d. Los quesos deben ser volteados cada 3-4 días (WALSTRA, 1999).

2.3 Contexto nacional de los Alimentos Funcionales

Durante los últimos años Chile se ha fijado como meta ser una de las máximas potencias alimentarias a nivel mundial. Para ello, la industria se ve en la obligación de crear productos innovadores y de valor agregado. Bajo este contexto, uno de los campos que ha experimentado un mayor desarrollo es el de los **alimentos funcionales**. Estos se caracterizan por no solo entregar al consumidor sus propiedades nutricionales básicas, sino que también son capaces de modular una o varias funciones del organismo, contribuyendo a reducir el riesgo a enfermedades.

El desarrollo de alimentos funcionales no solo les da valor agregado a los productos de exportación de la industria chilena, también contribuye al consumo de alimentos más saludables que ayuden a prevenir enfermedades de alto impacto en la salud pública. En la actualidad, dentro de los productos de exportación de mayor volumen podemos encontrar el salmón y la trucha, alcanzando valores que rondan los US\$ 2.207 millones en el año 2006,

principalmente al mercado estadounidense (36%), el mercado asiático representado por Japón (32%) y la unión europea (14%). Dentro de estos niveles de exportación, el producto con mayor valor agregado es el salmón y trucha ahumada, que representa solo un 3,1% de las exportaciones de estos pescados, lo que evidencia que aún existen grandes oportunidades para desarrollar productos nuevos y con mayor valor agregado, en particular aquellos que puedan demostrar mayor actividad funcional y efectos saludables para el consumidor.

2.4 Probióticos (definición)

La palabra “probiótico” significa “para la vida”, proviene del griego y en el pasado tuvo muchas definiciones. Una de las primeras fue sugerida en 1965 por Lilly y Stilwell (citado por GOMES Y MALCATA, 1999) en el cual los probióticos se describen como sustancias producidas por un protozoario que estimulaban el crecimiento en otro.

Sin embargo, esta definición se ha ido modificando a través de los años. En 1974, Parker (citado por SCHREZENMEIR Y DE VRESE, 2001) definió a los probióticos como organismos y sustancias que tienen un efecto benéfico en el animal huésped contribuyendo al balance en su flora intestinal. Por lo tanto, estas definiciones no son muy adecuadas ya que la palabra “sustancia” incluye suplementos químicos, como antibióticos y los probióticos carecen de dichas sustancias (FOOKS AND GIBSON, 2002).

En 1989, Fuller (citado por GOMES Y MALCATA, 1999) redefinió a los probióticos como “suplementos microbianos vivos que influyen de forma benéfica sobre el animal huésped, mejorando su balance microbiano intestinal”, haciendo notar la importancia de las células vivas como componentes esenciales de los probióticos.

Desde entonces, la definición de probiótico ha evolucionado notablemente, de forma que hoy se define como microorganismos vivos, principalmente bacterias, usadas en forma de suplementos nutricionales que, tras ser ingeridos en cantidad suficiente, alteran la flora bacteriana natural del intestino o algún compartimiento del hospedero (personas o animales) que los ingieren (por implantación o colonización), provocando efectos benéficos sobre su salud, mas allá de los efectos nutricionales tradicionales (Havenaar & Huis In't Veld, 1992, citado en GIBSON, 2005).

2.4.1 Microorganismos usados como probióticos. Entre los microorganismos probióticos utilizados para la elaboración de alimentos de consumo humano, se encuentran las bacterias ácido-lácticas (BAL), que comprenden lactobacilos y bifidobacterias, pero también se utilizan otras cepas

bacterianas no patógenas, como *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y microorganismos no bacterianos, como *Saccharomyces boulardii*, que es una levadura no patógena (TAMIME, 2005). Una característica de los microorganismos considerados probióticos es que son bacterias aisladas del tracto intestinal de un individuo saludable e introducidas nuevamente en el intestino, generalmente por medio de algún tipo de vehículo alimenticio (SPANHAAK *et al.*, citados por AMORES *et al.*, 2004)

Se han identificado a 56 especies de lactobacilos y 29 especies de bifidobacterias. En el cuadro 2 se pueden apreciar los principales microorganismos reconocidos como probióticos.

CUADRO 2. Especies bacterianas más importantes usadas como probióticos.

<i>Microflora</i>	<i>Especie</i>
Lactobacilli	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
	<i>Lactobacillus reuteris</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus gasseri</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Bifidobacteria	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Bifidobacterium longum</i>
	<i>Bifidobacterium breve</i>
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
	<i>Bifidobacterium infantis</i>
Enterococci	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>
Lactococci	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Levaduras	<i>Saccharomyces boulardii</i>

FUENTE: Gibson, 2005



Bifidobacterium bifidum



Lactococcus lactis



Lactobacillus acidophilus

Estos microorganismos deben presentar ciertas características para ser considerados probióticos las cuales se presentan en el siguiente cuando (CUADRO 3).

CUADRO 3. Criterios para la selección de microorganismos probióticos.

Criterio	Selección
Origen	Cepas aisladas de humanos se utilizan en humanos y las aisladas de animales se utilizan en las especies de la que se aislaron.
Resistencia al tránsito intestinal	Deben sobrevivir a las condiciones del tracto digestivo.
GRAS	Deben ser generalmente reconocidas como inocuas.
Adhesión a la mucosa intestinal	Pre-requisito para colonizar el tracto intestinal y ejercer los efectos benéficos.
Identificación bioquímica	Deben estar plenamente identificados fenotípicamente hasta la especie.
Estimulación del sistema inmunológico	Deben ser capaces de estimular el sistema inmune.
No ser oportunista	Aun en estado de inmunosupresión del huésped, no deben causar enfermedad.
Antagonismo contra patógenos	Debe poseer efectos probados contra patógenos del tracto intestinal.
Soportar aplicación tecnológica	Permanecer viable en los procesos de elaboración de alimentos y durante el almacenamiento.

FUENTE: Elaboración propia resumida a partir de Ouwehand *et al.*, 1999.

2.4.2 Efectos benéficos de los microorganismos probióticos. La importancia de los probióticos es significativa ya que tienen una aplicación tanto a nivel industrial en la elaboración de productos, como desde el punto de vista digestivo en el ser humano. Al modificar la microflora intestinal, los probióticos influyen directa e indirectamente en la salud humana (TAMIME, 2005).

Se ha estudiado que los probióticos pueden incrementar la resistencia contra los patógenos intestinales mediante mecanismos antimicrobianos. Estos incluyen la colonización competitiva y la producción de ácidos orgánicos, como los ácidos lácticos y otros ácidos de cadena corta, bacteriocinas y otros metabolitos primarios como el peróxido de hidrógeno. La producción de ácidos orgánicos por los microorganismos probióticos disminuye el pH intestinal y por lo tanto inhibe el crecimiento de la flora patógena (TAMIME, 2005).

Conforme a lo indicado, para que los probióticos actúen en la flora intestinal es necesario una ingesta mayor o igual a 10^7 cel/g (Morean *et al.*, citado por BOURLIOUX, 2003).

Por su parte GIBSON, 2005, señala que los probióticos contribuyen a mejorar la digestión de la lactosa y reducen la sintomatología por la mala absorción, gracias a que los lactobacilos poseen una actividad enzimática (lactasa) que sigue funcionando en el intestino y permite la digestión de la lactosa, lo cual favorece que haya una tolerancia a los lácteos.

Por otro lado, la administración de antibióticos altera la microbiota intestinal y favorecen el crecimiento de ciertos patógenos oportunistas como *Clostridium difficile*, agente causal de gastroenteritis bacteriana. Los probióticos restauran el balance microbiano y bloquean la proliferación de este patógeno, disminuyendo significativamente síntomas como la diarrea (GIBSON, 2005).

Además, el uso de antibióticos produce intensos casos de diarrea en por lo menos un 20% de los pacientes controlados bajo este tipo de terapias. El consumo de ciertos probióticos como *S. boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Enterococcus faecium* reducen la incidencia de casos de diarrea por parte de los pacientes (GIBSON, 2005).

Casos de diarrea aguda son provocados por la infección del rotavirus, la cual es una de principales causas de mortalidad infantil. Varios estudios han comprobado que el consumo de ciertos probióticos como *Lb. rhamnosus* GG, *Bifidobacterium bifidum* y *Streptococcus thermophilus* disminuyen los efectos negativos del rotavirus (Saavedra et al., 1994; Guandalini et al., 2000, citado en GIBSON, 2005). Sin embargo, *Lb. rhamnosus* GG ha mostrado los resultados más prometedores. Un estudio demostró que cepas de *Lb. rhamnosus* GG inactivadas por calor ejercen un efecto beneficioso (Kaila et al., 1995 citado en GIBSON, 2005). Aunque las células no viables no lograron producir una respuesta inmune similar a sus homólogos viables, el potencial de ejercer efectos beneficiosos en el hospedero es relevante, especialmente en los países en desarrollo, donde mantener la viabilidad del producto puede ser un

problema. Sin embargo, es mucho mejor que los probióticos sean viables para ejercer efectos inhibidores. Esto se debe a que los mecanismos competitivos, tales como la formación de ácidos, la excreción antimicrobiana, la limitación de sustrato y la ocupación de los lugares de colonización, requieren viabilidad. La estimulación de la respuesta inmune no (GIBSON, 2005).

Se ha observado inmunomodulación por *L. acidophilus* y bifidobacterias, pero el mecanismo no es claramente entendido (Schiffrin *et al.* citado por SHAH, 2001). Se ha informado que ingiriendo los probióticos del yogurt, se estimula la producción de citocinas en células sanguíneas y aumento de la actividad de macrófagos (Marteau *et al.* Citado por SHAH, 2001), incrementan la actividad natural de las células del hígado e incrementan los niveles de inmunoglobulinas en especial las secretoras de IgA. Las evidencias de las investigaciones sugieren que la inmunidad de la mucosa intestinal disminuye con la edad, permitiendo que los adultos mayores sean especialmente susceptibles a enfermedades infecciosas (SANDERS, 1999).

Las bacterias ácido lácticas y los productos fermentados hechos de ellas tienen una actividad potencial anti carcinogénica. *B.longum* y *B.infantis* son agentes efectivos contra los tumores. Su mecanismo de acción se debe a la supresión de las enzimas bacterianas, a la activación del sistema inmune del huésped y a la reducción de pH intestinal. Las bacterias probióticas pueden remover las fuentes procarcinogénicas o las enzimas que desarrollan la formación de células carcinógenas (SHAH, 2001).

Estudios recientes han demostrado que el consumo de ciertos cultivos de productos lácteos puede reducir el nivel de colesterol en la sangre. El consumo de leches fermentadas conteniendo un gran número de bacterias probióticas ($\sim 10^9$) por personas hipercolestéremicas pueden reducir los niveles de colesterol de 3,0 a 1,5 g/L (Homma citado por SHAH, 2001). La capacidad de ciertos lactobacilos y bifidobacterias para la desconjugación enzimática de los ácidos biliares se ha sugerido que tiene un papel en la regulación de niveles del colesterol sanguíneo en humanos. Los ácidos biliares desconjugados son más fáciles de excretar (De Smet *et al.* citado por SANDERS, 1999).

El tracto urogenital de las mujeres es altamente colonizado por bacterias y es altamente susceptible a infecciones. El consumo oral de ciertos probióticos como *Lb. rhamnosus GR-1* y *Lactobacillus fermentum RC-14*, pueden disminuir el desarrollo de infecciones provocadas a la vagina. Diferentes estudios han correlacionado la salud vaginal con la presencia de lactobacilos, especialmente lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno (GIBSON, 2005).

Los efectos nutricionales de los probióticos han sido muy estudiados en las leches fermentadas con lactobacilos. Estos productos tienen un menor contenido de lactosa y un alto contenido de aminoácidos libres y ciertas vitaminas, en comparación a otros productos fermentados de origen vegetal o animal. Se ha informado que los lactobacilos y bifidobacterias producen ácido

fólico, niacina, tiamina, riboflavina, piridoxina y vitamina K (COLLINS *et al.*, 1992).

2.4.3 Características generales de las bifidobacterias. Las especies del genero *Bifidobacterium* forman parte de la microflora normal del tracto intestinal de mamíferos, generalmente se encuentran en cantidades superiores a 10^{10} por cada gramo de contenido intestinal, comprenden cerca de 25% de la microflora, sin embargo, la cantidad de bacterias va disminuyendo con la edad (FOOKS Y GIBSON ,2002).

Las bifidobacterias son generalmente caracterizadas como Gram +, inmóviles, no esporulados, anaeróbicos y catalasa negativos (GOMES Y MALCATA, 1999; FOOKS Y GIBSON, 2002; BOYLSTON *et al.*, 2004).

Según GOMES Y MALCATA (1999) pueden adoptar gran variedad de formas y longitudes que varían desde varillas curvadas hasta uniones de varillas con forma irregular; además, a menudo se encuentran en forma de Y. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 37°C y 41°C, prácticamente no crecen a temperatura menor a 20°C o mayor a 46°C y el pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 6,5 y 7,0. No hay crecimiento a pH bajo 5 o sobre 8 (GOMES Y MALCATA, 1999; BOYLSTON *et al.*, 2004).

Las bifidobacterias son clasificadas como anaerobias estrictas, porque son incapaces de respirar usando oxígeno. Sin embargo, el grado de tolerancias al oxígeno depende de las especies, medio de cultivo y morfología de las cepas (De Vries y Stouthamer citado por BOYLSTON *et al.*, 2004).

2.5 Propiedades del queso beneficiosas para el crecimiento de bifidobacterias.

Aunque las investigaciones han enfocado la atención en las leches fermentadas y el yoghurt como vehículos para bifidobacterias, estos productos no son óptimos para el mantenimiento de altas concentración de las cepas (particularmente algunas cepas de *Bifidobacterium*) como se pone de manifiesto por la falta de viabilidad comercial en yogures (GARDINER *et al.*, 1999).

Un medio alternativo para mantener la viabilidad de las bifidobacterias es incorporar los microorganismos a un producto como el queso debido a que su pH, contenido de lípidos, nivel de oxígeno y las condiciones de almacenamiento son más conducentes para la sobrevivencia a largo plazo de bifidobacterias

durante el procesamiento y digestión (DINAKAR Y MISTRY, 1994; STANTON *et al.*, 1998).

Los quesos (rango pH 4,8 -5,6) tienen notablemente pH más alto que la leche fermentada (pH 3,7 – 4,3) y facilita un medio más estable para soportar a largo plazo la sobrevivencia de bifidobacteria sensible al ácido (GOBBETTI *et al.*, 1998). Además, la matriz de los quesos y su relativamente alto contenido graso ofrece protección para las bacterias probióticas durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal (GARDINER *et al.*, 1999; VINDEROLA *et al.*, 2002).

Por su parte STANTON *et al.* (1998), señalan que la manufactura del queso podría potencialmente aumentar la viabilidad de bifidobacteria en quesos. La falta de actividad proteolítica en la leche hace que su crecimiento sea más lento (SHAH, 2001). Sin embargo, para k-caseína y otras caseínas hidrolizadas producidas por la actividad del cuajo durante la manufactura del queso, la actividad proteolítica de los cultivos iniciadores ha sido sugerida como factor que promueve el crecimiento de bifidobacterias y puede disminuir las dificultades de los cultivos de bifidobacterias en productos lácteos.

Según VINDEROLA *et al.* (2002), el salado contribuye no sólo al sabor de los quesos, sino que también tiene un impacto sobre el crecimiento de microorganismos, con la viabilidad de las bifidobacterias y otras bacterias inversamente relacionado con la concentración de sal.

Los iones de calcio y cloruro de sodio también contribuyen a los cambios morfológicos en bifidobacterias, que, a su vez, puede alterar su capacidad de producción de ácido y otros factores de crecimiento característicos (MISRA y KUILA, 1990). El efecto de los ácidos grasos de la leche de vaca en el crecimiento de bifidobacterias características es variable. Los ácidos láuricos y mirísticos, que representan entre 3,6% y 10,5% de los ácidos grasos en la leche, inhiben el crecimiento de las bifidobacterias. Por el contrario, los ácidos grasos más predominante, butírico, palmítico y ácidos esteáricos, que representan el 8,5%, 23,5% y 10% de los ácidos grasos en la leche respectivamente, promueven el crecimiento de las bifidobacterias (WALSTRA *et al.*, 1999).

La incorporación exitosa de bifidobacterias y bacterias probióticas en quesos requiere que la bacteria permanezca viable durante el tiempo de almacenamiento del producto y que no afecten adversamente la composición, sabor, textura y otras características sensoriales del queso tradicional (GOMES *et al.*, 1995).

2.6 Incorporación de bifidobacterias en quesos.

Las bifidobacterias de origen intestinal humano son frecuentemente favorecidas para su incorporación en alimentos debido a su capacidad para colonizar el intestino humano. Sin embargo, bifidobacterias de origen animal son más tolerantes a condiciones adversas, en comparación a los cultivos encontrados en los productos lácteos (GOMES y MALCATA, 1999).

BIAVATI *et al.* (1998), señala que las especies de bifidobacterias difieren en su requerimiento nutritivo, características de crecimiento y actividad metabólica. Así no todas las especies de bifidobacterias muestran la misma sobrevivencia, ni tienen el mismo impacto en los atributos sensoriales en los productos lácteos. La selección de mutantes de *B. bifidum* y otras bifidobacterias oxígeno resistentes ha demostrado ser eficaz en aumentar la sobrevivencia de las bifidobacterias en los alimentos en todo el procesamiento y almacenamiento. *B. infantis*, *B. breve* y *B. longum* son capaces de crecer bajo aeración parcial, mientras *B. adolescentis* es suprimido por la baja concentración de oxígeno. La sensibilidad al oxígeno de estas cepas está inversamente relacionado con su actividad NADH - oxidasa y NADH - peroxidasa, en que estas son capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno y otros compuestos oxígeno activados tóxicos para las bifidobacterias (SHIMAMURA *et al.*, 1992). Además, la selección de cepas de bifidobacterias de origen humano con alta resistencia al bajo pH y las sales biliares es importante para garantizar la viabilidad de estos microorganismos en toda la digestión (Lankaputhra y Shah, 1995 citado por BOYLSTON *et al.*, 2004).

ROY *et al.* (1995), señalan que las especies de bifidobacterias difieren en su capacidad de crecer en diferentes medios, incluida la leche, leche coagulada y leche acidificada, en presencia de cultivos iniciadores y en su capacidad para producir ácido láctico y acético. Las cepas *B. longum* tienen una alta tasa de supervivencia en presencia de cultivos iniciadores mesófilos y bacterias ácido-lácticas y es aceptable para su uso en la elaboración de queso. Sin embargo, las cepas de *B. adolescentis* fueron incapaces de crecer en condiciones de elaboración típica del queso.

2.7 Motivo de la Memoria

De acuerdo a lo presentado anteriormente y teniendo presente la dinámica actual de la industria láctea nacional y mundial, este trabajo pretende realizar un estudio para el desarrollo de un queso Camembert con la incorporación de un microorganismo probiótico como el *Bifidobacterium bifidum*, obteniendo un producto final que presente las características típicas del producto tradicional.

HIPOTESIS

Es posible fabricar un queso tipo Camembert, con cepas de probióticos tipo *Bifidobacterium bifidum* que sean capaces de sobrevivir al proceso productivo y de maduración en cantidades superiores a 10^6 UFC/gr, y que presente propiedades físicas y sensoriales características de los quesos tradicionales.

Por lo anterior se pretende cumplir con los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar la viabilidad de la cepa de *Bifidobacterim bifidum* al ser inoculada en la leche para la elaboración de queso Camembert, luego de que estos últimos fueran refrigerados a 5°C y almacenados por un período de 24 d.

Objetivos específicos

- Evaluar la concentración (UFC/ml) de probiótico *Bifidobacterium bifidum* en el cultivo madre (antes de la etapa de inoculación y dilución).
- Evaluar la concentración (UFC/g) de probiótico *Bifidobacterium bifidum* en el queso durante 0, 12 y 24 d de almacenamiento a 5°C.
- Evaluar y comparar el pH de un queso inoculado con probiótico v/s uno elaborado sin el a lo largo del periodo de almacenamiento.
- Evaluar las propiedades sensoriales de los quesos para determinar si se produce alguna alteración organoléptica en el queso Camembert dada la incorporación de *Bifidobacterium bifidum* en comparación al queso tradicional.

3. MATERIAL Y MÉTODO

El experimento se realizó en la planta piloto y en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) dependiente de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile (UACH), ubicada en la ciudad de Valdivia.

3.1 Cepa utilizada. El microorganismo que se utilizó fue un cultivo liofilizado del tipo DVS, *Bifidobacterium bifidum*, elaborado por la empresa Chr. Hansen's Inc. Para la activación y obtención del cultivo del microorganismo se empleó leche líquida descremada UHT, libre de inhibidores.

3.2 Preparación y manejo de los cultivos madres. El proceso de elaboración del queso camembert parte con la activación de las cepas. Para ello se elaboró el cultivo madre. De esta forma también se facilitó el uso de las cepas liofilizadas para los volúmenes de leche que se manejan de forma práctica.

El recuento promedio de los cultivos madre de *B. bifidum*, expresados como log (UFC/ml), alcanzó el valor de $9,341 \pm 0,184$. Tal concentración de microorganismos constituye la cantidad base contenida en el inóculo para la elaboración del queso.

3.2.1 Activación de las cepas. Se prepararon cultivos madres del microorganismo adicionando 1 g de cultivo liofilizado en 100 ml de leche UHT. Para facilitar la activación del cultivo liofilizado, se adicionó a dicha leche una cantidad de 0,05% de L- cisteína- HCl (Riedel de Haen AG, Hannover), con el fin de disminuir el potencial de óxido-reducción del medio y así estimular el crecimiento de los microorganismos; además de 2% de glucosa, (Scharlau Chemie S.A., Barcelona), y 1% de extracto de levadura (Difco Laboratories Inc. Detroit).

El matraz que contenía *B. bifidum*, se incubó a $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sin agitación y a baño María (Thelco Precision Scientific Co, Chicago) por tiempo variable hasta alcanzar un pH de 5,0.

En el anexo 2 puede apreciarse el diagrama de flujo del proceso de preparación y activación de las cepas para los cultivos madres.

3.2.2 Medio dilución y de cultivo. Para realizar la enumeración de *Bifidobacterium bifidum*, se utilizó agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Difco Laboratories Inc., Detroit), ya que constituye un buen medio para enumerar bifidobacterias. Este se preparará disolviendo 70,3 g en un litro de agua

destilada, se dispuso en frascos de vidrios de 500 ml los cuales se esterizaron en autoclave a 121°C por 15 min.

Se utilizó agua peptonada como medio de dilución, para ello se disolvió 1 g de proteosa peptona (Difco Laboratories Inc., Detroit) por litro de agua destilada, ajustando su pH a $7,0 \pm 0,2$ con NaOH 0,1N. El medio de dilución se dispuso en tubos de 9 ml y frascos de 90 ml, para finalmente ser esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 min (FIGURA 1).

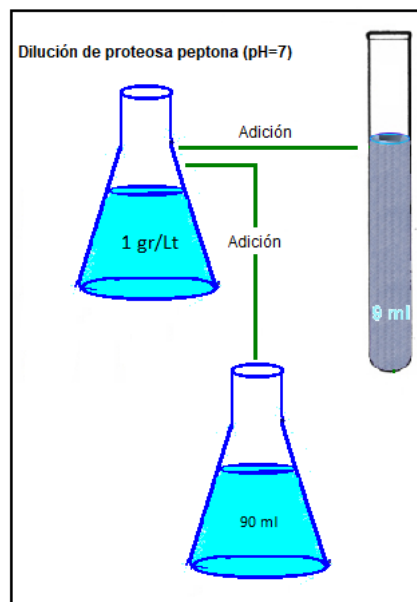


Figura 1. Esquema de dilución y adición de agua peptonada en tubos de 9ml y frascos de 90ml

Paralelamente para descartar la contaminación por mala manipulación en las prácticas de laboratorio y en la elaboración del producto, se prepara:

- Agar Bilis Rojo Neutro Cristal Violeta para el recuento de coliformes. Se mezcló 39,5 g en 1000 ml de agua destilada, se disolvió en microondas, luego se enfrió en baño de agua a 45°C antes de verter en las placas (siembra en profundidad).
- Agar Baird Parker para el recuento de *S. aureus*. Se usó un medio base que contiene 58g en 950 ml de agua destilada, el cual se disolvió en microonda y se autoclavó por 15 min. a 121°C. Una vez esterilizado, al medio base se agregó 50 ml de una emulsión de yema de huevo y 0,1g de telurito de potasio ($K_2 TeO_3$). (siembra en superficie)

- Agar Papa Dextrosa para el recuento de mohos y levaduras. Se mezcló 39 g en 1000 ml de agua destilada y se disolvió en el microondas. Luego se esterilizó el medio en autoclave por 15 min a 121°C, se dejó enfriar en baño de agua para agregar ácido tartárico al 10% estéril obteniendo un pH de 3,5. (siembra en profundidad)

3.2.3 Siembra de *Bifidobacterium bifidum*. Las siembras de las muestras de queso Camembert con bacteria probiótica se realizaron en agar MRS, en donde se hizo diluciones de hasta 10^{-7} . Para efectuar el conteo de los microorganismos se empleó el método de recuento en placa con siembra en superficie.

La primera dilución se realizó pesando asépticamente en una bolsa “Stomacher” 10 g de muestra y diluyéndola en 90 ml de agua peptonada y se agitó por 30 segundos a velocidad normal.

A partir de esta preparación se transfirió 1 ml a cada tubo que contenía 9 ml de diluyente, de esta manera se logró obtener las diluciones hasta llegar a la 10^{-6} . De las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} se tomó 0,1 ml para la siembra en agar MRS, sembrando la placa 10^{-7} en duplicado. (FIGURA 2)

Las placas se incubaron a 39 ± 1 °C, durante 72 h, bajo condiciones de anaerobiosis (sistema Gaspak, BBL, Cockeyville, Maryland)

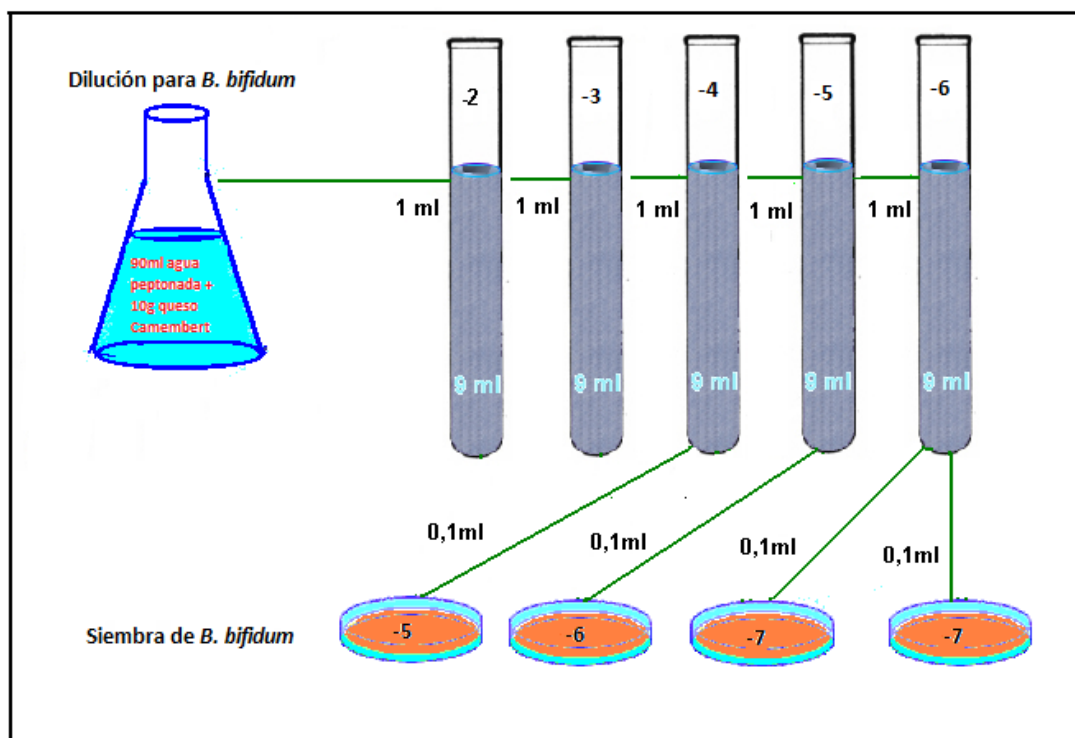


Figura 2. Esquema de siembra para *B. bifidum*.

Se tomó 0,1 ml de las diluciones 10^{-1} para sembrar en superficie y posteriormente se incubó a 32°C por 48 h. en Agar Baird Parker para realizar el recuento de *S. aureus*.

Se toman 1 ml de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} para sembrar en profundidad en agar bilis rojo neutro cristal violeta para el recuento de coliformes, las placas se incuban a 32°C por 48h.

Para el recuento de mohos y levaduras se utilizarán las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , sembrando de la misma forma que se hizo para el recuento de coliformes, pero incubándolas a 25°C por 5 días (FIGURA 3).

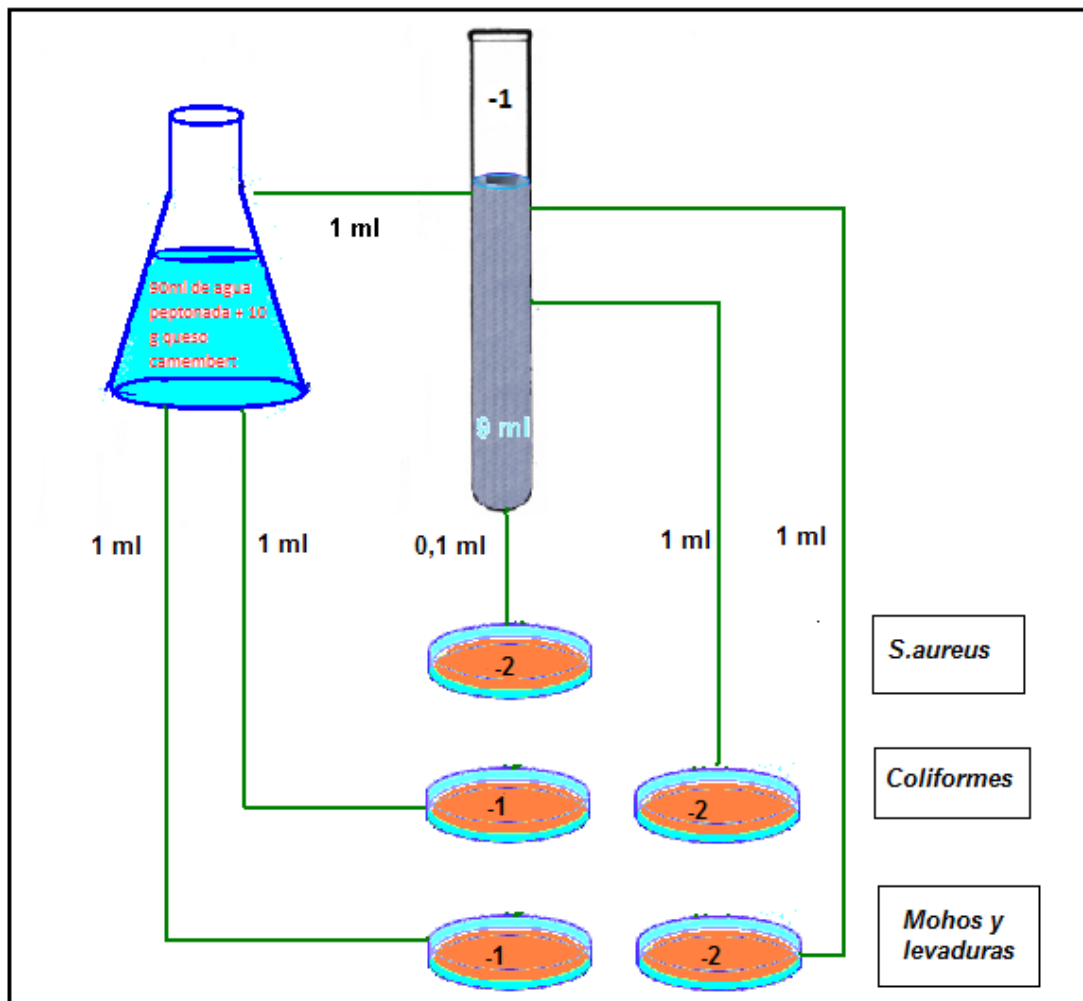


FIGURA 3. Esquema de siembra para recuento de *S.aureus*, coliformes, mohos y levaduras

3.2.4 Recuento de *Bifidobacterium bifidum*.

Frecuencia de muestreo. La viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* se determinó en las siguientes oportunidades:

- 1) A los cultivos madres, antes de ser adicionados al queso (para conocer la carga agregada al queso).
- 2) Inmediatamente después de inocular el cultivo madre y ser adicionado al queso (para conocer la carga inicial).
- 3) Durante el tiempo de almacenamiento del producto a los 12 y 24 d a 5 °C.

La calidad higiénica se mide realizando recuentos de *Staphylococcus aureus* a 36°C por 48 h., de bacterias coliformes a 32°C por 48 h. y mohos y levaduras a 25°C por 5 d.

3.2.5 Expresión de resultados. La viabilidad de los microorganismos probióticos es expresada como "porcentaje de sobrevivencia logarítmica". Este término se refiere a la razón existente entre el valor logarítmico de los recuentos de los microorganismos después de ser sometidos a la refrigeración o al almacenamiento a 5 °C y su concentración inicial y multiplicada por 100.

3.3 Elaboración queso Camembert

- **Materia prima:** para el experimento se utilizó leche fluida descremada UHT.
- **Tratamiento térmico:** aplicado para disminuir la carga microbiana inicial, para ello la leche se calentó a 64°C, agitando constantemente. Luego se dejó reposar 20 min para que se empiece a enfriar.
- **Enfriamiento:** se dejó enfriar para poder adicionar los cultivos y otros aditivos. El proceso se puede acelerar agregando agua fría por la doble camisa o directamente a la leche lo que aumentará el volumen de suero.
- **Adición de cloruro de calcio y cultivos:** Se agregó 20g/100L a una temperatura de 40°C, luego el cultivo láctico mesofilo 1% (*L. lactis* y *L. cremoris* solamente) previamente activado con leche en polvo

descremada sin inhibidores (1g/250ml de leche). Luego se agregó el cultivo probiótico activado y *P. camemberti* 0,5% a una temperatura de 36°C.

- **Adición de cuajo:** Se agregó 15 ml/100L a una temperatura de 36°C
- **Coagulación y corte:** la coagulación fue por un tiempo de 35-45 min, luego se cortó la cuajada con una lira grande de 2cm y se dejó reposar 30 min con agitación optativa.
- **Moldeo y volteo:** Se colocó en los moldes cilíndricos abiertos en ambos extremos, dispuestos en una superficie que permitió la salida del suero a 20-25°C. Luego cuando tuvo más firmeza, se voltearon los moldes y después al alcanzar cierta textura se cambiaron a la cámara fría a 8°C.
- **Salado:** después de 24 h los quesos se sacaron de los moldes y se les colocó la sal en seco (6-9 g de sal por queso de 240-280 g), este último proceso impide que microorganismos externos se desarrollen en la superficie.
- **Maduración:** los quesos se colocaron sobre mallas que permiten la circulación de aire durante 15 d en salas de maduración a una temperatura de 8°C. Aquí se produjo el desarrollo del hongo superficial.
- **Envasado:** después de transcurridos los 15 d, los quesos se envolvieron en papel aluminio y se almacenaron a 4°C, durante alrededor de 25-30 d.

3.4 Análisis microbiológicos. Al término de la elaboración, es decir el día cero, e igualmente luego de transcurridos 12 y 24 d de almacenamiento, se realizaron los siguientes análisis en triplicado:

3.4.1 Recuento de *Staphylococcus aureus*. Método según NCh 2671. Of 2002. Productos hidrobiológicos – Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva- Técnica de recuento en placa en Agar Baird Parker.

3.4.2 Recuento de hongos y levaduras. Método según NCh 2734.Of 2002. Productos hidrobiológicos –Determinación de hongos y levaduras-Técnica recuento en placa.

3.4.3 Recuento de coliformes. Método según NCh 2735/2. Of 2001. Productos hidrobiológicos –Determinación coliformes. Parte 2: Técnica recuento en placa.

3.5 Determinación de pH en queso Camembert. Mediante método potenciométrico, utilizando un pH-metro Radiometer, Copenhagen. La determinación y comparación del pH se realizó en cuatro muestras de queso Camembert, dos con probiótico (muestra superficial + muestra del centro del queso) y dos sin probiótico (muestra superficial + muestra del centro del queso).

3.6 Evaluación sensorial del queso Camembert. Se utilizó un panel de 10 jueces para la realización de la evaluación sensorial de las 2 muestras de queso Camembert. Se determinó si los jueces son capaces de identificar diferencias significativas entre las muestras a través de un test triangular utilizando el método de “Mínimo de Juicios correctos para establecer diferencias” y el cálculo de Chi Cuadrado (X^2).

En este tipo de test se presentaron tres muestras simultáneamente, donde dos de ellas son idénticas y una es de una formulación diferente. El juez debió indicar cuál de las tres es la muestra diferente. Se decidió aplicar este test de diferencia dado que es altamente recomendado y utilizado cuando se cuenta con jueces que no han sido entrenados para identificar un atributo en particular.

Las muestras se presentaron al azar y en condiciones reales de consumo.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Tiempos de incubación. En el siguiente cuadro (CUADRO 4) se puede apreciar un resumen de los tiempos de incubación necesarios para alcanzar pH=5 en los diferentes tipos de cultivos señalados.

SHAH (2001) señala que las bifidobacterias crecen lentamente en leche debido a su falta de actividad proteolítica. Por su parte, ROY *et al.* (1995) señalan que una rápida tasa de crecimiento y de acidificación de la leche son características deseables en una cepa de bifidobacterias para ser usadas en la fabricación de leches fermentadas. Estas características pueden reducir costos debido a que requieren sólo un corto tiempo de incubación y de este modo decrecen las posibilidades de contaminación.

Cada una de las repeticiones realizadas requirió la preparación previa de cultivos madres. El tiempo de incubación requerido para que el cultivo madre (*B. bifidum*) alcance pH 5,0 resultó para esta investigación del orden de 1,50 \pm 0,06 h.

En estudios anteriores, los tiempos de incubación requeridos para *L. casei shirota* y *B. lactis* fueron 1,25 \pm 0,05 y 3,12 \pm 0,10 horas, respectivamente. Con lo cual se pudo determinar que el *B. lactis* necesito 40% más de tiempo que el *L. casei shirota* para llegar al pH señalado. Es posible que esta diferencia en los tiempos de fermentación se deba a que los requerimientos nutricionales de las Bifidobacterias son mayores que los de los lactobacilos, mientras que su tasa de acidificación es menor.

El tiempo de incubación observado en los *B. bifidum* tuvo un comportamiento similar al de los lactobacilos. Esto es posible ya que el medio fue enriquecido con extracto de levadura, glucosa y L- cisteína. En particular, según GOMES y MALCATA (1999), las bifidobacterias tienden a exhibir un débil crecimiento y producción de ácido en la leche, la cual requiere invariablemente de largos tiempos de fermentación y condiciones de anaerobiosis, bajo potencial redox y a menudo de factores que promuevan su desarrollo. Por otro lado, y tal como fuese especificado, con el fin de mejorar el crecimiento y facilitar la activación de los cultivos liofilizados, se adicionó a la leche del cultivo madre, 1% de extracto de levadura, 2% de glucosa y 0,05% de L-cisteína -HCl. RAVULA y SHAH (1998) y DESJARDINS *et al.* (1990) señalan que el extracto de levadura podría estimular la producción de ácido en la leche inoculada con bifidobacterias y lactobacillus. A su vez, KURMANN (1988) indica que la adición de glucosa, en una tasa de 1-5%, junto con extracto de levadura podría acortar en gran medida los tiempos de coagulación. ALAIS (1985) por su parte, manifiesta que la glucosa favorece la iniciación del crecimiento de las bacterias en leche. Además, LAROIA y MARTIN (1991) indican que la cisteína es conocida por su bajo potencial redox, pudiendo ser agregada a medios de crecimiento para mejorar la viabilidad de bacterias anaeróbicas como son las Bifidobacterium.

CUADRO 4. Tabla resumen de tiempos de incubación de cultivos.

Cultivos	Tiempo de incubación (horas)
<i>B. bifidum</i>	1,50 ±0,06
<i>L. casei shirota</i>	1,25 ±0,05
<i>B. lactis</i>	3,12 ±0,10

4.2 Efecto de la dilución de los cultivos madres en la leche para la elaboración de queso camembert. Como se observa en la FIGURA 4, a consecuencia de la dilución de los cultivos madres en la leche se comprobó una reducción de 0,7 ciclos logarítmicos en el caso del *B. bifidum*, lo que en términos porcentuales corresponde al 7% de disminución logarítmica respecto a su concentración inicial.

FLORES, (2002) evaluó el efecto de la dilución de dos microorganismos probióticos en helados, el cual dio como resultado una reducción de 1,9 ciclos logarítmicos para *L. acidophilus*, lo que en términos porcentuales equivale a 20,7% de disminución logarítmica respecto a su concentración inicial. Para *B. lactis* comprobó una reducción de 2,1 ciclos logarítmicos que equivale a 21,6% de disminución logarítmica respecto a su concentración inicial.

Estos valores de pérdida de biomasa son mayores a los encontrados en esta investigación, debido a que, en el trabajo propuesto por FLORES, (2002) se utilizó un proceso de congelación que causó un golpe térmico y consecuentemente un shock osmótico que afectan de manera inevitable la viabilidad de los microorganismos.

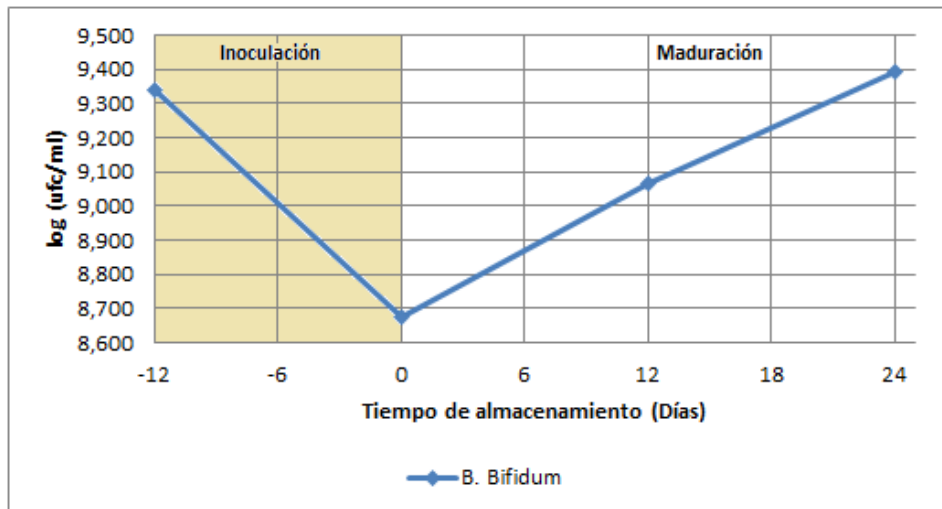


FIGURA 4. Disminución del número de microorganismos viables por efecto de la dilución de los cultivos madres en la leche para elaboración de queso

4.3 Viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* durante la maduración del queso. En la FIGURA 5 se muestra la variación del logaritmo de la concentración de microorganismos (ufc/g) de las tres muestras de queso camembert y el promedio de éstas, durante el período de maduración.

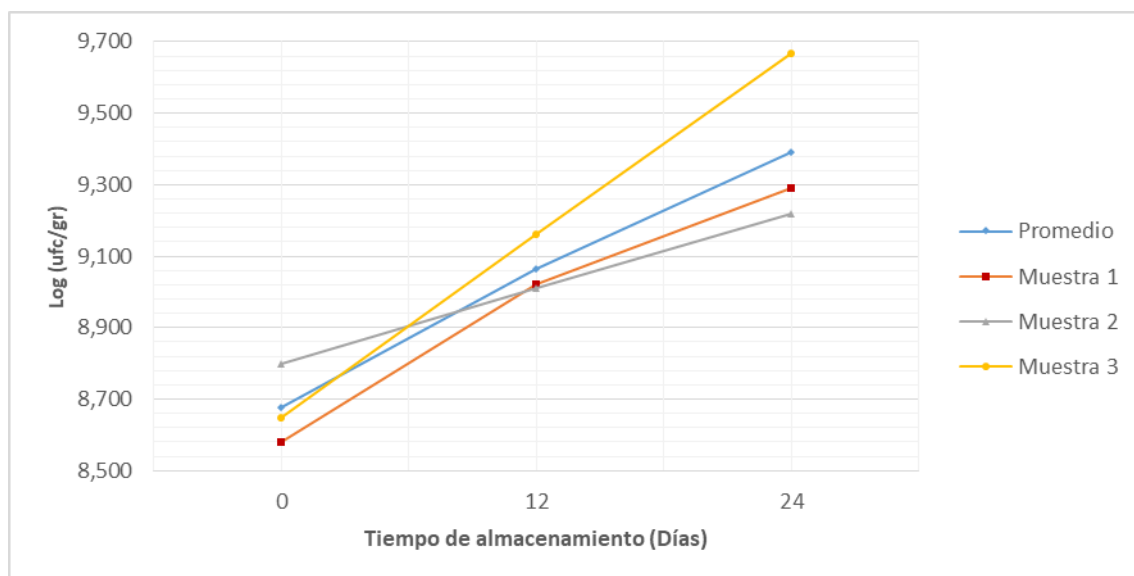


FIGURA 5. Viabilidad de *Bifidobacterium bifidum* durante la maduración de queso camembert

En el CUADRO 5, se observa la evolución de las concentraciones de las muestras durante la maduración, donde se puede observar que la muestra 2 presentó una mayor concentración al inicio ($t=0$), pero con el paso del tiempo fue la muestra 3 la cual presentó la mayor concentración de probiótico, tanto al día 12 como al día 24 de la maduración, demostrándose que la muestra

número 3 fue la más resistente en el queso al término del período de evaluación.

CUADRO 5. Resumen del recuento de probióticos de las muestras en función del tiempo de maduración.

Tiempo de Maduración (días)	Muestra (log ufc/g)		
	1	2	3
0	8,581±0,226 ^a	8,798±0,278 ^a	8,648±0,274 ^a
12	9,021±0,029 ^a	9,012±0,124 ^a	9,161±0,021 ^a
24	9,290±0,284 ^{ab}	9,218±0,164 ^a	9,667±0,157 ^b

Según el análisis estadístico, las muestras no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre sí durante el periodo inicial de maduración ni al cabo de 12 d. Al finalizar la maduración (T=24) tampoco se presentaron diferencias significativas entre las muestras, pero si se pudo evidenciar que la muestra 2 con la muestra 3 pertenecen a grupos homogéneos distintos, presentando diferencias significativas entre ellos (ANEXO 3).

Esto puede deberse a que ya en la etapa final de la maduración de los quesos camembert comienza a hacerse más evidente y a acaparar más recursos la capa de mohos, por lo que la concentración final de probiótico entre diferentes muestras puede presentar variaciones según el desarrollo del *Penicillium camemberti*.

Como se puede observar, la evolución de la concentración de probiótico durante el período de maduración es siempre positiva y sostenida en el tiempo.

El análisis estadístico arrojó que hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los promedios de concentración de los conjuntos de muestras (muestra 1, 2 y 3) a los diferentes tiempos de maduración (ANEXO 4). Esto puede verse en resumen en el CUADRO 6.

CUADRO 6. Resumen del promedio del recuento de probióticos en los conjuntos de muestras en función del tiempo de maduración.

Tiempo de Maduración (días)	Promedio (log ufc/g)
0	8,676±0,259 ^a
12	9,065±0,058 ^b
24	9,391±0,202 ^c

FERREIRA y FÁVARO (2004), evaluaron la viabilidad de *B. lactis*. y *L. acidophilus*, libres e inmovilizados, en leche (pH 6,4) y en leche acidificada a 3 diferentes pH: 5,0, 4,4 y 3,8, almacenadas a temperaturas de refrigeración. Estos autores demostraron que *L. acidophilus* mostró buena viabilidad en leche y leche acidificada, considerando que los recuentos no variaron a pH 6,4. Este resultado concuerda con lo propuesto por LAROIA y MARTIN, 1991 quienes reportaron que *L. acidophilus* sobrevivía y se mantenía estable en un producto fermentado congelado, con los valores de pH entre 3,9 a 4,6.

Por su parte Gilliland y Speck (1977), citados por FERREIRA y FÁVARO (2004), reportaron que *L. acidophilus* permaneció viable en leche acidificada. La supervivencia del *B. lactis* en leche acidificada fue considerada satisfactoria, puesto que hubo una reducción de un ciclo logarítmico después de 21 d de almacenamiento a pH 5,0 y después de 7 a 14 d de almacenamiento a pH 4,4. Estos valores concuerdan con lo obtenido en esta investigación, puesto que para el probiótico se observó un aumento de 1 ciclo logarítmico después de 24 d de maduración del queso camembert.

4.4 Desarrollo del probiótico en el queso camembert durante el periodo de maduración. En el CUADRO 7 se observa el desarrollo logarítmico de la concentración del probiótico luego del proceso de maduración del queso por 24 días. Se indica que el porcentaje de desarrollo de *Bifidobacterium Bifidum* fue de 107,85% en promedio.

En el caso específico de la muestra 3, el desarrollo alcanzó un porcentaje de 111,79%, equivalente a un aumento de $4,8 \times 10^9$ ufc/g, mayor al resto de las muestras durante el periodo de maduración del queso camembert. Como se explicó en el punto 4.3, esta diferencia entre los conjuntos de muestras 1, 2 y 3 se puede deber a que el desarrollo del probiótico en la etapa final de la maduración se ve comprometida dado a la creciente competencia por recursos y espacio que genera el desarrollo de la capa del moho desde el exterior hacia el interior del queso.

CUADRO 7. Resumen del % de desarrollo logarítmico de los microorganismos probióticos en queso camembert durante el período de maduración

Muestra	Desarrollo logarítmico (%)
1	108,25
2	104,77
3	111,79
Promedio	107,85

VINDEROLA et al., (2000), estudiaron la sobrevivencia de bacterias probióticas en queso fresco argentino, reportando que especies de *Bifidobacterium* y *L. casei* presentaron sobrevivencias satisfactorias, considerando que después de 60 d de almacenamiento, la disminución de la cantidad de bacterias viables fue menor a 1 ciclo logarítmico para *Bifidobacterium* y nula para *L. casei*. Estos resultados demuestran que *L. casei* fue más adaptable a la matriz del queso fresco. Similares resultados reportaron Stanton et al., 1998 citado por VINDEROLA et al., (2000), los cuales observaron que *L. paracasei* presentó una sobrevivencia satisfactoria durante el largo período de maduración del queso Cheddar.

Similares resultados obtuvieron DAIGLE et al. (1999), donde observaron el comportamiento de *B. infantis* en queso cheddar con la adición de crema, almacenado a 4°C por 12 semanas; con una concentración de inoculación inicial de $7,5 \times 10^6$ ufc/g. Los resultados indicaron que al ser inoculado *B. infantis* en queso cheddar, presentó una excelente viabilidad durante la primera etapa del almacenamiento, alcanzando su crecimiento máximo durante la semana 4, es decir, a 28 d de la elaboración del producto, con una concentración de $9,3 \times 10^6$ ufc/g, pero ya en la etapa final del almacenamiento comenzaba a disminuir la concentración, como se evidenció al día 84 (semana 12) donde la concentración de *B. infantis* fue de $5,1 \times 10^6$ ufc/g.

Estos valores concuerdan con lo obtenido en esta investigación, puesto que se observó en un periodo de tiempo de 4 semanas un aumento en la concentración del probiótico.

Estos resultados son acordes a la investigación realizada, donde se pudo demostrar que el probiótico fue capaz de sobrevivir al proceso de elaboración del queso camembert y posteriormente desarrollarse y aumentar su concentración durante la maduración del mismo.

4.5 Análisis de indicadores microbiológicos. Los indicadores microbiológicos dieron como resultado lo observado en el CUADRO 8

CUADRO 8. Indicadores microbiológicos en queso camembert.

Análisis microbiológico	Tiempo (días) (recuento ufc/g)		
	0	12	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 10	< 10	< 10
Hongos y levaduras	< 10	< 10	< 10
Coliformes	< 10	< 10	< 10

Como se aprecia, este producto cumple con los parámetros sanitarios establecidos para la elaboración de quesos, según el Reglamento Sanitario de los Alimentos (CHILE, 2011), lo que evidencia que el proceso se realizó tomando todas las precauciones sanitarias acorde a las buenas prácticas de laboratorio y manufactura.

4.6 Determinación de pH en queso Camembert. Los valores de pH en el queso camembert, decayeron en todos los casos de las muestras internas, mientras que aumentaron en todos los casos de las muestras periféricas. En la FIGURA 7 se observa la variación del pH en las muestras internas, donde *B. bifidum* presenta una baja de pH de 5,03 a 4,83 desde el tiempo cero al final de la Maduración, mientras que la muestra en ausencia del probiótico sufrió una disminución de 5,07 a 4,93. NIGHSWONDER *et al.* (1996) informan que los valores de pH en yogur y mantequilla disminuyeron un máximo de tres décimas en un tiempo de almacenamiento de 28 días refrigerado. Estos valores concuerdan con la leve disminución del pH en el queso, esto debido a la refrigeración de los productos, lo que hace que los microorganismos se encuentren viables, pero no completamente activos. En la muestra con presencia de *B. bifidum*, la disminución del pH fue más pronunciada, dado al desarrollo del probiótico durante el período de maduración.

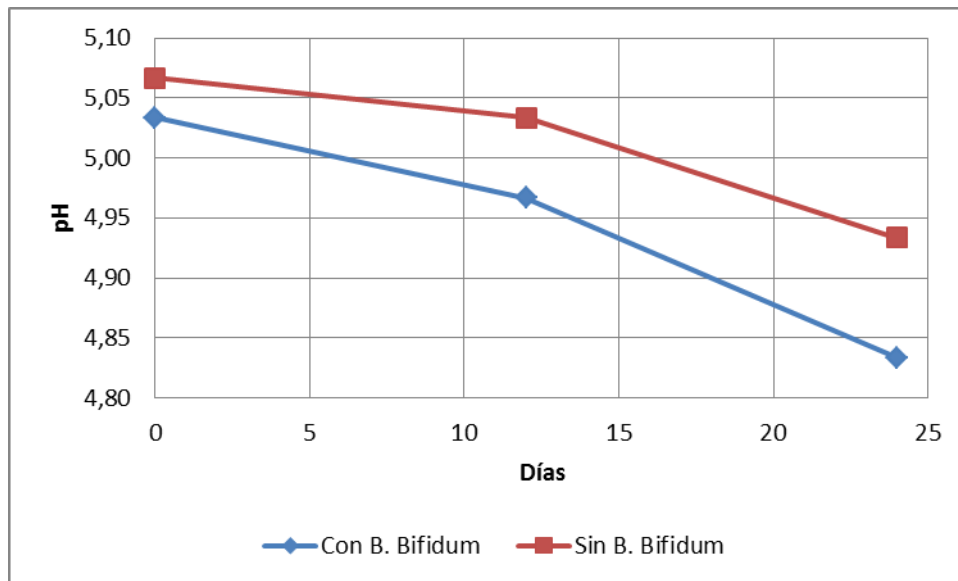


FIGURA 7. Evolución del pH en el tiempo de Maduración por acción de microorganismos en muestras internas de queso camembert.

En la FIGURA 8 se observa la variación del pH en las muestras externas, donde las muestras con *B. bifidum* presentan un alza de pH de 5,37 a 7,23 desde el tiempo cero al final de la maduración, mientras que la muestra en ausencia del probiótico sufrió un alza de 5,27 a 7,43.

Como se puede apreciar, en ambos casos, el incremento del pH se ve acelerado a partir del día 12 en adelante. Esto debido a la proliferación y desarrollo de la capa de moho (*P. camemberti*) externa que comienza a ensancharse y a invadir el interior de queso, produciendo una mayor proteólisis de éste de afuera hacia adentro, obteniéndose una textura más blanda y viscosa.

FOX (2004) señala que las cepas de mohos utilizadas en quesos, como *P. camemberti* y *P. roqueforti*, utilizan el ácido láctico como fuente de carbono por lo que su desarrollo conlleva a un aumento en el pH. Además, estas cepas presentan actividad endopeptídica y exopeptídica, haciendo una importante contribución a la proteólisis del queso. En consecuencia, el proceso de maduración comienza en la capa externa del queso.

Estas cepas hidrolizan la α , β y κ -caseína, además de liberar aminoácidos libres, los cuales son posteriormente catabolizados en varios compuestos volátiles, entre ellos el amoníaco, lo que entrega el característico sabor a este tipo de quesos.

Al igual que en el caso anterior, la presencia de *B. bifidum* tiene como consecuencia un desarrollo distinto en la curva de pH, produciendo una menor alza de este en comparación a su contraparte sin el probiótico mencionado.

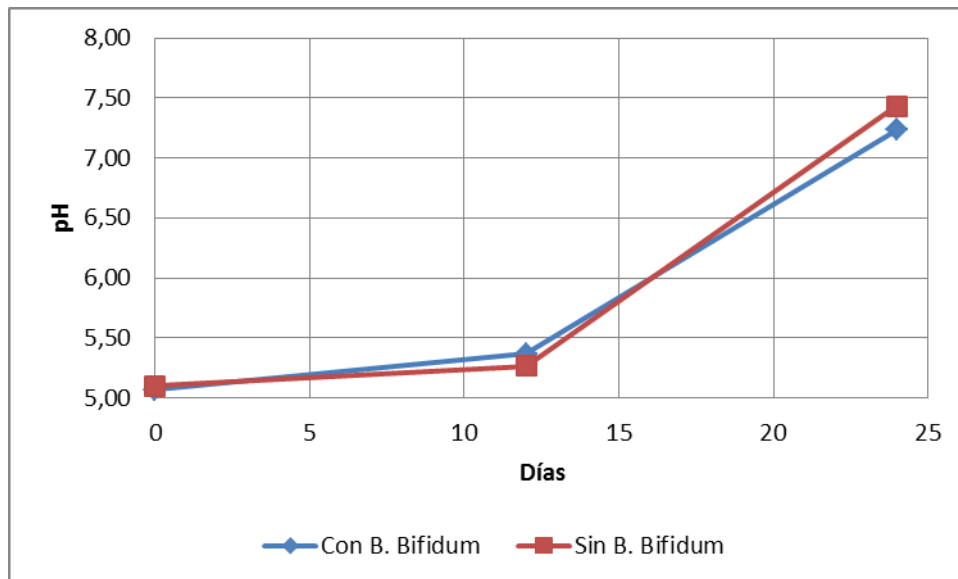


FIGURA 8. Evolución del pH en el tiempo de Maduración por acción de microorganismos en muestras externas de queso camembert.

4.7 Evaluación sensorial del queso camembert con probióticos. Para el análisis de los resultados debe considerarse que:

Se trabajó con 10 jueces, por lo que se tiene un total de 20 juicios.

Muestra X, Queso Camembert sin probiótico

Muestra Z, Queso Camembert con probiótico

Se tiene una $p = 1/3$.

Hipótesis nula $H_0: X = Z$

Hipótesis alternativa $H_1: X \neq Z$

En el Cuadro 9 se observa los resultados entregados por el panel sensorial donde hubo un total de 6 aciertos, de un máximo de 20 juicios.

CUADRO 9. Resultados entregados por el panel sensorial.

Juez	Aciertos
I	0
II	1
III	0
IV	0
V	1
VI	2
VII	0
VIII	1
IX	0
X	1
TOTAL	6

En el CUADRO 10 se puede observar la tabla de distribución binomial para test triangular de 10 jueces con $p = 1/3$

CUADRO 10. Distribución binomial para test triangular. Mínimo de juicios correctos para establecer diferencias (una cola, $p = 1/3$).

Nº Juicios emitidos	Nivel de probabilidad		
	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,001$
20	11	13	14

Dado que la cantidad de aciertos obtenidos según la tabla binomial para test triangular es menor al menor valor tabulado (11) que corresponde al nivel de significancia de 5%, se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas para las muestras X y Z para un nivel de significancia del 5%. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula, y se rechaza la hipótesis alternativa.

Para respaldar estos resultados, se calculó el chi cuadrado (X^2) (Anexo 5).

En el CUADRO 11 se pueden observar los valores tabulados para X^2 con lo que se comparó el valor calculado con la fórmula antes descrita.

CUADRO 11. Valores tabulados para X^2 ($p = 1/3$, 1 cola, 1 grado de libertad)

$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,001$
2,71	5,41	9,55

El resultado según la fórmula para chi cuadrado es:

$$X^2 = 0,00625$$

Dado que el valor obtenido según la fórmula es menor al menor valor tabulado (2,71) que corresponde al nivel de significancia de 5%, se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas para las muestras X y Z para un nivel de significancia del 5%. Por lo tanto, se respalda la decisión de aceptar la hipótesis nula y rechazar la hipótesis alternativa.

En el ANEXO 6 puede apreciarse la ficha de evaluación sensorial utilizada por los jueces.

5 CONCLUSIONES

Al finalizar este proyecto se pudo concluir que si es posible fabricar un queso tipo camembert, con cepas de probióticos tipo *Bifidobacterium bifidum* que sean capaces de sobrevivir al proceso productivo y de maduración en cantidades superiores a 10^6 , y que presente propiedades físicas y sensoriales características de los quesos tradicionales.

Se evaluó la viabilidad de la cepa de *Bifidobacterim bifidum* al ser inoculada en la leche para la elaboración de quesos Camembert, luego de ser refrigerados a 5°C y almacenados por un período de 24 d, observándose un aumento en la concentración logarítmica de un 8,24% en promedio.

La concentración logarítmica (log ufc/ml) inicial de *Bifidobacterium bifidum* en el cultivo madre (antes del proceso de inoculación) fue de $9,341 \pm 0,034$ en promedio, la cual disminuyó 7 ciclos logarítmicos al momento de la inoculación.

La concentración logarítmica promedio (log ufc/gr) a los 0, 12 y 24 d de almacenamiento fue de $8,676 \pm 0,259$, $9,065 \pm 0,058$ y $9,391 \pm 0,202$ respectivamente, en las muestras de queso, evidenciándose un aumento sostenido de la concentración a lo largo del período de maduración.

Se evidenció que las muestras inoculadas presentaron un pH menor en la zona interna del queso, en comparación con las muestras no inoculadas, pero en ambos casos el comportamiento a lo largo del período de maduración fue el mismo, observándose una disminución en las muestras inoculadas de 5,03 a 4,83 y de 5,07 a 4,93 en el caso del queso de elaboración clásica. Para las muestras de la zona exterior, el desarrollo del moho *P. camemberti* produce un aumento del pH dado al consumo del ácido láctico por parte de éste. En consecuencia, las muestras inoculadas sufrieron un alza de 5,37 a 7,23 y las muestras sin el probiótico un alza de 5,27 a 7,43.

La evaluación sensorial a través del test triangular arrojó como resultado que no se presentaron diferencias significativas entre las muestras elaboradas de forma clásica con las muestras inoculadas con el probiótico, por lo que se concluye que la adición del *Bifidobacterim bifidum* no altera las propiedades sensoriales características de un queso camembert.

Para estudios futuros se puede evaluar la factibilidad de la producción a gran escala de quesos camembert con *Bifidobacterim bifidum* y la sustentabilidad económica que esto conlleva.

6 BIBLIOGRAFÍA

- ALAIS, C. 1985. Ciencia de la leche. 2a Ed. Reverte S.A. 873 p.
- AMORES R., CALVO A., MAESTRE J.R. AND MARTINEZ - HERNANDEZ D. 2004. Probióticos. Rev. Esp. Quimioterapia. 67 (2): 131 –139.
- BIAVATI, B. VESCOVO, M., TORRIANI, S., BOTTAZZI, V. 2000. bifidobacteria:history, ecology, physiology and applications. Annals of Microbiology. 50: 117-131.
- BOURLIOUX P., KOLETZKO B., GAURNER F. AND BRAESCO V. 2003. The intestine and its microflora are partner for the protection of the host: report on the Danone symposium “the intelligent intestine”. Am J Clinical Nutrition; 7: 675 – 683.
- BOYLSTON, T.D., VINDEROLA, C.G., GHODDUSI, H.B., REINHEIMER, J.A. 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. International Dairy Journal. 14:375-387.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. NCh 2671.Of 2002. Productos hidrobiológicos – Recuento de *Staphylococcus Aureus* coagulasa positiva- Técnica de recuento en placa en Agar Baird parker.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. NCh 2734.Of 2002. Productos hidrobiológicos –Determinación de hongos y levaduras. Técnica recuento en placa.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. NCh 2735/2.Of 2001. Productos hidrobiológicos –Determinación coliformes. Parte 2: Técnica recuento en placa.
- CHILE. MINISTERIO DE SALUD. Reglamento Sanitario de los alimentos. 2011. Editora Jurídica Manuel Montt S.A.
- CODEX ALIMENTARIUS .2010. Leche y productos lácteos. 2ª Ed. Vol 12. Publicado por la Secretaria del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, Roma.130p.

- COLLINS J.K., O'Sullivan G.C., O'Sullivan M.G., Thornton G., 1992. Probiotic bacteria: Myth or reality? Trends Food Sci. Technology. Pág. 309-314.
- DAIGLE, A., ROY, D., BELANGER, G. y VUILLEMARD, J. C. 1999. Production of probiotic chesse (cheddar-like chesse) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. Journal Dairy Science. 82 (6): 1081 – 1091.
- DESJARDINS, M., DENIS, R. y GOULET, J. 1990. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. Journal of Dairy Science. 73:299-307.
- FERREIRA, C. y FAVARO, C. 2004. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. Brazilian Journal of Microbiology. 35:151-156.
- FLORES, M. 2002. Viabilidad de probióticos (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*) en helados de leche. Tesis de Ingeniería en Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia. 73 pág.
- FOOKS, L.J and GIBSON, G.R (2002) Probiotics as Modulators of the Gut Flora British Journal of Nutrition
- FOX, P. "et. Al" 2000. Fundamentals of cheese science, Aspen publications, Gaithersburg, Maryland.
- FOX, P. "et. Al" 2004. Chesse: Chemistry, Physics and Microbiology. 3ª Ed. Vol 1.
- GARDINER, G., STANTON, C., LYNCH, P.B., COLLINS, J.K., FITZGERALD, G., AND ROSS, R.P.1999. Evaluation of Cheddar Cheese as a Food Carrier for Delivery of a Probiotic Strain to the Gastrointestinal Tract. Journal of Dairy Science, 82(10):1379-1387.
- GIBSON, G.R., O'GRADY, B. 2005. Microbiota of the Human Gut. Probiotic dairy products. Blackwell Publishing.

- GOBBETTI, M., CORSETTI, A., SMACCHI, E., ZOCCHETTI, A., AND DE ANGELIS, M. 1998. Production of Crescenza Cheese by Incorporation of Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 81(1): 37-47.
- GOMES, A.M.P y MALCATA, F. X. 1999. *Bifidobacterium* spp. And *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Foods & Technology* 10: 139-157.
- GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X., KLAVER, F.A.M., AND GRANDE, H.J. 1995. Incorporation of *Bifidobacterium* spp. strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 49:71-95.
- KURMANN, J. A. 1988. Starters for fermented milks. *Bulletin FIL/IDF* 227: 41-55.
- LARROIA, S. y MARTIN, J. 1991. Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. *Cultured Dairy Products Journal*. 26: 13-21.
- MISRA, A.K., AND KUILA, R.K. 1990. Cultural and biochemical activities of *Bifidobacterium bifidum*. *Milchwissenschaft*, 45:155-158.
- NIGHSWONDER, B., BRASHEARS, M. AND GILLILAND, S. 1996. Viability of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*. 79: 212- 219.
- OUWEHAND C. A., KIRJAVAINEN, V. P., SHORTT, C. Y S. SALMINEN. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*. 9: 42-52..
- RAVULA, R. R., y SHAH, N. P. 1998. Effect of acid casein hydrolysate and cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 53: 175-179.
- ROY D., DESJARDINS M.L., and MONDOU, F. 1995. Selection of bifidobacteria for use under cheese-making conditions. *Milchwissenschaft*, 50(3): 139-142 .

- SANDERS, M.E. 1999. Probiotics. *Food Technology*.53 (11):67-77.
- SCHREZENMEIR J. AND DE VRESE M. 2001. Probiotics, prebiotics, and symbiotics – approaching a definition. *American Journal Clinical of Nutrition* 73 (suppl): 361-364.
- SCOTT, R. 2002. *Fabricación de queso*, 2da ed., Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España.520 p
- SHAH, N. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*. 55: 46- 53.
- SHIMAMURA ,S., FUMIAKI,A.B.E., ISHIBASHI, N., MIYAKAWA, H., YAESHIMA, T., ARAYA, T., AND TOMITA , M. 1992. Relationship Between Oxygen Sensitivity and Oxygen Metabolism of *Bifidobacterium* Species. *Journal of Dairy Science*, 75(12):3296-3306.
- STANTON, C., GARDINER, G., LYNCH, P.B., COLLINS, J.K., FITZGERALD, G., AND ROSS, R.P.1998. Probiotic cheese. *International Dairy Journal*, 8 (5-6):491-496.
- TAMIME, A. 2005. *Production and Maintenance of Viability of Probiotic Micro-organisms in Dairy Products. Probiotic Dairy Products*. Blackwell Publishing.
- TAMIME, A. 2005. *Probiotic dairy products*. Blackwell Publishing.
- VINDEROLA, C, PROSELLO, W., GHIBERTO, D. y REINHEIMER, J. 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science*. 83: 1905-1911.
- VINDEROLA, C. G., COSTA, G. A., REGENHARDT S. AND REINHEIMER, J. A. 2002. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*,12(7):579-589..

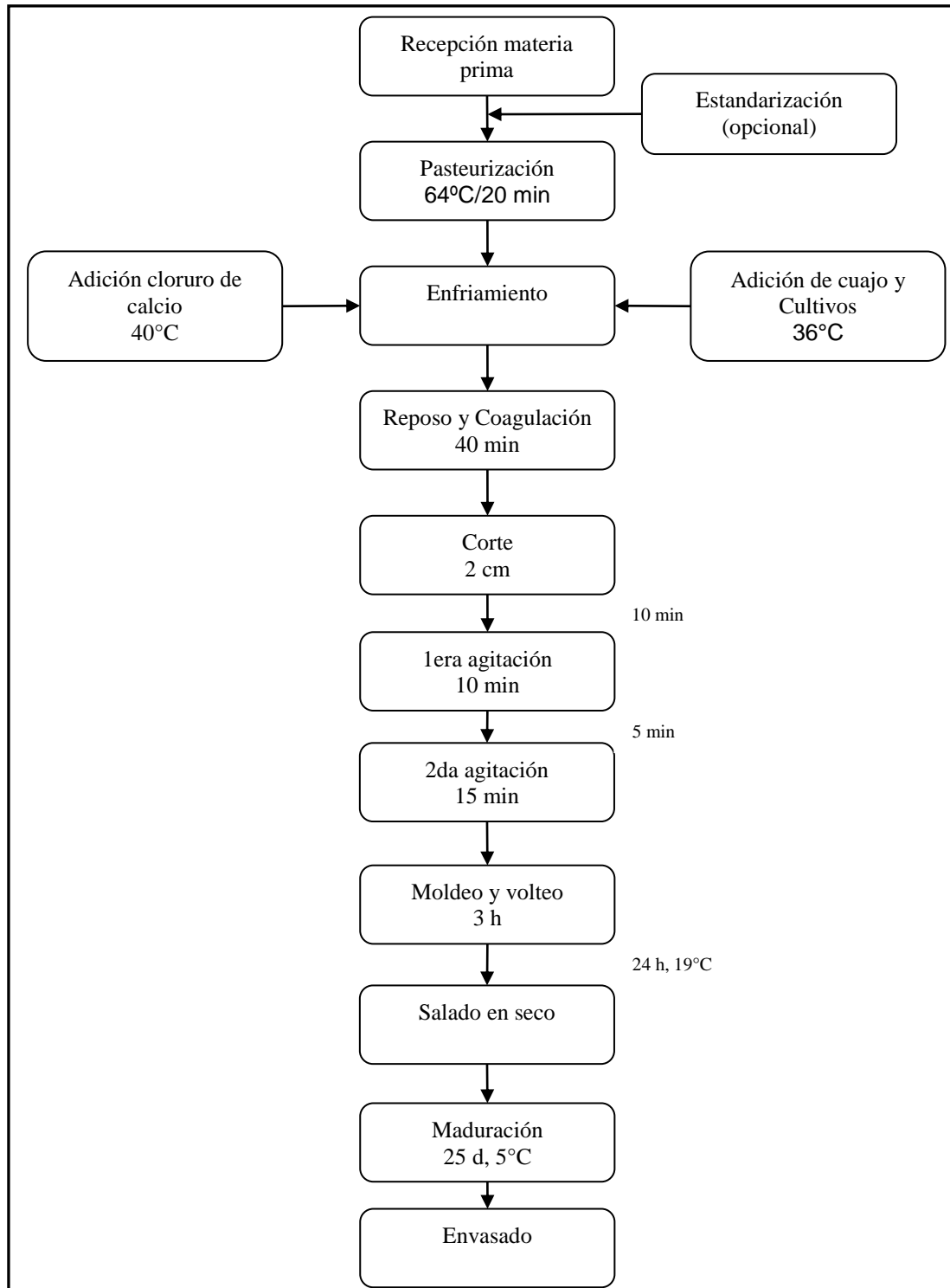
WALSTRA. P., GEURTS. T., NOOMAN. A., JELLEMA. A., VAN BOEKEL. M.1999. Dairy Technology. Principles of milk properties and processes. New York.Marcel Dekker. 727 p.

WALSTRA, P. "et. Al" 1999. Dairy technology: principles of milk properties and processes, Editorial Marcel Dekker, Wageningen, Holanda.

7 ANEXOS

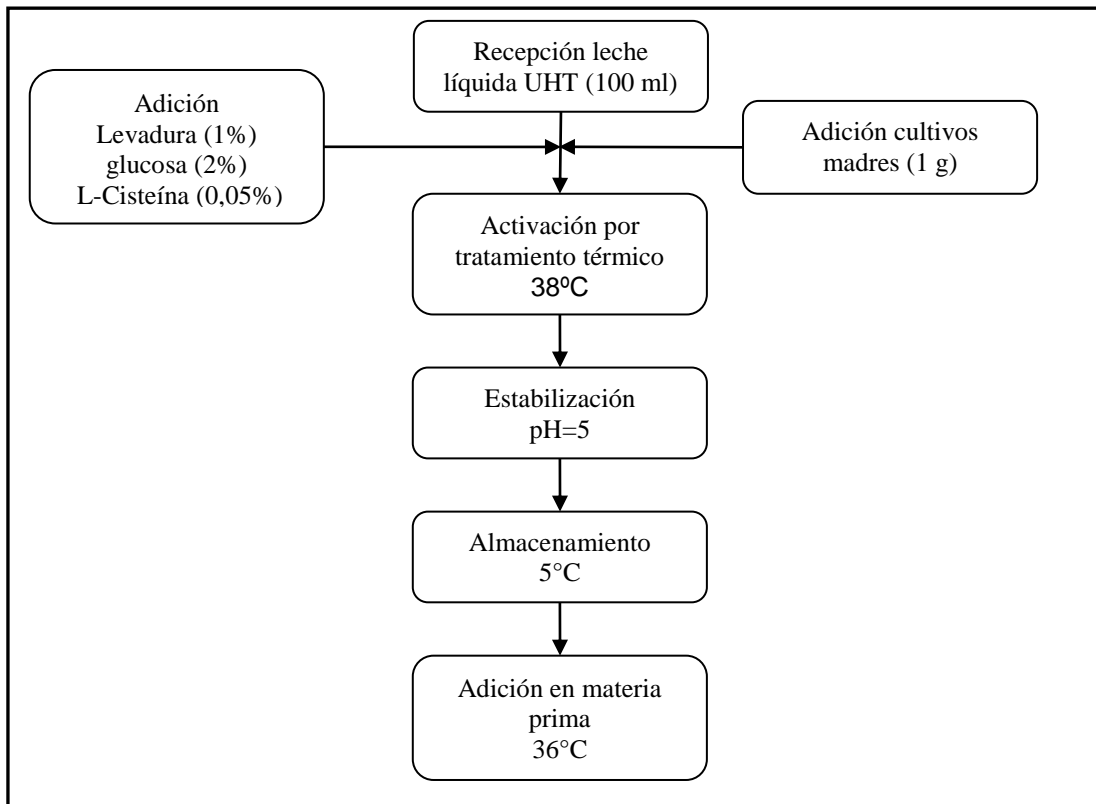
7.1 ANEXO 1

Diagrama de flujo de elaboración de queso Camembert.



7.2 ANEXO 2.

Diagrama de flujo para la elaboración de cultivos madres



7.3 ANEXO 3

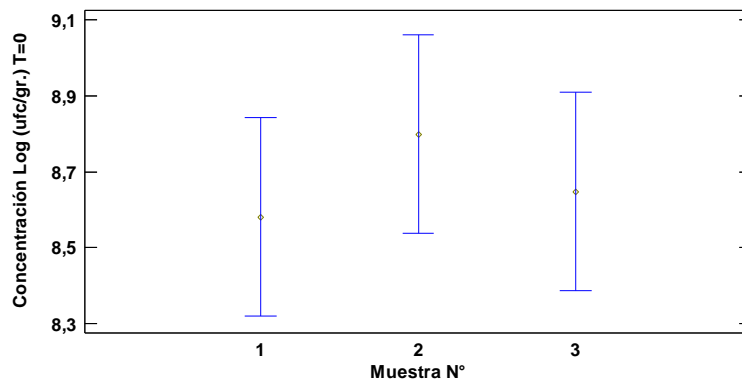
Análisis estadístico de la variación de la concentración logarítmica de probiótico entre las muestras en un determinado tiempo.

1.1 Análisis de varianza a T=0

Análisis de Varianza para Concentración Log (ufc/gr.) T=0 - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra N°	0,0741896	2	0,0370948	0,55	0,6051
RESIDUOS	0,407004	6	0,067834		
TOTAL (CORREGIDO)	0,481194	8			

Medias y 95,0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración Log (ufc/gr.) T=0 por Muestra N°

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra N°	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	3	8,58133	0,150371	X
3	3	8,64767	0,150371	X
2	3	8,79833	0,150371	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2		-0,217	0,520352
1 - 3		-0,0663333	0,520352
2 - 3		0,150667	0,520352

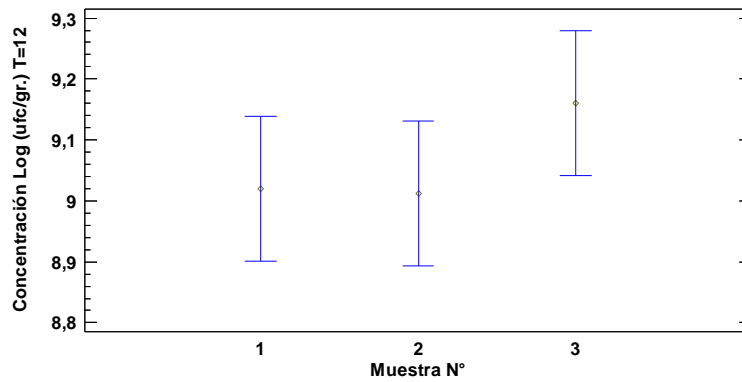
* indica una diferencia significativa.

1.2 Análisis de varianza a T=12

Análisis de Varianza para Concentración Log (ufc/gr.) T=12 - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra N°	0,028009	2	0,0140045	2,50	0,2293
RESIDUOS	0,0167785	3	0,00559283		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0447875	5			

Medias y 95,0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración Log (ufc/gr.) T=12 por Muestra N°

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra N°	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	2	9,012	0,0528812	X
1	2	9,0205	0,0528812	X
3	2	9,161	0,0528812	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2		0,0085	0,238
1 - 3		-0,1405	0,238
2 - 3		-0,149	0,238

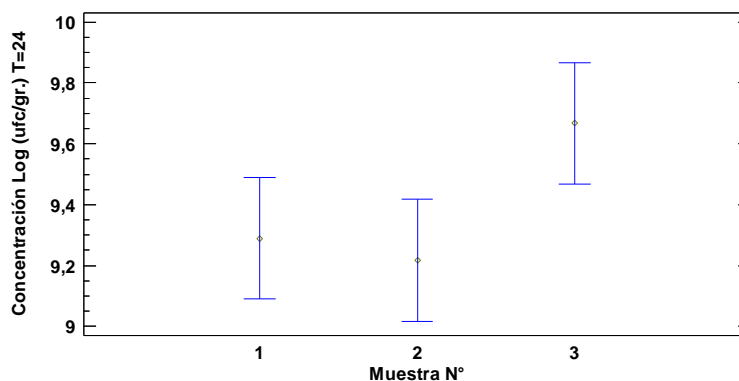
* indica una diferencia significativa.

1.3 Análisis de varianza a t=24

Análisis de Varianza para Concentración Log (ufc/gr.) T=24 - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Muestra N°	0,349465	2	0,174732	4,38	0,0673
RESIDUOS	0,239631	6	0,0399386		
TOTAL (CORREGIDO)	0,589096	8			

Medias y 95,0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración Log (ufc/gr.) T=24 por Muestra N°

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra N°	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	3	9,21767	0,115381	X
1	3	9,28967	0,115381	XX
3	3	9,667	0,115381	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2		0,072	0,399273
1 - 3		-0,377333	0,399273
2 - 3	*	-0,449333	0,399273

* indica una diferencia significativa.

7.4 ANEXO 4

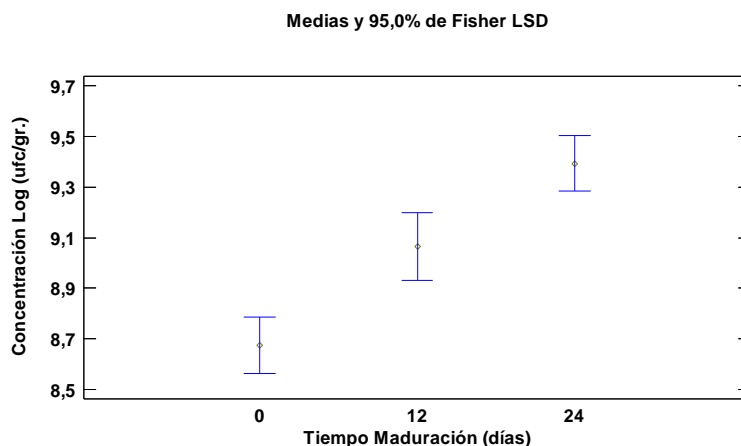
Análisis estadístico de la variación de la concentración logarítmica de probiótico en los conjuntos de muestra en función del tiempo de maduración.

2.1 Análisis de varianza

Análisis de Varianza para Concentración Log (ufc/gr.) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo Maduración (días)	2,3091	2	1,15455	23,33	0,0000
B:N° Muestra	0,174954	2	0,0874772	1,77	0,1976
RESIDUOS	0,940123	19	0,0494802		
TOTAL (CORREGIDO)	3,42418	23			

2.2 Gráfico de medias para la concentración logarítmica por tiempo.



2.3 Tabla de múltiples rangos para concentración logarítmica por Tiempo.

Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración Log (ufc/gr.) por Tiempo Maduración (días)

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo Maduración (días)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	9	8,67578	0,0741471	X
12	6	9,0645	0,0908113	X
24	9	9,39144	0,0741471	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 12	*	-0,388722	0,24538
0 - 24	*	-0,715667	0,219475
12 - 24	*	-0,326944	0,24538

* indica una diferencia significativa.

7.5 ANEXO 5

Cálculo de Chi Cuadrado (X^2).

$$X^2 = \frac{(4a - 2f - 3)^2}{8n}$$

Dónde: a: aciertos (6)
 f: fallas (14)
 n: nº de juicios. (20)

7.6 ANEXO 6

Ficha de evaluación sensorial.

Fecha:

FICHA DE EVALUACIÓN SENSORIAL

Muestra: Queso camembert

Nº de bandeja:

A continuación, se les presentan 6 muestras de queso camembert ordenadas en 2 tríos.

El objetivo de esta evaluación es señalar cual es la muestra diferente.

El orden de evaluación es de izquierda a derecha y de adelante hacia atrás.

Es obligatorio entregar una respuesta.

Señale con una X la muestra diferente.

(Código)	(Código)	(Código)	2do trío
(Código)	(Código)	(Código)	1er trío

¡¡Muchas Gracias!!

Observaciones: