

VIABILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* BB12 DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE QUESO COTTAGE

VIABILITY OF THE PROBIOTIC MICROORGANISMS *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* BB12 DURING COTTAGE CHEESE SHELF LIFE

Mónica OBANDO C.¹, Carmen S. BRITO C.^{2*}, Renate P. SCHÖBITZ T.²,
 Liliana A. BAEZ M.³, Mariela Y. HORZELLA R.²

Recibido: Enero 18 de 2010 Aceptado: Junio 10 de 2010

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad de tres microorganismos considerados probióticos: *Lactobacillus casei* 01, *Bifidobacterium* BB12, y *Lactobacillus acidophilus* La-5, durante la vida útil del queso Cottage (0, 7 y 14, y 7 días adicionales, para un total de 21 días, y su influencia sobre las características sensoriales. El estudio se llevó a cabo en cuatro tratamientos y tres repeticiones: el tratamiento control T1, sin agregado de probiótico; el tratamiento 2, con agregado de *Lb. casei* 01; el tratamiento 3, con agregado de *Lb. acidophilus* La-5; y el tratamiento 4, con agregado de *Bifidobacterium* BB12. Los probióticos fueron adicionados a la crema que se agrega al queso, el cual es almacenado a 4°C. La viabilidad de los microorganismos se midió en análisis microbiológicos; y las características de calidad de los productos mediante análisis físicos, microbiológicos, químicos y sensoriales. *Bifidobacterium* presentó recuentos superiores a 1×10^6 ufc/g hasta el final de la vida útil del producto (14 días); además, los tratamientos con *Lb. acidophilus* y *Lb. casei* registran recuentos superiores a 1×10^6 ufc/g hasta los 21 días de almacenamiento; no obstante *Lb. casei* tuvo la mayor pérdida de viabilidad en el tiempo. Los parámetros de calidad físicoquímica y microbiológica de los quesos presentaron valores normales y sin diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$). La calidad sensorial se vio afectada por el agregado de los microorganismos en algunos atributos sensoriales: el sabor y la firmeza de grano no registraron diferencias significativas entre tratamientos, al contrario del aroma y la sensación de humedad, parámetros que sí mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$).

Palabras clave: queso, probióticos, supervivencia celular.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the viability of three microorganisms considered as probiotics: *Lactobacillus casei* 01, *Bifidobacterium* BB12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5, during cottage cheese shelflife (0, 7, 14, and 7 days thereafter equivalent to 21 days), and the influence on sensory characteristics of the products. The study was carried in four treatments and three replications. Control treatment (T1) without probiotics; treatment T2 containing *Lb. casei* 01; treatment T3 containing *Lb. acidophilus* La-5; and treatment 4, with the addition of *Bifidobacterium* BB12. The cream with the addition of probiotics

-
- 1 Magíster en Ciencias y Tecnología de la Leche, UACH. Docente, Facultad de Ingeniería Agronómica. Programa de Ingeniería Industrial. Universidad del Tolima. Ibagué, Colombia.
 2 Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. UACH.
 3 Instituto de Estadística, Facultad de Ciencias Económicas. Universidad Austral de Chile. UACH. Casilla 47, Valdivia, Chile.
 * Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: cbrito@uach.cl

was added to the cheese which is stored at 4°C. The viability evaluation of microorganisms was carried through microbiology analysis and its quality characteristics obtained through physical, chemical and sensory analyses of the products at 0, 7 and 14 days.

Bifidobacterium had higher counts than 1×10^6 ufc/g up to the end to the shelflife (14 days) and treatments with *Lb. acidophilus* and *Lb. casei* presented higher counts than 1×10^6 ufc/g up to 21 storage days. However, *Lb. casei* presented a greater viability loss through the time. Physicochemical and microbiology quality were normal and there were no significant differences between treatments ($P < 0.05$). The sensory quality is in a way affected by the addition of microorganisms, while sensory attributes like flavour and grain firmness does not present significant differences, but aroma and humidity sensation does present significant differences between treatments ($P > 0.05$).

Key Words: cheese, probiotics, cell survival.

INTRODUCCIÓN

Desde hace algunas décadas se sabe que las enfermedades crónicas han llegado a ser las causales más frecuentes de morbilidad y mortalidad en el mundo. Paralelamente, algunas investigaciones científicas han podido establecer que tales enfermedades están asociadas, en mayor o menor medida, a desórdenes en la dieta y falta de actividad física, entre otros factores (1).

Según la Organización Mundial de la Salud (2), los desórdenes causados por una alimentación inadecuada dan origen a estados mórbidos como el sobrepeso y la obesidad, que constituyen en la actualidad una epidemia mundial a la que Chile no resulta ajeno. Por esta razón, desde finales del siglo XX el gobierno emprendió en este país una importantísima campaña en materia de salud pública: la prevención del sobrepeso y la obesidad, considerando, en especial, las implicancias en la salud de los chilenos y, por tanto, en la economía nacional (1).

La obesidad y el sobrepeso suponen un alto riesgo de padecer enfermedades crónicas como la diabetes tipo II, la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares y coronarias y algunos tipos de cáncer (3).

El queso Cottage es un producto de muy buenas características nutricionales y organolépticas, y una alternativa viable e interesante para quienes buscan un queso bajo en grasa, rico en proteínas y de fácil digestión que, además, tiene un gusto fresco y un delicado aroma, que le confiere buenas perspectivas en las preferencias de los consumidores.

Las principales características en las que se destaca el queso Cottage son su original, bajo contenido en grasa (4%); su alto contenido de proteínas y bajo contenido de sal. La humedad del producto es cerca-

na al 80%, y su pH se encuentra entre 4,8 y 5,0. Es de color muy blanco y de apariencia apetecible (4).

La coagulación ácida necesaria para producir el queso Cottage se logra por el proceso de fermentación con el agregado regular de cultivos mesófilos *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y/o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, lo cual constituye ya una de sus ventajas, porque al producirse un coágulo más pequeño y liviano que el de los quesos elaborados por coagulación enzimática, se facilita la digestibilidad de la proteína (4).

FAO (5) define los probióticos como microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped cuando son suministrados en cantidades adecuadas. Los efectos fisiológicos pueden ocurrir mediante dos mecanismos: por efecto directo de las células vivas, o indirectamente, por vía de los metabolitos producidos por estas células, lo cual es conocido como efecto biogénico (6).

Para que un producto sea considerado adecuado para el transporte de los probióticos, los microorganismos deben ser viables en el momento del consumo; y para que puedan ejercer sus efectos clínicos y terapéuticos, deben estar en una concentración igual o superior a 10^6 ufc/g (7, 8).

La sobrevivencia de los probióticos depende, además, de las propiedades del microorganismo y de ciertas característica en la composición del producto al cual ha sido adicionado, como acidez, fuentes de nitrógeno, actividad de agua, etc. (6).

Desde un punto de vista técnico, los lácteos son alimentos bastante adecuados para la adición de probióticos, y tienen un apreciable potencial en el sector de los alimentos funcionales, con un mercado creciente de yogures y bebidas fermentadas, hasta ahora la matriz alimentaria más usada para la incorporación de probióticos (6).

Los quesos frescos, en particular, han resultado promisorios para la adición de probióticos porque no tienen un período de maduración, su vida útil es corta, y su almacenamiento, a temperatura de refrigeración. Tienen, además, alta actividad de agua, bajo pH, bajo contenido de sal y se pueden producir sin agregado de preservantes, etc., lo que permite el crecimiento adecuado de microorganismos en ellos. (9).

La literatura técnica informa de interesantes investigaciones sobre quesos frescos con agregado de microorganismos considerados probióticos. Blanchette *et al.*, 1996 (10), mencionan el queso Cottage elaborado con agregado de *B. infantis*, donde los microorganismos se han mantenido viables por 14 días en una concentración igual o superior a 10^6 ufc/g. También se han probado los agregados de *B. bifidum*, *B. infantis* y *B. longum* en queso Crescenza, donde *B. bifidum* y *B. longum* mantuvieron un nivel de 10^8 ufc/g, y el *B. infantis*, de 10^7 ufc/g a los 14 días de almacenamiento (8). Masuda *et al.*, 2005 (11) informan haber tenido un buen resultado al agregar *Lb. acidophilus* al queso fresco; también con éxito ha sido incorporado *Lb. acidophilus* a quesos Minas fresco (9).

La presente investigación pretende determinar la viabilidad de microorganismos considerados probióticos: *Lactobacillus casei* 01, *Bifidobacterium* BB12 y *Lactobacillus acidophilus* La-5, durante el almacenamiento de queso Cottage, y su influencia sobre la calidad de los productos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamientos

Las variables estudiadas fueron: a) la adición de tres microorganismos considerados probióticos, correspondientes a cultivos liofilizados procedentes del Laboratorio Chr. Hansen: *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* BB12, y b) el tiempo de observación: 0, 7, 14 y 21 días. En la elaboración de queso cottage, como iniciadores propios de esta variedad, se usaron cultivos liofilizados mesófilos homofermentativos que contenían *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (R-704), procedentes del Laboratorio Chr. Hansen.

Se practicaron cuatro tratamientos con tres réplicas cada uno y los análisis se hicieron por duplicado.

Tratamiento 1 (control): queso Cottage con 4% de materia grasa (MG).

Tratamiento 2: queso Cottage con 4% de MG y adición de *Lb. casei* 01.

Tratamiento 3: queso Cottage con 4% de MG y adición de *Lb. acidophilus* La-5.

Tratamiento 4: queso Cottage con 4% de MG y adición de *Bifidobacterium* BB12.

Protocolo de elaboración del queso Cottage

El queso Cottage se elaboró en la Planta Piloto de la Universidad Austral de Chile, Valdivia, con leche de vacas que pastaban en un predio de la misma Universidad. Se usó la metodología de elaboración Long-set (12), cuyo protocolo se observa en la figura 1.

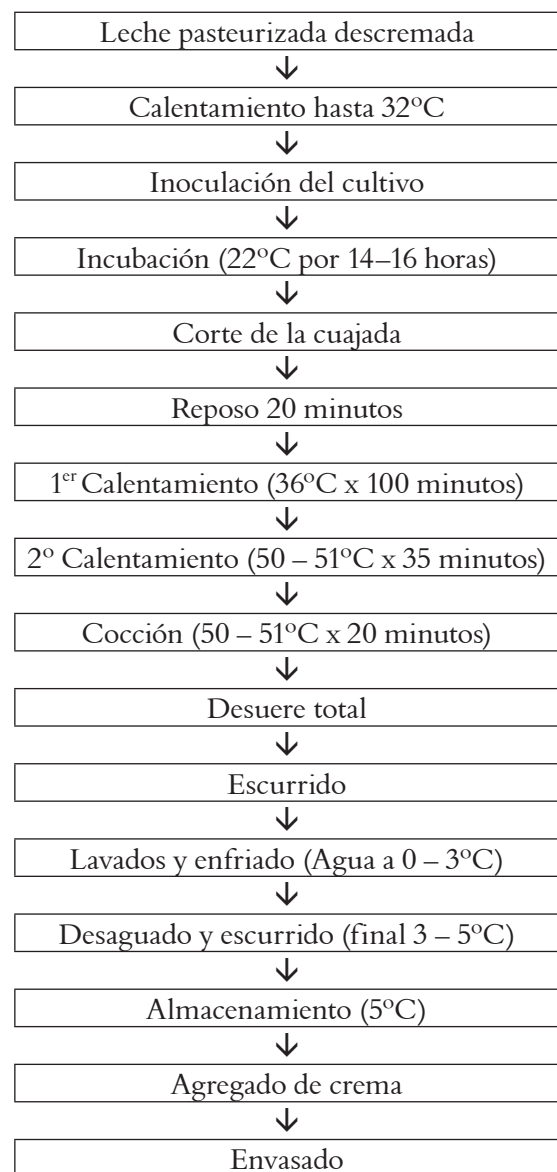


Figura 1. Diagrama de flujo para la elaboración del queso Cottage. Brito *et al.*, 2006 (12).

Crema con cultivos probióticos

La crema fue preparada al 25% de materia grasa; se le adicionó 2,8% de sal; luego fue homogeneizada (homogeneizador Rannie homo-mic con capacidad de 100 L/h) a 100 psi, se pasteurizó a 85°C durante 30 minutos y se mantuvo en refrigeración (6°C) hasta el momento de agregarla al queso (24 horas) (3).

Los cultivos probióticos liofilizados se prepararon por separado, inoculando 1 g de cultivo en 600 mL de leche reconstituída al 10% de sólidos no grasos, usando leche en polvo descremada, tratada luego por tindalización (95°C x 30mins, durante tres días consecutivos a fin de eliminar las esporas). Los cultivos fueron incubados a 36°C por 24 - 48 horas (recuento de 10^8 ufc/g). Cada cultivo se adicionó a la crema que posteriormente fue agregada a la cuajada del queso Cottage, de acuerdo con el tratamiento en estudio. Al tratamiento control (T1) se le adicionó crema sin agregado de microorganismos (13).

Controles físicos y químicos

Los quesos obtenidos en cada tratamiento se analizaron en los siguientes parámetros y con los métodos mencionados a continuación: pH, método potenciométrico NCh. 1671-1979 (14) mediante un pHmetro Radiometer modelo PHM 26; humedad: en estufa de desecación, por el método gravimétrico IDF/FIL 4A: 1982, descrito por Pinto *et al.*, 1998 (15), y grasa, medida en butirómetro para queso con el método Gerber van Gulik. NEN 3059:1957 Leiden, Holanda; ISO No.3433, descrito también por Pinto *et al.*, 1998 (15). Todas las muestras de Cottage se envasaron en potes plásticos, se sellaron con foil de aluminio y se almacenaron en refrigeración (4°C) hasta el momento de su análisis.

Valoración de la viabilidad de los cultivos probióticos

Se midió la viabilidad de los probióticos colocando 10 g de muestra de queso en 90 mL de buffer fosfato estéril (pH 7,2); luego fue homogeneizada (2 min) en un Stomacher Lab (homogeneizador masticador IUL S.A. modelo Basic, 19K). Posteriormente se efectuaron diluciones decimales (10^{-5} - 10^{-8}) con buffer fosfato y se utilizó la técnica de siembra en superficie en los diferentes medios. Para

el recuento de *Lactobacillus casei* 01 se utilizó agar MRS con glucosa, incubación durante 72 horas a 36°C. Para *Lactobacillus acidophilus* La-5, se empleó agar MRS con maltosa, incubación 72 horas a 43°C en anaerobiosis (Gas Pack system, OXID), y el *Bifidobacterium* BB12 se sembró en agar MRS modificado con cloruro de litio y L-cisteína con adición de glucosa; finalmente fue incubado a 36°C en anaerobiosis (Gas Pack system, OXID) (16).

Análisis sensorial

Los productos se sometieron al análisis sensorial en una prueba de valoración numérico con una escala de 1 a 5 puntos, donde 1 corresponde a la menor intensidad, 5 a la mayor, y 3 puntos representa el valor "normal" del respectivo atributo sensorial. La prueba fue aplicada por un panel de ocho jueces entrenados en los aspectos técnicos y de aplicación del test y familiarizados con las características típicas de la variedad, así como con los defectos mas frecuentes en el Cottage. Los cuatro tratamientos fueron evaluados en sabor, aroma, firmeza y sensación de humedad (13), en el Laboratorio de Análisis Sensorial del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Austral de Chile.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se cumplió mediante el análisis de varianza ANDEVA, previa comprobación del supuesto de homogeneidad de varianza realizado por el test de Levene. En aquellos casos donde hubo diferencias significativas, se aplicó el test de comparación múltiple de Tukey. Además, se llevó a cabo el análisis de covarianza, donde el tiempo de observación fue incluido como covariable. Todo el análisis estadístico se hizo en ambos niveles de significancia, 1% y 5%, y los resultados del estudio fueron analizados mediante el software Statgraphics Plus versión 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características físicas y químicas del queso Cottage

La tabla 1 presenta los resultados de pH, humedad y grasa del queso Cottage en los diversos tratamientos.

Tabla 1. Composición física y química del queso Cottage en los tratamientos (0 y 14 días de almacenamiento).

Tratamiento	pH		Humedad (%)		Grasa (%)	
	0 día	14 día	0 día	14 día	0 día	14 día
Control	4,8 ± 0,18	4,7 ± 0,06	76,5 ± 0,7	78,0 ± 1,14	4,5 ± 0,45	4,8 ± 1,44
<i>Lb. casei</i>	4,6 ± 0,0	4,6 ± 0,05	77,5 ± 1,6	77,1 ± 0,51	4,5 ± 0,5	4,4 ± 0,4
<i>Lb. acidophilus</i>	4,7 ± 0,15	4,7 ± 0,06	77,0 ± 1,0	76,5 ± 0,4	4,0 ± 0,5	5,1 ± 1,65
<i>Bifidobacterium</i>	4,6 ± 0,1	4,7 ± 0,11	76,4 ± 0,5	76,2 ± 1,2	4,7 ± 0,8	4,4 ± 0,9

(T1) Control; (T2) *Lb.acidophilus* La-5; (T3) *Bifidobacterium* BB12; (T4) *Lb.casei* 01.
Promedio de tres repeticiones con su desviación estándar en cada tratamiento

Los resultados obtenidos no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos en los parámetros grasa, humedad y pH.

El pH de los quesos obtenido en los tratamientos fue entre 4,6 y 4,8, valores considerados normales para la variedad (4, 12, 17).

La humedad del queso en los diferentes tratamientos resultó menor de 80%, lo que lo sitúa dentro de lo estipulado por la norma del Codex Alimentario (18); y no se dieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos; además, no varió en el tiempo ni entre tratamientos, lo cual indica que se efectuó un buen drenaje del suero antes del envasado y un adecuado sellado del gránulo durante el proceso. Paralelamente, la temperatura de almacenamiento de los quesos se mantuvo constante (4°C) a través de los 21 días, lo que evitó una sinéresis inadecuada del suero en el queso durante el almacenamiento. Estos resultados son concordantes con los señalados por los jueces en la evaluación sensorial.

La grasa tampoco presentó diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$); se mantuvo en el nivel programado en el estudio y acorde con la estandarización de grasa que se practicó en la crema.

Viabilidad de los probióticos

La valoración de los resultados de viabilidad de los probióticos estudiados en esta investigación se presenta en la tabla 2, al igual que los resultados del análisis estadístico; existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos, y la mayor diferencia corresponde al tratamiento con *Lactobacillus casei* 01.

Tabla 2. Evolución de los probióticos viables en queso Cottage (Log ufc/g ±DE).

Probiótico	*Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
<i>Lb. casei</i> 01	8,82 ± 0,69a	7,84 ± 0,47a	7,64 ± 0,40a	7,91 ± 0,23a
<i>Bifidobacterium</i> BB12	6,31 ± 1,15b	6,74 ± 0,79b	6,56 ± 1,38b	5,33 ± 1,53b
<i>Lb. acidophilus</i> La-5	6,96 ± 0,13b	6,75 ± 0,11b	6,82 ± 0,27b	6,69 ± 0,49b

* 24 horas de envasado.

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos al 1% según el Test de Tukey.

Los recuentos corresponden al promedio de las tres repeticiones del producto almacenado a 4°C.

Día cero (0) de elaboración (24 horas de envasado): el tratamiento que registra los mayores recuentos el día cero de elaboración es el Cottage con *Lactobacillus casei* 01, que llega incluso a 10^9 ufc/g, con incubación previa del probiótico de sólo 24 horas a 36°C. y presenta diferencias significativas con *Bifidobacterium* BB12 y *Lactobacillus acidophilus* La-5, los cuales, además, requieren 48 horas previas de incubación a 36°C para llegar a recuentos máximo de 10^8 ufc/g. Esto tiene su explicación en los requerimientos más exigentes de estos dos microorganismos, y en el hecho de que la leche no es el mejor medio de cultivo para *Bifidobacterium* BB12 y *Lactobacillus acidophilus* (19, 20).

Día siete (7) de elaboración: El *Lb. casei*, heterofermentativo y menos exigente en sus requerimientos nutricionales es, sin embargo, el tratamiento que pierde mayor viabilidad al comienzo del almacenamiento (1 ciclo logarítmico), lo que puede obedecer a las condiciones de acidez y a la temperatura de refrigeración (4°C) que parecen afectarlo; no obs-

tante, considerando toda la vida útil del producto y los siete días posteriores estudiados, registra los niveles más altos de microorganismos, estableciendo una diferencia significativa con los otros tratamientos, *Bifidobacterium* BB12 y *Lb. acidophilus* La-5, pero entre estos últimos no se apreció una diferencia significativa ($P > 0,05$).

Día catorce (14) de elaboración: La tendencia se mantiene. El *Lb. casei* sigue perdiendo viabilidad, el *Bifidobacterium* BB12 presenta igual recuento que el día cero, lo que quiere decir que no hay reducción de su población, y el *Lb. acidophilus* La-5 registra una ligera pérdida, ambos con diferencias significativas frente al *Lb. casei*.

Día veintiuno (21) de elaboración: El *Lb. acidophilus* es el probiótico que menos viabilidad pierde (menor a 0,5 ciclos logarítmicos) durante los 21 días de almacenamiento; en cambio, el *Bifidobacterium* BB12 registra la mayor pérdida en viabilidad (1 ciclo logarítmico durante los 21 días de almacenamiento). Estos datos coinciden con lo citado por Masuda *et al.*, 2005 (11), quienes incorporaron *Lb. acidophilus* La-5 a un queso fresco, que se mantuvo sobre 10^7 ufc/g durante tres semanas, sin sufrir alteración en sus características organolépticas. Al parecer, este organismo se adapta muy bien a las condiciones adversas del medio, y puede incluso desarrollarse a pH menores de 5,0 (21).

La disponibilidad de oxígeno es quizás el factor que más afecta las bifidobacterias, que son anaerobias estrictas. Es así como los recuentos tienen grandes fluctuaciones que reflejan la complejidad de crecimiento del organismo, la baja tolerancia al

medio ácido y, principalmente, la toxicidad debida al oxígeno, el cual generalmente es incorporado durante la agitación producida al mezclar la cuajada con la crema, y está en el espacio de cabeza propio del envase.

Los tratamientos con *Lb. casei* y *Lb. acidophilus* mantuvieron recuentos mayores a 10^6 ufc/g hasta los 21 días de almacenamiento, a pesar de los mohos y levaduras, que alteraron las propiedades sensoriales del queso, no interfiriendo con la actividad de los microorganismos probióticos.

El tratamiento con *Bifidobacterium* BB12 mantuvo los recuentos sobre 10^6 ufc/g sólo hasta el día 14 de almacenamiento. Este dato concuerda con Blanchette *et al.*, 1996 (10), quienes encontraron niveles similares de este microorganismo hasta el día 14 de almacenamiento del queso Cottage, atribuyendo este comportamiento a las condiciones de acidez de esta variedad.

La tendencia en el recuento de células viables en el transcurso del almacenamiento fue decreciente en todos los tratamientos. Este dato destaca la importancia de lograr un alto recuento de microorganismos probióticos el día cero de elaboración del queso, puesto que no se observa desarrollo de organismos en este período y, por el contrario, la población decrece.

Calidad sensorial

La tabla 3 presenta los resultados emitidos por los jueces sobre la calidad sensorial de los tratamientos realizados en queso Cottage. Se observa que el sabor y la firmeza no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos.

Tabla 3. Características sensoriales del queso Cottage.

Características sensoriales	Tratamientos			
	Control	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lb. casei</i>
Sabor	2,55a	2,79a	2,82a	2,76a
Aroma	2,32ab	2,67ab	2,69a	2,42b
Sensación de humedad	2,82a	2,32b	2,52ab	2,15ab
Firmeza	2,82a	3,12a	3,02a	3,14a

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas al 1% según el test de Tukey. Promedio de tres repeticiones por tratamiento. Parámetro normal 3.

El aroma se pudo percibir muy bien porque cada muestra individual se presentó sellada a los panelistas, pero los resultados arrojaron diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$). El tratamiento control y el tratamiento con *Lb. acidophilus* La-5 resultaron homogéneos; en cambio, los tratamientos *Lb. casei* 01 y *Bifidobacterium* BB12 son significativamente diferentes. *Bifidobacterium* fue el preferido por los panelistas debido a su mejor aroma.

La diferencia en aroma se explica porque el *Lb. acidophilus* La-5 es homofermentativo y produce básicamente ácido láctico, a diferencia del *Bifidobacterium* BB12, que es heterofermentativo y produce varios compuestos aromáticos, particularmente al fermentar los citratos, que confieren aromas puros y atractivos al producto (19).

El análisis del atributo sensación de humedad registró diferencias significativas entre el tratamiento control y el tratamiento 2 (*Lb. acidophilus*) ($P < 0,05$), probablemente relacionadas con la adición de culti-

vo a la crema, que aumenta la viscosidad porque el cultivo está coagulado y reduce el pH de la crema en 0,1 unidades, elevando así la viscosidad y mejorando la adhesión y la absorción de la crema por los gránulos de cuajada y, al reducir la grasa libre que recubre el grano, disminuye la sensación de humedad. El tratamiento control suscita mayor sensación de humedad que el tratamiento con el *Lb. casei*, este último con el menor pH, factor que, al parecer, afecta también el atributo sensación de humedad y marca la diferencia de los otros tratamientos con probióticos y del control.

No obstante, los resultados de la evaluación sensorial obtenidos en este estudio no son concluyentes porque, en general, los puntajes de los atributos sensoriales en los tratamientos están ligeramente por debajo del valor normal (3 pts).

Calidad microbiológica

En la tabla 4 se puede apreciar la evolución del crecimiento de enterobacterias y, mohos y levaduras.

Tabla 4. Recuentos microbiológicos (Log ufc/g) del queso Cottage a los días 0, 7 y 14 días de almacenamiento.

Tratamiento	Día 0		Día 7		Día 14	
	Entero-bacterias	Mohos y levaduras	Entero - bacterias	Mohos y levaduras	Entero-bacterias	Mohos y levaduras
Control	1,9 ± 1,07	2,2 ± 0,66	1,3 ± 0,58	4,3 ± 0,43	<1,0 ± 0,0	5,4 ± 0,35
T2	1,8 ± 0,79	1,4 ± 0,63	1,1 ± 0,17	4,2 ± 0,29	<1,0 ± 0,0	5,3 ± 1,0
T3	1,8 ± 0,83	1,4 ± 0,63	1,2 ± 0,45	3,7 ± 1,51	<1,0 ± 0,0	5,2 ± 0,15
T4	1,8 ± 0,75	1,7 ± 0,84	1,1 ± 0,27	3,7 ± 0,70	<1,0 ± 0,0	4,1 ± 1,11

(T1) Control; (T2) *Lb. acidophilus* La-5; (T3) *Bifidobacterium* BB12; (T4) *Lb. casei* 01. Promedio de tres repeticiones en cada tratamiento.

Como se observa en la tabla 4, al inicio, las enterobacterias obtuvieron recuentos dentro de los rangos permitidos por la legislación chilena (22) para queso fresco ($< 10^3$ ufc/g), pero éstos disminuyeron a partir del día 7 de almacenamiento en todos los tratamientos, lo que se atribuye principalmente a la baja tolerancia de estas bacterias a la acidez normal del queso Cottage.

Desde el primer momento los recuentos de *Staphylococcus aureus* fueron menores de 10 ufc/g en todos los tratamientos, lo que indica una buena manipulación durante la elaboración del queso.

Los recuentos de mohos y levaduras, principales responsables del deterioro del producto, se incrementaron durante el almacenamiento desde $2,9 \times 10^2$ hasta $5,3 \times 10^5$ ufc/g. Los mohos y levaduras provienen del ambiente donde se elaboró y envasó el queso; es así como los cuatro tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos en los recuentos de *S. aureus*, enterobacterias, y mohos y levaduras.

CONCLUSIONES

Los organismos probióticos que se agregan en el procesamiento de queso Cottage, *Lb. casei* 01, *Lb. acidophilus* La-5 y *Bifidobacterium* BB12, permanecen viables y en número superior a 10^6 ufc/g durante la vida útil (día 14) del producto mantenido en refrigeración (4°C).

De las tres cepas evaluadas, el *Lactobacillus acidophilus* La-5 es el que registra una menor reducción de población de microorganismos durante el almacenamiento del queso Cottage y su recuento se mantiene alto hasta pasados 21 días de almacenamiento.

El *Lactobacillus casei* 01 presenta los mayores recuentos al inicio y al final del almacenamiento.

La calidad microbiológica de los productos con agregado de organismos probióticos, evaluada mediante recuento de *S. aureus*, enterobacterias, y mohos y levaduras, estuvo dentro de las especificaciones que establece la Reglamentación Sanitaria Chilena, hasta el día 14 de almacenamiento a 4°C.

Respecto a las características sensoriales del queso Cottage elaborado con agregado de *Lb. casei* 01, *Lb. acidophilus* La-5 y *Bifidobacterium* BB12, los productos resultaron afectados ligeramente en los atributos de aroma y sensación de humedad, no así en los atributos sabor y firmeza de grano; no obstante, los valores encontrados en todos los tratamientos fueron ligeramente inferiores al considerado normal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación de la Universidad Austral, por su apoyo a esta investigación. Proyecto DID – UACH S- 2006-53, *Prospección de desarrollo de un producto lácteo funcional: queso tipo Gouda reducido en grasa láctea y en sodio, adicionado de probióticos y prebióticos*. 2006 - 2008. (Investigadora principal Carmen Brito C.).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Crovetto MM, Vio del R F. Antecedentes internacionales y nacionales de la promoción de Salud en Chile: lecciones aprendidas y proyecciones futuras. *Rev Chil Nutr.* 2009 Mar; 36 (1): 32-45.
- Informe de un Grupo de Estudios de la OMS. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. OMS; 2003. 258p.
- Zacarías I, Pizarro T, Rodríguez L, González D, Domper A. Programa "5 al día" para promover el consumo de verduras y frutas en Chile. *Rev Chil Nutr.* 2006 Oct; 33 (S1): 276-280.
- Farkye NY. Acid and Acid/Rennet-curd Cheeses. Part B: Cottage Cheese. En: Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP, editores. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Volumen 2: Major Cheeses Groups. 3ª ed. London: Elsevier Ltd; 2004. Pp. 329-341.
- Joint FAO/WHO Working Group. Guidelines for the evaluation of Probiotics in foods. London Ontario, Canada: Food and Agricultural Organization of the United Nations/ World Health Organization. FAO/WHO; 2002 Apr 30- May 1. 11p.
- Hayes M, Coakley M, O'Sullivan L, Stanton C, Hill C, Fitzgerald GF, Murphy JJ. Cheese as a delivery vehicle for probiotics and biogenic substances. *Australian J Dairy Technol.* 2006; 61 (2): 132-141.
- Vinderola CG, Perdigon G, Reinheimer JA, Medici M, Prosello W, Ghiberto D. Bioqueso Ilolay Vita: un Nuevo queso probiótico con alta respuesta sobre el sistema inmune. *Industrias lácteas españolas* 2003; 298: 34-48.
- Roy D. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in Dairy products. *Le Lait.* 2005 Jan-Apr; 85 (1-2): 39-56.
- Buriti FCA, Da Rocha JS, Saad SMI. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *Int Dairy J.* 2005 Dec; 15 (1-2): 1279-1288.
- Blanchette L, Roy D, Belanger G, Gauthier SF. Production of Cottage Cheese using Dressing Fermented by Bifidobacteria. *J Dairy Sci.* 1996; 79 (1): 8-15.
- Masuda T, Yamanari R, Itoh T. The Trial for Production of Fresh Cheese incorporated probiotic *Lactobacillus acidophilus* Group Lactic Acid Bacteria. *Milchwissenschaft.* 2005; 60 (2): 167-171.
- Brito C, Pino M, Molina LH, Molina I, Horzella M, Schöbitz R. Queso Cottage elaborado con cultivo láctico REDI-SET Y DVS, usando crema láctea homogenizada y sin homogenizar. *Rev Chil Nutr.* 2006 Apr; 33 (1): 75-85.
- Obando, M. Viabilidad de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* BB12 durante el almacenamiento de queso Cottage [Tesis Magíster en Ciencias y Tecnología de la Leche]. [Valdivia]: Universidad Austral de Chile; 2008. 73p.
- Instituto Nacional de Normalización. Norma Chilena NCh.1671. Of 1979. Determinación del pH. Leche y productos lácteos. Santiago: Instituto Nacional de Normalización; 1979. 4p.
- Pinto CM, Vega y León S, Perez FN. Métodos y análisis de la leche y derivados. Garantía de calidad. Valdivia: Imprenta Universitaria S.A; 1998. 489p.
- Costa A, Graef E, Moreno I, Gajardoni L, Martelo F, Marquez D, Santos A. Selective Enumeration and Viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* in a New Fermented Milk Product. *Brazilian J Microbiol.* 2007 Jan-Mar; 38 (1): 173-177.
- Monsoor MA, Farooq K, Haque ZU. Cottage cheese whey as an ingredient of Cottage cheese dressing mixes. *Int J Dairy Technol.* 2003 Feb; 56 (1): 17-21.
- Norma Internacional Individual para el "Cottage Cheese", incluido el Cottage Cheese crema. CODEX STAN C-16-1968. En: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Organización Mundial de la Salud. Codex Alimentarius. 2ª ed. Vol 12. Roma, Italia: FAO/OMS; 2000. Pp.90-92.
- Robinson R, Batt C, Pattel PD. *Encyclopedia of Food Microbiology.* London: Academia Press; 2000. 2368p.
- Shah NP. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *J Dairy Sci.* 2000; 83 (4): 894-907.
- Mortazavian AM, Ehsani MR, Mousavi SM, Rezaei K, Sohrabvandi S, Reinheimer JA. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. *Int J Dairy Technol.* 2007 Apr 13; 60 (2): 123-127.
- Chile. Ministerio de Salud. Nuevo Reglamento Sanitario de los Alimentos. Decreto Supremo N° 977. Santiago: Editorial Pablicley; 2006. 318p.