

**VIABILIDAD DEL CULTIVO INICIADOR Y *PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII*
SUBESP *SHERMANII* DURANTE EL PROCESO DE MADURACIÓN DEL QUESO
EMMENTHAL Y SU IMPACTO NUTRICIONAL**



PAOLA ANDREA AREVALO ORTIZ

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para optar los títulos de
MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL
NUTRICIONISTA Y DIETISTA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
CARRERA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA**

**BOGOTÁ D.C
2014**

VIABILIDAD DEL CULTIVO INICIADOR Y *PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII* SUBESP
SHERMANII DURANTE EL PROCESO DE MADURACIÓN DEL QUESO EMMENTHAL Y SU
IMPACTO NUTRICIONAL

PAOLA ANDREA AREVALO ORTIZ

APROBADO

Janeth Arias P, M.Sc
Directora
Carrera de Microbiología

Martha Liévano F, M.Sc
Directora
Carrera de Nutrición y Dietética

Concepción Puerta B, PhD
Decana Facultad de Ciencias

VIABILIDAD DEL CULTIVO INICIADOR Y *PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII* SUBESP
SHERMANII DURANTE EL PROCESO DE MADURACIÓN DEL QUESO EMMENTHAL Y SU
IMPACTO NUTRICIONAL

PAOLA ANDREA AREVALO ORTIZ

APROBADO

Deyci Rodríguez C, M.Sc
Directora Trabajo de Grado
Carrera de Microbiología

Yuri Castillo Q, M.Sc
Directora Trabajo de Grado
Carrera de Nutrición y Dietética

Adriana Páez Morales
Jurado Trabajo de Grado
Carrera de Microbiología

Martha Borrero Yoshida
Jurado Trabajo de Grado
Carrera de Nutrición y Dietética

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N°13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus Alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada Contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan Ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el Anhelo de buscar la verdad y la justicia.”

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, mi familia y amigos. Por guiar todos mis pasos, darme fortaleza, ayudarme en este proyecto y enseñarme amar con decisión y pasión todo lo que se hace.

A mis padres y hermana, quienes me han apoyado incondicionalmente y siempre me dan su ejemplo de vida, rectitud, excelencia, el desafío a nunca desfallecer y luchar por lo que se quiere. Los amo.

A Camilo por su amor, paciencia, confianza y apoyo en esta gran experiencia.

A mis directoras de proyecto, Yuri Castillo y Deyci Rodríguez por su guía, enseñanzas, apoyo incondicional, consejos, exigencia, por su confianza depositada en mí, pero sobre todo por su calidad humana.

A la profesora Ana Karina por su valioso tiempo y apoyo durante este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
3. MARCO TEÓRICO	11
3.1. INDUSTRIA LÁCTEA	11
3.2. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	12
3.3. FERMENTACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	12
3.4. QUESO SEMI-MADURADO TIPO EMMENTAL	13
3.5. CULTIVO INICIADOR	14
3.5.1. <i>Características organolépticas</i>	15
3.6. CULTIVO SECUNDARIO	16
3.7. CONTRA PATÓGENOS	17
3.8. PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII SUBESP SHERMANII	17
3.8.1. <i>Caracterización genómica</i>	17
3.8.2. <i>Metabolismo</i>	17
3.9. PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII Y SU IMPACTO NUTRICIONAL	19
4. OBJETIVOS	20
4.1. OBJETIVO GENERAL	20
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. METODOLOGÍA	20
5.1. PREPARACIÓN DE MICROORGANISMOS CO-INOCULADOS	20
5.1.1. <i>Obtención de Microorganismos</i>	20
5.1.1.1. <i>Escherichia coli y Staphylococcus aureus</i>	20
5.1.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	21
5.1.2. <i>Preparación del inóculo</i>	21
5.2. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	21
5.3. CO-INOCULACIÓN CON MICROORGANISMOS	22
5.4. CONDICIONES DE CUARTOS DE MADURACIÓN	22
5.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	23
5.5.1. <i>Preparación de la Muestra</i>	23
5.5.2. <i>Métodos de análisis microbiológicos para evaluar la viabilidad del cultivo iniciador y Propionibacterium freudenreichii subesp. shermanii</i>	23
5.5.3. <i>Método de análisis microbiológicos para evaluar la viabilidad de los microorganismos co-inoculados</i>	23
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
5.7. REVISIÓN BIBLIOGRAFÍA DE LA APLICACIÓN DE PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII DE LA INDUSTRIA DE QUESOS EN SU IMPACTO EN EL SISTEMA DIGESTIVO	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE MICROORGANISMOS, CULTIVO INICIADOR Y SECUNDARIO EN ETAPA DE PRODUCCIÓN EN PLANTA	25
6.2. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL CULTIVO INICIADOR DURANTE EL PROCESO DE MADURACIÓN DEL QUESO EMMENTAL	26
6.3. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII SUBESP. SHERMANII DURANTE EL PROCESO DE MADURACIÓN DEL QUESO EMMENTAL	28
6.4. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE MICROORGANISMOS CO-INOCULADOS DURANTE EL PROCESO DE MADURACIÓN DEL QUESO EMMENTAL	32
6.5. CRECIMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN MEDIOS EMPLEADOS PARA EL RECUENTO DE MICROORGANISMOS	35
6.6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	35
6.6.1. <i>¿Qué es un Probiótico?</i>	35

6.6.2.	<i>Efecto sobre la salud</i>	37
6.6.3.	<i>Queso como portador probiótico</i>	37
6.6.4.	<i>Alimentos Funcionales</i>	38
6.6.5.	<i>Propionibacterium freudenreichii como potencial probiótico</i>	39
6.6.5.1.	Tolerancia a sales biliares y pH ácidos	39
6.6.5.2.	Termo tolerancia	40
6.6.5.3.	Adhesión intestinal	41
6.6.5.4.	Reducción de patógenos en la mucosa intestinal	42
6.6.6.	<i>Propionibacterium freudenreichii y su impacto para la salud</i>	42
6.6.6.1.	Modulación de la motilidad	42
6.6.6.2.	Actividades metabólicas y absorción en el intestino	43
6.6.6.2.1.	Actividad β-galactosidasa	43
6.6.6.2.2.	Modulación de ácidos de cadena corta	44
6.6.6.2.3.	Producción de Trehalosa	46
6.6.6.3.	Producción de Vitaminas	46
6.6.6.3.1.	Vitamina B₁₂ (Cobalamina)	46
6.6.6.3.2.	Vitamina B₉ (Ácido Fólico)	48
6.6.6.3.3.	Vitamina B₂ (Riboflavina)	48
6.6.6.4.	Interacción con la microbiota intestinal	49
6.6.6.4.1.	Identificación de componentes bifidiogénicos	49
6.6.6.4.2.	Reducción de microorganismos en adhesión a células intestinales	49
6.6.6.5.	Efecto antimutagénico	50
6.6.6.5.1.	Lectinas	51
6.6.6.5.2.	Enzimas	52
6.6.6.6.	Efecto antiinflamatorio a nivel intestinal	52
6.6.6.6.1.	Atenuación de colitis	52
6.6.6.6.2.	Tratamiento del Síndrome de intestino irritable	53
6.6.6.7.	Efecto Inmunomodulador	53
6.6.6.7.1.	Acción Antiinflamatoria	53
6.6.6.7.2.	Efecto Anti-alérgico	54
6.6.7.	<i>Propionibacterium freudenreichii, Alimentos Funcionales y Nutraceuticos</i>	54
7.	CONCLUSIONES	60
8.	RECOMENDACIONES	60
9.	BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS		70
ANEXO 1.	EVIDENCIA FOTOGRÁFICA	70
ANEXO 2.	MEDIOS DE CULTIVOS	75
ANEXO 3.	ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE MICROORGANISMOS	76
ANEXO 4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Rutas metabólicas de degradación de lactosa por <i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>	16
Figura 2	Ciclo Wood-Werkman por <i>Propionibacterium freudenreichii subesp shermanii</i>	20
Figura 3	Etapa de fabricación del queso Emmenthal en planta.....	21
Figura 4	Secuencia de Etapa de co-inoculación con microorganismos en Queso Emmenthal.....	22
Figura 5	Cuartos de Maduración.....	22
Figura 6	Viabilidad de microorganismos co-inoculados, cultivo iniciador y secundario en etapas de producción del queso Emmenthal.....	26
Figura 7	Cambios en la apariencia del queso.	28
Figura 8	Grafica integrada de la viabilidad de <i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> durante el proceso de maduración del queso Emmenthal y su interacción sobre las variables temperatura y humedad relativa.....	29
Figura 9	Grafica integrada de la viabilidad de <i>Propionibacterium freudenreichii subesp. shermanii</i> durante el proceso de maduración del queso Emmenthal y su interacción sobre las variables temperatura y humedad relativa	30
Figura 10	Desarrollo de los ojos característicos del Queso Emmenthal durante la etapa de maduración.....	31
Figura 11	Producción de CO ₂ en maduración del queso Emmenthal.....	32
Figura 12	Grafica integrada de la viabilidad de microorganismos co-inoculados durante el proceso de maduración del queso Emmenthal y su interacción sobre las variables temperatura y humedad relativa.....	34
Figura 13	Mecanismo de actividad probiótica.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Estadística descriptiva de la viabilidad de <i>Lactobacillus helveticus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> durante el proceso de maduración del queso Emmenthal.....	27
Tabla 2	Estadística descriptiva de la viabilidad de <i>Propionibacterium freudenreichii subesp. shermanii</i> durante el proceso de maduración del queso Emmenthal.....	30
Tabla 3	Maduración del queso Emmenthal.....	34
Tabla 4	Efectos de los Probióticos.....	38
Tabla 5	Matriz de correlación de estudios in vivo en suplementación con <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	56

VIABILIDAD DEL CULTIVO INICIADOR Y *PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII* SUBESP *SHERMANII* DURANTE EL PROCESO DE MADURACIÓN DEL QUESO EMMENTHAL Y SU IMPACTO NUTRICIONAL

1. RESUMEN

Propionibacterium freudenreichii subesp. *shermanii* es conocido en la industria láctea como cultivo secundario para la maduración del queso tipo suizo como el Emmenthal, debido a su metabolismo, el ciclo de Wood-Werkmann procede a la formación de acetato, ácido propiónico y dióxido de carbono como principales productos finales de la fermentación, contribuyendo al desarrollo de características organolépticas y a la formación de los ojos característicos de este tipo de queso. También se ha reportado en estudios *in vitro* como *in vivo* que *P. freudenreichii* en lácteos constituyendo una ventaja clave para su uso como probiótico, presentando un impacto para la salud, porque influye en la modulación de la motilidad intestinal, la producción de ácidos de cadena corta, la actividad de la β -galactosidasa, la producción de trehalosa, ácido 1,4-dihidroxi-2-naftoico (DHNA) como componente bifidiogénico y se considera potencial productor de vitaminas del complejo B (riboflavina, ácido fólico y cobalamina), además presenta un efecto antimutagénico con la disminución de la actividad de lectinas y enzimas carcinogénicas, así mismo su papel como agente antiinflamatorio e inmunomodulador y finalmente presentar la capacidad de inhibir microorganismos, puesto que es conocido por su acción bactericida, basados en la producción de metabolitos tales como el ácido propiónico, ácido acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. De esta manera se diseñó un estudio transversal para la revisión de la literatura científica, centrándose en los posibles beneficios de *P. freudenreichii*, sobre la salud humana, haciendo énfasis en su impacto sobre el sistema digestivo. Igualmente se desarrolló un estudio experimental, mediante la determinación de la viabilidad de *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus thermophilus* como cultivo iniciador y *P. freudenreichii* subesp. *shermanii* como cultivo secundario, evidenciando un efecto controlador sobre microorganismos co-inoculados (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y una mezcla de éstos), durante el proceso de maduración (75 días) del queso Emmenthal, para ello se empleó la técnica de recuento en placa (superficie, profundidad y microgota), con el fin de determinar la viabilidad de las cepas. Como resultados principales se observó que durante el proceso de maduración la concentración promedio final del cultivo iniciador para los tratamientos fue de 7.2 ± 0.2 unidades logarítmicas por gramo (UL/g) y el control 8.1 ± 0.23 UL/g, así como para el cultivo secundario fue de 8.9 ± 0.52 UL/g y el control 9.3 ± 0.42 UL/g ($p > 0.05$), con base al control. Estas concentraciones finales respecto al control aumentaron en relación a la inicial 0.7 ± 0.29 y 1.2 ± 0.88 UL/g respectivamente, también se demostró un efecto controlador del cultivo iniciador y el secundario, en la reduciendo de la viabilidad *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y mezcla en 5.1 ± 0.56 , 4.8 ± 1.02 , 8.2 y 3.1 ± 0.89 UL/g respectivamente, durante el proceso de maduración del queso Emmenthal. Concluyendo así que *P. freudenreichii* subesp. *shermanii*, presenta un potencial como cepa titular en la tecnología del queso, muestra un efecto controlador en la inhibición de microorganismos y se evidencia su papel como probiótico en su impacto para la salud.

2. INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industria de alimentos ejerce un impacto para la economía mundial, así como para nuestro país Colombia, porque desempeña un papel importante en el procesamiento de materias primas y el suministro de alimentos, además una de las tecnologías principales en ésta industria, es el empleo de la fermentación como eje principal de sus procesos, en donde se centra la industria láctea, pues se encarga del procesamiento de una amplia gama de productos fermentados, producidos bajo la acción de las bacterias del ácido láctico (BAL), tales como yogurt, kumis, kéfir, cremas para untar y de manera especial, diferentes tipos de quesos, principalmente aquellos que sufren procesos de maduración (Bigliardi *et al.*, 2013), estos microorganismos producen metabolitos tipo ácidos o alcoholes que influyen no sólo sobre la calidad organoléptica del producto contribuyendo al desarrollo de características como aroma, sabor y textura (Shah *et al.*, 2007), además tienen un papel trascendental en la inhibición del crecimiento de microorganismos y por ende en la reducción de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (Bourdichon *et al.*, 2012).

Respecto a los quesos madurados, vale la pena destacar las ventajas más notables a considerar, porque éste producto durante la maduración presenta un ambiente hostil, típicamente caracterizado por la presencia de sal, bajo contenido de humedad, valor de pH 4.9 - 5.3, temperaturas bajas y una deficiencia de nutrientes, que están inhibiendo claramente muchos grupos microbianos (incluso cepas), que concluyen no sólo en un alimento más seguro desde el punto de vista de la inocuidad, sino en un producto que contribuye al mantenimiento y diversificación de la microbiota corporal, al mantener viables y en cantidades suficientes algunas especies de BAL. Estos microorganismos que son capaces de sobrevivir al medio agresivo presentado durante la maduración, actúan como cultivo iniciador y secundario de este proceso, influyen notablemente sobre el desarrollo de las características físicas y organolépticas para el producto final y además se ha visto que pueden llegar a tener propiedades probióticas (Settanni *et al.*, 2010).

También es importante señalar que en la industria láctea, se emplea como cultivo secundario para la maduración de quesos especialmente del tipo suizo como el Emmental a *P. freudenreichii* subesp *shermanii* (Cardoso *et al.*, 2007; Rivera-Espinoza *et al.*, 2010), porque esta cepa confiere características muy específicas en el sabor, aroma y formación de agujeros redondos característicos (ojos), de este tipo de queso. *P. freudenreichii* subesp *shermanii* también es conocido por su producción de ácido fólico, vitamina B₁₂ y ácido propiónico (Thierry *et al.*, 2011; Kosmider *et al.*, 2012) y es cada vez más estudiado por sus efectos positivos en la nutrición humana (Cousin *et al.*, 2012). Asimismo, en la industria de alimentos se ha reportado el empleo de este microorganismo y de bacterias ácido lácticas (BAL) como *S. thermophilus* y *L. helveticus* para la producción de sustancias antimicrobianas, tales como ácidos orgánicos y bacteriocinas, estos productos metabólicos se han aplicado en los alimentos contra los microorganismos patógenos (Mufandaedzaet *al.*, 2006). Principalmente se ha reportado por literatura que *S. thermophilus*, *L. helveticus* y *P. freudenreichii* subesp *shermanii* pueden reducir los recuentos de *Listeria monocytogenes* (Speranza *et al.*, 2009), *Staphylococcus aureus* (Charlier *et al.*, 2009) y *Escherichia coli* (Gutierrez *et al.*, 2008), los cuales podría implicar un brote de intoxicación alimentaria, de esta manera la inhibición de éstos resurtirá en la reducción de ETAs.

De este modo, se realizó un estudio experimental, que pretende determinar la viabilidad del cultivo iniciador (*S. thermophilus* y *L. helveticus*) y *P. freudenreichii* subesp *shermanii* durante el proceso de maduración (75 días) del queso Emmental. Dicho producto fue elaborado por la empresa Alpina productos alimenticios S.A., donde fueron co-inoculados por microorganismos (*L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus*) durante su maduración, para que de ésta manera se pueda evidenciar la reducción de al menos una unidad logarítmica de éstas cepas influenciados por las BAL como cultivo iniciador y *P. freudenreichii* subesp *shermanii* como cultivo secundario, considerando éstos microorganismos de gran importancia para la elaboración y maduración del queso Emmental en la industria de

quesos, además se realizó una revisión de la literatura científica acerca de los avances recientes en relación con la aplicación de *P. freudenreichii* en la industria láctea y la evaluación de los posibles beneficios de este microorganismo sobre la salud humana, haciendo énfasis en su impacto sobre el sistema digestivo.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Industria láctea

La industria láctea es un sector de la industria de alimentos que tiene como principal materia prima la leche, predominantemente la de origen de vaca. En ésta industria se genera una amplia gama de productos y subproductos, desde los no fermentados como mantequilla y helados, hasta los productos fermentados, como el yogurt, kumis, y diferentes tipos de quesos.

Dicha industria ha considerado de gran importancia la demanda productiva de quesos, en su variedad y calidad en el país, abasteciendo la demanda interna y generando excedentes para la exportación (OAC, 2006). Actualmente el país adquiere 49 mil 524 toneladas de este producto, mientras que hace dos años la cifra solo alcanzo 46 mil toneladas, además se ha estimado que hace 5 años el consumo per cápita por habitante era de 0.8kg pasando a ser de 1.1 kilos de queso al año, lo que significa un aumento significativo en el consumo del producto (contexto ganadero, 2013), este hecho tiene correlación con lo expresado en la ENSIN 2010, pues se observa que 3 de cada 5 colombianos incluye el consumo de derivados lácteos como el queso, yogurt o kumis, siendo estos preferiblemente consumidos semanalmente; sumando lo anterior mencionado se considera que el país produce una gran variedad de quesos, pero no hay cultura en el consumo de los mismos, en gran parte influenciada por los altos precios y el bajo poder adquisitivo de los estratos más bajos (Catering, 2007), es relevante mencionar como éste panorama pone de manifiesto un gran reto para la industria nacional, que está llamada a superar esa fuerte preferencia del consumidor colombiano por los quesos frescos y de consumo ocasional, a través de la diversificación de su portafolio de productos, en pro de ofrecer nuevas alternativas, no solamente innovadoras desde el punto de vista comercial, sino desde la perspectiva nutricional y económica.

La modificación paulatina de estos patrones, redundará en mayores volúmenes de consumo y en la oportunidad para que por ejemplo los quesos madurados sean incluidos en la alimentación de forma más habitual (ProChile, 2008).

Ahora bien, considerando las nuevas perspectivas sobre *P. freudenreichii*, es de mencionar que este tópico viene siendo explorado y ha llamado la atención por parte de los productores de alimentos procesados, especialmente los de productos lácteos, ya que hoy por hoy ante el “boom” de los llamados “alimentos saludables” este sector industrial se está viendo obligado a innovar en el desarrollo de nuevos productos que contribuyan directamente a la salud del consumidor y al incentivo de una alimentación equilibrada, completa, suficiente y adecuada (Bigliardi *et al.*, 2013). Así pues, la evidencia científica actual pone de manifiesto y está de acuerdo con el desarrollo y consumo de alimentos funcionales, representando un pilar en la investigación y la innovación en la industria alimentaria imponiendo nuevos estándares y exigencias entre las empresas para este último siglo.

3.2. Bacterias Ácido Lácticas

Los productos lácteos fermentados son principalmente producidos por bacterias ácido lácticas (BAL) como cultivos iniciadores los cuales son tradicionalmente empleados en la fermentación, con el fin de generar ciertos metabolitos durante las primeras etapas del proceso, que se relacionan con las características de vida útil, aporte de cualidades

organolépticas, así como nutricionales (Leroy *et al.*, 2004).

De esta manera, es importante mencionar las generalidades de las BAL, las cuales constituyen un grupo bastante diverso de géneros que comparten muchas características fisiológicas, como por ejemplo su capacidad para fermentar los azúcares a través del metabolismo homo o heterofermentativo y obtener así ácido láctico, principalmente (Nielsen *et al.*, 2007). Las BAL, se caracterizan por ser microorganismos Gram positivos, no esporulados, presentan bajo contenido de guanina y citosina (G+C), son catalasa-negativos y tienen un comportamiento como aerobios y anaerobios facultativos. La heterogeneidad de éste grupo de bacterias es expresada en sus características morfológicas, ya que pueden tener forma de bacilos (varilla) o de cocos y estar dispuestos en células individuales, pares, tétradas y cadenas cortas o largas (Klaenhammer *et al.*, 2005).

Los géneros comúnmente seleccionados pertenecen a *Lactococcus* (leche), *Lactobacillus* (leche, carne, verduras, cereales), *Leuconostoc* (verduras, leche), *Pediococcus* (verduras, carne), *Oenococcus* (vino), *Streptococcus* (leche), entre otros, (Settanni *et al.*, 2010). Además, estos microorganismos fermentativostípicamente contribuyen en la producción de antimicrobianos como ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido caprónico), dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etanol y bacteriocinas, que inhiben el crecimiento de microorganismos y la reducción de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (Leroy *et al.*, 2004; Settanni *et al.*, 2010).

3.3. Fermentación de Bacterias Ácido Lácticas

La fermentación microbiana juega un papel importante en la fermentación de alimentos, se conoce que en las fermentaciones clásicas no se utiliza oxígeno como aceptor terminal de electrones y tampoco se utiliza la cadena respiratoria completa, existe la necesidad de una vía alternativa mediante la cual la célula recicle el NADH producido por la ruta de Embden Meyerhor Parnas (EMP), de manera que haya NAD disponible para continuar el proceso, este es el motivo de la gran diversidad de productos finales en las fermentados y que el piruvato sea convertido de muy variadas maneras. Razón por la cual para las BAL podemos encontrar dos tipos de metabolismo: la primera se considera la fermentación Homoláctica perteneciente a la BAL *homofermentativas*, donde reducen el piruvato únicamente a ácido láctico y la segunda es la fermentación Heteroláctica, perteneciente a las BAL *heterofermentativas* que presentan productos finales alternativos, los más representativos son lactato, etanol y CO₂ producidos mediante la ruta fosfocetolasa, estos subproductos dan como resultado a una gran variedad de compuestos orgánicos, la mayoría de ellos contribuyen las características organolépticas, a la preservación y el aspecto exterior del producto (Bamforth *et al.*, 2007; Parra *et al.*, 2010).

De esta forma, la fermentación por parte de las BAL tienen un gran impacto sobre la calidad organoléptica de los productos alimenticios, pues mediante su metabolismo transforman los componentes de la materia prima, tales como proteínas, lactosa, citrato y grasa, obteniendo sustancias catalogadas como metabolitos secundarios. Estos compuestos aromáticos y volátiles, que contribuyen al sabor, aroma tales como acetato, etanol, diacetilo, acetaldehído, ente otros. Asimismo, la producción de sustancias volátiles por parte de las BAL, contribuyen al sabor típico de determinados productos fermentados, como el pan amargo (lactato/ acetato), kéfir y kumis (etanol), la mantequilla y el suero de leche (diacetil) y yogur (acetaldehído), así como la producción de exopolisacáridos (EPS), los cuales confieren el desarrollo de la textura del producto (Deutsch *etal.*, 2008).

Gracias a algunas de sus propiedades metabólicas, las BAL pueden desempeñar diferentes funciones en la elaboración del queso: algunas especies participan en el proceso de fermentación, mientras que otros están implicados en la maduración del queso (Marilleyet *al.*, 2004).

3.4. Queso semi-madurado tipo Emmenthal

El queso Emmenthal, también conocido como queso suizo, se caracteriza por la presencia de “ojos o agujeros” característicos, por el cual lo ha hecho famoso alrededor del mundo; fue producido originariamente en Suiza en el valle de Emme, aproximadamente hace 300-400 años, su manufactura tradicional se ha convertido en la base de producción quesera en grandes industrias, así como muchos fabricantes han conservado el moldeado tradicional, para facilitar la manipulación de la cuajada y el control de las condiciones del proceso (Wouter *et al.*, 2002). Para Colombia la NTC 4311, presenta los requisitos generales y específicos del Queso Emmenthal.

En cuanto a la fase de fabricación de este queso tipo suizo, la etapa de manufactura puede durar entre 24 horas, en el esquema de elaboración de este tipo de queso, se pueden evidenciar diferentes operaciones descritas a continuación: primero la preparación de la leche, la cual se debe seleccionar y estandarizar teniendo en cuenta que debe tener entre 2.8 – 3.0% de contenido de grasa y acidez de 13 – 17°TH, para luego realizar un termizado de 63°C aproximadamente a 15 segundos, posterior a ello se inocula el cultivo iniciador comprendido por *S. thermophilus* y *L. helveticus*, 5 minutos después se adiciona el cultivo secundario denominado *P. freudenreichii* subesp *shermanii*, donde se ha reportado como seguro, según la comunidad Americana en Generally Regarded as Safe (GRAS) y la comunidad Europea en Quality Positioning Services (QPS), como tercera etapa se le adiciona el quimosina enzima que interviene en la K – caseína y procede a una desestabilización estérica en la capa de la micela de caseína, este proceso se ha denominado coagulación, en donde se da la firmeza del cuajo, también se emplea la adición de carbonato de calcio el cual es clave para la formación de las micelas del gel en el cuajo, además es importante mencionar que los microorganismos inoculados poseen un potencial enzimático que junto con la acción de la quimosina desarrollan la acidificación al disminuir el pH de la leche cambiando sus propiedades fisicoquímicas, como cuarta etapa, se empieza el proceso de sinéresis, donde se realiza el corte de la cuajada, considerándose que el tamaño de los cubos formados por el corte, determina la calidad de la sinéresis o salida del suero, puesto que esta etapa es clave para la diferenciación de las variedades de quesos, debido que se concentra la grasa y entre 6 y 12 veces el contenido de caseína de la leche; posterior al etapa de corte se agita durante aproximadamente 30 min a 45 – 53°C para activar el crecimiento del cultivo termófilo y propionibacteria, luego se realiza un desuerado empleando una tela fina de quesería procedente de Suiza, la cual ayuda a trasladar el cuajo obtenido por la sinéresis y lo deposita en un molde de dimensiones comúnmente de 20 cm de diámetro por 15 cm de alto, luego en la siguiente etapa, se realiza el prensado, durante dos días incrementando con el tiempo su presión, donde permite compactar la estructura y formar el bloque final. Finalmente se sumergen los bloques de quesos en tinas de salmuera de temperatura de 8 a 12 °C por 48 horas (INTI, 2005; Thierry *et al.*, 2009; Richoux *et al.*, 2009).

Posterior a esta fase, se pasan los quesos a la etapa de maduración el cual se mantiene controlada la temperatura alrededor de 20–25°C y la humedad relativa entre 83–85%, esta humedad permite a propionibacteria desempeñan un papel importante en el sabor característico compuestos, tales como ácidos grasos libres liberados a través de la lipólisis de glicéridos de la leche y ácidos de cadena ramificada resultantes de la catabolismo de los aminoácidos, la producción de compuestos volátiles, propionato, CO₂ y acetato principalmente, que desempeñan un papel importante en el sabor característico y aroma propio del queso Emmenthal (Robinson, 1995; Beresford *et al.*, 2001; Falentin *et al.*, 2010).

3.5. Cultivo iniciador

En la manufactura del queso Emmenthal las bacterias principales que efectúan la fermentación, son conocidas como *L.helveticus* y *S.thermophilus*, las cuales han reportado su acción conjunta como cultivo iniciador en la producción de este tipo de queso (Piveteau *et al.*, 1995; 2002). *L.helveticus* es un bacilo Gram positivo, inmóvil, de

catalasa negativa, con un crecimiento óptimo de 39 a 42°C, fermentando principalmente glucosa, galactosa y lactosa, mediante la ruta de Embden Meyerhof y la de Leloir como se observa en la Figura 1, este se considera como secundario productor de ácido y ayuda a disminuir el pH en el queso, promoviendo la proteólisis y lipólisis en la etapa de maduración, contribuyendo a la formación de compuestos que influyen en las características organolépticas de este producto (White *et al.*, 2003).

También encontramos a *S. thermophilus*, característico por presentarse como cocos agrupados en forma de cadena y ser Gram positivo, de oxidasa y catalasa negativa, anaerobio facultativo, termófilo (40-55°C), fermentador de glucosa y lactosa, empleado la ruta de Embden Meyerhof, también se ilustra en la Figura 1 (Thierry *et al.*, 2004), este microorganismo se considera el principal fermentador en la etapa de manufactura que interviene en la conversión de la lactosa a ácido láctico; ambas cepas presentan características bioquímicas similares capaces de metabolizar ácido láctico, por la enzima β-galactosidasa para hidrolizar la lactosa y así producir ácido láctico, como también dióxido de carbono durante el proceso de fermentación, se estima que pueden bajar el pH a 4.9 - 5.3 en 6 horas a 30 – 37°C, asimismo en esta etapa de maduración la concentración de oxígeno es de 3 – 4 %, presentando así un medio hostil. Se conoce también que en las primeras etapas de la fabricación del queso, pueden alcanzar hasta 10⁹ UFC/g de queso y durante la maduración puede disminuir con rapidez a 10⁶ UFC/g (Wouters *et al.*, 2002; Beresford *et al.*, 2001)

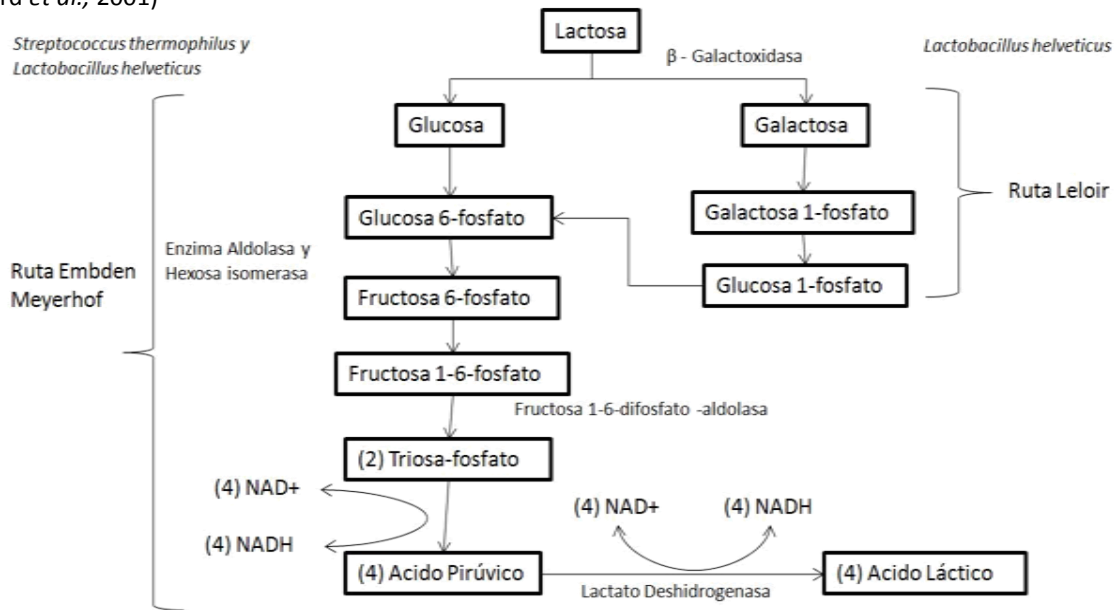


Figura 1. Rutas metabólicas de degradación de lactosa por *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus thermophilus*. (Adaptado de: Wouters *et al.*, 2002; Beresford *et al.*, 2001)

3.5.1. Características organolépticas

Por su implicación durante los procesos de fermentación, las BAL también tienen un gran impacto sobre la calidad organoléptica de los productos alimenticios, porque mediante su metabolismo transforman químicamente los componentes de la materia prima, tales como proteínas, lactosa, citrato y grasa, obteniendo sustancias catalogadas como metabolitos secundarios. Estos corresponden a compuestos aromáticos y volátiles (como el acetaldehído), que contribuyen al sabor, aroma y la producción de exopolisacáridos (EPS), los cuales juegan un papel muy importante en el desarrollo de la textura del alimento (Deutsch *et al.*, 2008).

De acuerdo a la literatura la formación de los compuestos aromáticos y volátiles por BAL, confieren características

específicas para el sabor, donde pueden exhibir dos mecanismos independientes que puedan causar este efecto. En primer lugar, la capacidad de formación del sabor se ve influenciado por la codificación de genes para la expresión de las enzimas claves para la formación de sabor. El segundo mecanismo que causa las diferencias en la formación del sabor, se debe a la aparición de diferentes variantes en la secuenciación de aminoácidos de estas enzimas, las cuales pueden resultar en actividades catalíticas que se ven alteradas y dan lugar a una obtención en diferentes tasas de la producción del sabor (Van Hylckama *et al.*, 2007). Estas enzimas pueden catalizar varias reacciones incluyendo la desaminación, transaminación y descarboxilación, por ejemplo, la conversión de los aminoácidos de cadena ramificada por lactococos y su transaminación en cetoácidos. Estos pueden sufrir degradación espontánea o pueden ser convertidos enzimáticamente en correspondientes aldehídos o ácidos carboxílicos, así como la formación de 3-metilbutanal, el cual es un compuesto clave en muchos productos lácteos con un sabor a malta o chocolate, debido que BAL produce una enzima que es capaz de liberar leucina de la caseína y transaminar este aminoácido en ácido α -cetoisocaproico; posteriormente actúa una descarboxilasa para ser convertido en 3-metilbutanal (Wouters *et al.* 2002).

Como se presentó las BAL poseen un complejo enzimático muy amplio, donde se presentan una vasta gama de enzimas hidrolíticas capaces de efectuar proteólisis que liberan aminoácidos libres y lipólisis que metabolizan a ácidos grasos de cadena corta contribuyen ambos al sabor, incluso la producción de polisacáridos exocelulares (EPS) (N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina y β -glucano) que contribuyen a la textura del producto (Leroy *et al.*, 2004; Lortal *et al.*, 2005; Beresford *et al.*, 2001).

3.6. Cultivo Secundario

El género *Propionibacterium spp.* pertenece a la clase de Actinobacteria, se describió por primera vez a finales del siglo 19 por E. von Freudenreich y S. Orla - Jensen, durante el estudio de los procesos fermentativos en el queso Emmenthal, lo que los llevó a proponer el género *Propionibacterium spp.* (Von Freudenreich *et al.*, 1906), el cual se caracteriza por ser heterofermentativo y metaboliza una variedad de sustratos tales como hidratos de carbono, alcoholes y ácidos orgánicos, además presentar un alto contenido de guanina y citosina, caracterizado por ser Gram positivo, no esporulado, pleomórfico, no móvil, catalasa positiva, de crecimiento en condiciones anaeróbicas o aerotolerantes de manera óptima a 30 ° C y crecimiento a pH neutro (Cousin *etal.*, 2011).

El género *Propionibacterium spp.* se divide en dos grupos teniendo en cuenta el criterio de clasificación según el hábitat de origen: origen cutáneo (por lo general se encuentran en la piel) y de origen clásico o lácteos (aislados principalmente de productos lácteos como el queso), para éste último grupo podemos encontrar a *P. acidipropionici*, *P. cyclohexanicum*, *P. jensenii*, *P. microaerophilum*, *P. thoenii*, *P. freudenreichii subsp. freudenreichii* y *P. freudenreichii subsp. Shermanii* (Downes *et al.*, 2009).

Del grupo de clasificación de origen lácteo, encontramos a *P. freudenreichii subsp. shermanii*, en donde presenta su papel como cepa titular en la tecnología del queso y responsable por el proceso de maduración del queso Emmenthal, donde emplea como vía metabólica el ciclo de Wood-Werkmann (Wood *et al.*, 1981), donde es liberado como productos de su metabolismo propionato, acetato, succinato y dióxido de carbono. También, *P. freudenreichii subsp. Shermanii* en lácteos fermenta una amplia gama de sustratos de hidratos de carbón, tal adaptabilidad notable y versatilidad son características de *P. freudenreichii subsp. shermanii*, lo cual le confiere a esta cepa la sobrevivencia en diversos nichos y debe permitir su crecimiento y/o viabilidad en una variedad de sustratos, así mismo sobrevive las tensiones tecnológicas impuestas como la liofilización, secado por pulverización, la reconstitución en leche, la fabricación de queso Emmenthal demostrando su termo tolerancia y el almacenamiento a bajas temperaturas, constituyendo una ventaja clave para su uso como probiótico (Anastasiou *et al.* 2006).

3.7. Contra Patógenos

Las BAL han sido ampliamente utilizadas como probióticos o en cultivos iniciadores y tienen el potencial de sobrevivir en condiciones extremas y desfavorables, debido a poseer como una serie de genes de resistencia a antibióticos con el riesgo de ser atacadas por bacterias nocivas (González *et al.*, 2010), además pueden producir sustancias antimicrobianas con la capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos y el deterioro de los mismos. De este modo, los ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido caprónico), dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etanol y bacteriocinas se incluyen, entre estos compuestos de interés en los agentes antimicrobianos producidos de forma natural por BAL, que pueden ser capaces de contribuir a garantizar la seguridad y la calidad tecnológica de estos productos fermentados (Leroy *et al.*, 2004). Se ha reportado por literatura que las BAL y *P. freudenreichii* subesp. *shermanii* pueden reducirlos recuentos de *L. monocytogenes* (Speranza *et al.*, 2009), *S. aureus* (Charlier *et al.*, 2009) y *E. coli*, y por ende en la reducción de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), (Bourdichon *et al.*, 2012).

3.8. *Propionibacterium freudenreichii* subesp *shermanii*

3.8.1. Caracterización genómica

El genoma de *P. freudenreichii* consiste en un mapa cromosomal circular de 2.616.384 pares de bases (pb), con el 67% de contenido de guanina y citosina (G+C). El genoma contiene 2 operones rRNA y 45 tRNAs, los cuales están relacionados con el crecimiento de esta bacteria que puede utilizarlos recursos de manera eficiente, y son capaces de crecer en ambientes con bajo contenido de nutrientes.

El cromosoma se prevé que contienen 2439 genes codificadores de proteínas, 490 de los cuales fueron identificados por cromatografía líquida y espectrometría de masas. También se ha demostrado que, los elementos de transposición de *P. freudenreichii* puede inducir cambios fenotípicos. El primer ejemplo es proporcionado por el gen *gtf*, el cual codifica una sintasa polisacárida involucrada en la síntesis decapsular de exopolisacáridos (EPS). El segundo ejemplo se refiere a la capacidad de fermentar la lactosa por *P. freudenreichii*, pero esta característica depende su genoma, el locus de la lactosa consta de tres genes que codifica para una β -galactosidasa, LacZ, un transportador galactósido, GalP y una isomerasa UDP-glucosa, GalE1, respectivamente. Es importante denotar que la fermentación de lactosa es un criterio fenotípico utilizado para diferenciar la subespecie *P. freudenreichii* subesp. *shermanii* (positivo para la fermentación de la lactosa) y *P. freudenreichii* subesp. *freudenreichii* (negativo para la fermentación de lactosa), la justificación de estas subespecies debería ser más investigadas (Meurice *et al.*, 2004; Falentin *et al.*, 2010; Thierry *et al.*, 2011; Dalmasso *et al.*, 2011).

3.8.2. Metabolismo

P. freudenreichii subesp *shermanii*, es heterofermentativo y metaboliza una variedad de sustratos tales como hidratos de carbono (incluyendo lactosa, galactosa, D-glucosa, D-manosa), alcoholes (glicerol y eritritol y adonitol) y ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido glucónico); siendo capaz de catabolizar estos azúcares por diferentes vías (glucólisis, fosfato de pentosa y Entner-Doudoroff). Se conoce también que *P. freudenreichii* subesp *shermanii* puede utilizar la lactosa residual presente de concentraciones muy bajas, tomando los carbohidratos derivados de glicomacropéptidos de caseínas y glicoproteínas derivadas de membranas de los glóbulos de grasa; además por ser heterofermentativo puede fermentar las pentosas liberadas de la lisis de las BAL, constituyendo compuestos de principal fuente nutricional de este microorganismo (Thierry *et al.*, 2004).

Además, este microorganismo presenta una vía metabólica en particular denominada el ciclo de Wood-Werkmann (Figura 2) (Wood *et al.* 1981; Thierry *et al.*, 2004), en donde como productos de su metabolismo produce

propionato, acetato, succinato y dióxido de carbono, donde estos compuestos se ven evidenciados en características muy específicas en el sabor, aroma y formación de agujeros redondos característicos (ojos) en el queso (Marilley *et al.*, 2004).

Esta vía, utiliza NADH formado durante la glucólisis y la oxidación de piruvato para producir extra-ATP, siendo reacciones reversibles, la característica clave del ciclo Wood-Werkman, es la reacción de transcarbonización, donde la enzima involucrada es un complejo de carboxitransferasa-biotina, compuesta por tres subunidades, que cataliza esta reacción. El piruvato es llevado a oxaloacetato por una descarboxilación oxidativa, mediada por un grupo carboxilo de metilmalonil-CoA y propionil-CoA reductasa sin consumo de ATP. De esta forma, el oxaloacetato es reducido a malato, luego a fumarato hasta ser convertido en succinato, mediante enzimas deshidrogenasas las cuales implican el transporte de electrones de forma anaeróbica por el citocromo B y la generación de ATP. Luego el succinato se convierte a succinil-CoA reductasa, de manera simultánea con la conversión de propionil-CoA a propionato, por una CoA-transferasa, de esta forma, el Succinil-CoA es finalmente isomeriza a metilmalonil-CoA en una reacción catalizada por metilmalonil-CoA mutasa a R- Metil-manolil-CoA, actuando luego una metilmalonil-CoA epimerasa para pasar a S-Metil-manolil-CoA y finalmente la metilmalonil-CoA carboxitransferasa, siendo esta coenzima dependiente de biotina, libera CO₂ para formar oxaloacetato nuevamente (Piveteau *et al.*, 1999; Falentin *et al.*, 2010; Thierry *et al.*, 2011).

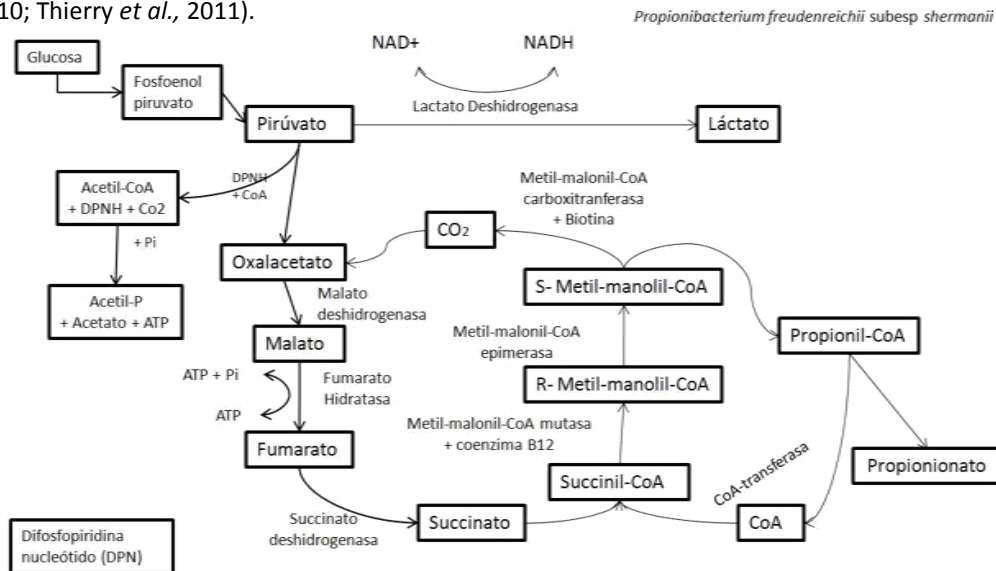


Figura 2. Ciclo Wood-Werkman por *Propionibacterium freudenreichii* subesp. *shermanii*

(Adaptado de: Thierry *et al.*, 2011)

3.9. *Propionibacterium freudenreichii* y su impacto en el sistema digestivo

Algunas cepas representativas de *P. freudenreichii* han sido bien documentadas en las aplicaciones industriales y se han propuesto para aplicaciones probióticas (Rivera *et al.*, 2010), las cuales han evidenciado efectos positivos en la nutrición humana, ya que han ido ganando reconocimiento en los últimos años, siendo también un modelo para el estudio *in vitro* evaluando su comportamiento y sobrevivencia a condiciones ambientales de crecimiento comparables a las presentes en el intestino delgado (Shah *et al.*, 2007; Van Hylckama *et al.*, 2007). En estudios previos, se ha determinado que esta cepa tiene la capacidad de reducir de la incidencia de Concavalina-A (Zarate *et al.*, 2012), siendo una herramienta eficaz para evitar las interacciones lectinas dietéticas y la prevención de sus efectos citotóxicos en las células epiteliales intestinales; además, la reducción de las enzimas β -glucosidasa, β -glucuronidasa, como uno de los mecanismos sugeridos mediante el cual se pueden reducir la formación de compuestos cancerígenos y mutagénicos en el intestino humano; siendo también *P. freudenreichii* productor de Glicerol, (Tetrahidrofolato) Ácido Fólico y Vitamina B₁₂ (Murooka *et al.*, 2005); así como también el alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa, la prevención y el tratamiento de la diarrea, la mejora de la inmunidad mediante el equilibrio de la microflora intestinal y la reducción del riesgo de cáncer de colon (Settanni *et al.*, 2010; Suomalainen *et al.*, 2008).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la viabilidad del cultivo iniciador y *Propionibacterium freudenreichii* subesp *shermanii* durante el proceso de maduración del queso Emmenthal.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar la viabilidad del *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus thermophilus* como cultivo iniciador y *P. freudenreichii* subesp. *shermanii* como cultivo secundario, durante el proceso de maduración del queso Emmenthal.
- Evaluar la viabilidad de microorganismos co-inoculados (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y una mezcla de estos) durante el proceso de maduración del queso Emmenthal.
- Realizar una revisión de la literatura científica acerca de la aplicación de *P. freudenreichii* en la industria de quesos y la evaluación de sus efectos como probiótico haciendo énfasis en su impacto en el sistema digestivo.

5. METODOLOGÍA

5.1. Preparación de Microorganismos co-inoculados

Los microorganismos empleadas en la investigación fueron *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y una mezcla de los tres microorganismos.

5.1.1. Obtención de Microorganismos

5.1.1.1. *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Los microorganismos *E.coli* y *S.aureus*, se aislaron de una muestra de 10 g de queso fresco, donde incubo a 42°C y 35°C en Petrifilm™3M™ Selective *E.coli* Count Plate y en Agar Baird Parker, respectivamente por 24 horas.

Posteriormente, se identificaron colonias azules con producción de gas en el Petrifilm™3M™ Selective *E.coli* Count Plate y se confirmó con la prueba indol en Agua Triptona (Anexo 1,2), evidenciando el anillo cereza, lo cual indica positivo para la presencia de *E.coli*. En cuanto a la identificación de *S.aureus*, se tomaron las colonias de color negro que presentaban una zona de hidrolisis alrededor de la misma en Agar Baird Parker (Anexo 1,2). Para las dos colonias se verifico su morfología con tinción de Gram. Posterior a la recuperación de estas dos cepas fueron conservadas en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) (Anexo1) bajo las condiciones de refrigeración.

5.1.1.2. *Listeria monocytogenes*

Se empleó la cepa *L. monocytogenes* suministrado por el Laboratorio de Microbiología Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana. Se sembró en medio Ottaviani and Agosti (ALOA) (Anexo 2) para identificar la presencia de *L. monocytogenes*, se seleccionó la colonia de color un azul-verde rodeada por un halo de opaco. Identificándose también con su morfología en tinción de Gram (Anexo 1) y estas características fueron contrastados con el crecimiento de una cepa ATCC 19115.

5.1.2. Preparación del inóculo

Para cada cepa patógena se incubó en caldo tripticasa de soya (TSAYE caldo) (Anexo 1) a una concentración de 10^8 ufc/mL, ajustadas según la escala de patrón 5 de Mc Farland y posteriormente se realizó una mezcla de los tres microorganismos, luego se verificó su concentración por recuento en placa en agar PlateCount (Anexo1), lo cual se evidenciaron concentraciones para *L. monocytogenes* de 3.8×10^8 UFC/mL, *S.aureus* de 4.1×10^6 UFC/mL, *E.coli* 1.6×10^8 UFC/mL y la Mezcla de los tres microorganismos 1.6×10^8 UFC/mL.

5.2. Recolección de las Muestras

La recolección de las muestras iniciales se realizaron en la planta de Alpina productos alimenticios S.A., donde se determinaron cuatro etapas claves en la elaboración del queso Emmenthal (Leche cruda, Leche termizada, coagulación final y prensado inicial), estas etapas se escogieron debido a que son puntos de control específicos, en donde se presenta una diferencia de la composición de la materia, concentración en carga microbiana, aspectos como el pH y la temperatura que varían.

De esta forma, para las muestras recolectadas de leche cruda sin tratar y leche termizada, se hicieron por triplicado y se recolectaron en frascos Schott para cada tipo de leche; en cuanto a las muestras de la etapa de coagulación final y prensado inicial se recolectaron por triplicado en bolsas Stomacher Standard (Figura 3).



Figura 3. Etapa de fabricación del queso Emmenthal en planta.

(A) y (B) Recolección de Leche Cruda, (C) Leche termizada, (D) Inicio etapa prensado Inicial, (E) Moldeado, (F) Adaptación de tamaño escala de 5 tortas de queso, (G) Prensado Inicial y (H) Etapa de salado.

Fuente: Autor

Es importante mencionar que para finalidades de esta investigación en la etapa de fabricación, la empresa adaptó a tamaño escala, 5 tortas de queso Emmenthal de aproximadamente 4Kg cada una (cuatro para emplearlos en los tratamientos con los microorganismos co-inoculados y uno para control), de los cuales después de 48 horas, posterior al haber sido sometidos en el proceso de prensado final, moldeado y salado, se trasladaron las 5 tortas de quesos al Laboratorio de Microbiología Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana en donde por 75 días se adaptaron sus condiciones de maduración bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (Anexo 1).

5.3. Co-Inoculación con Microorganismos

Para los cuatro tratamientos del presente estudio, se preparó los inóculos de *E. coli* (T1), *S.aureus* (T2), *L.monocytogenes* (T3) y la mezcla (T4) con sus concentraciones respectivas, procediendo así a inocularlos en los quesos con un volumen de 6 mL empleando una aguja de Wintrobe, mediante una distribución homogénea de 25 perforaciones en la superficie de cada area de los quesos (Figura 4).

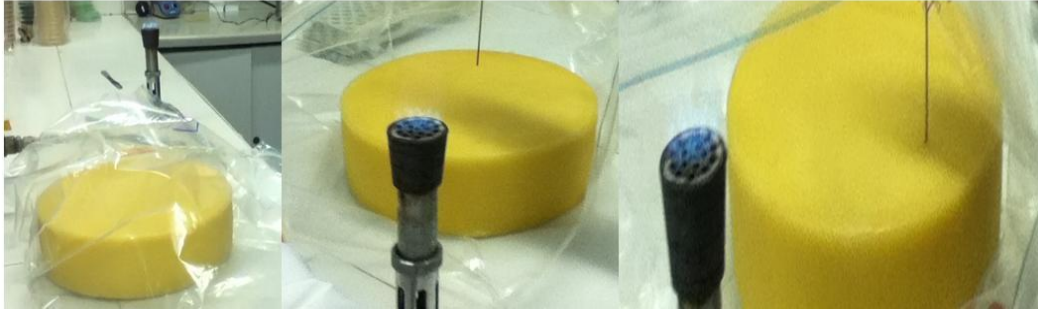


Figura 4. Secuencia de Etapa de co-inoculación con microorganismos en Queso Emmenthal. Fuente: Autor

5.4. Condiciones de Cuartos de Maduración

La etapa de maduración del queso Emmenthal fue de 75 días, donde se dividieron en tres sub-etapas, la primera correspondió al cuarto ambiente donde estuvo 30 días, controlando la temperatura (T) entre 10-13°C y la humedad relativa (HR) a 75-85%, posteriormente se pasó al cuarto caliente donde permaneció 29 días a T de 23-25°C y HR 75-80%, finalmente se pasó al cuarto frío donde permaneció 16 días a T de 0-8°C y HR de 70-75% (Figura 5). La temperatura y la humedad relativa se midieron con un termohigrómetro, además la humedad en el cuarto caliente se controló con un humidificador (Anexo 1).

Durante todos los días de la maduración se voltearon los quesos y la madera limpiándolos, también se verificaba que los orificios realizados en la toma de muestras estaban recubiertos con Mowilith, el cual fue suministrado por la empresa para evitar el crecimiento de microorganismos no deseados.



Figura 5. Cuartos de Maduración. (A) Cuarto Frío, (B) Cuarto Caliente y (C) Cuarto Frío

Fuente: Autor

5.5. Análisis microbiológico

5.5.1. Preparación de la Muestra

Para los cuatro quesos que presentan el tratamiento de los co-inoculados y el queso control (sin tratamiento), se tomaron aleatoriamente de cada area de los quesos cinco repeticiones de muestra en promedio de 2.2 g con un sacabocados, posterior de haber sacado la muestra, se recubría el orificio con Mowilith, luego a las muestras se les midió el pH, se homogenizaron en un Stomacher por 15 segundos a baja velocidad por *Slow*, para posteriormente realizar diluciones seriadas en base 1:10 (Anexo 1). Este procedimiento se realizó cada cinco días durante 75 días, los cuales corresponden al tiempo de maduración del queso Emmenthal.

5.5.2. Métodos de análisis microbiológicos para evaluar la viabilidad del cultivo iniciador y

Propionibacterium freudenreichii subesp. shermanii

Para cada muestra tomada de los cinco quesos evaluados, a partir de la etapa de inicio de maduración hasta el día 75 de maduración, se determinó la viabilidad de las BAL (*L. helveticus* y *S. thermophilus*) y *P. freudenreichii subesp. shermanii*, empleando la técnica de recuento de bacterias, mediante gotas sobre agar reportada por Sharpe y Kilsby en 1971. Esta técnica se empleó para las BAL en agar MRS (Anexo 2) con incubación a 30°C por 24 horas y para *P. freudenreichii subesp. shermanii*, se empleó el agar M-17 + 0.05% de Tween® 80 (polisorbato) (Anexo 2), con incubación en condiciones de microaerofilia a 30°C por 24 horas (Wuet *al.*, 2012) (Anexo 1).

5.5.3. Método de análisis microbiológicos para evaluar la viabilidad de los microorganismos co-inoculados

Se realizaron diferentes métodos de análisis microbiológicos a partir de la etapa de inicio de maduración hasta el día 75 de maduración, en donde para cada queso co-inoculado con el determinado microorganismo, se realizó un procedimiento de análisis diferente. De este modo, para el queso co-inoculado con *L. monocytogenes* se implementó el protocolo establecido por la norma ISO 11290-2:2004, el cual corresponde al procedimiento de enumeración *Listeria monocytogenes* en alimentos, empleando el medio Ottaviani and Agosti (ALOA); para el queso co-inoculado con *E. coli* se implementó el protocolo establecido en la NTC 4458:2007, donde se determina un método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli*, para esta técnica se empleó el medio Chromocult; para el queso co-inoculado con *S. aureus* se implementó el protocolo de la ISO 6888-1:2000, basado en un método horizontal para el recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa-positivos, mediante el empleo del medio agar de Baird-Parker; para el queso co-inoculado con la mezcla de los tres microorganismos se implementó el protocolo de la norma ISO 4833:2003, el que especifica un método horizontal para el recuento de microorganismos, por recuento de las colonias que crecen en un medio sólido después de la incubación aeróbica a 30°C y para el queso control se emplearon todos los protocolos de los microorganismos (Anexo 1).

5.6. Análisis Estadístico

Para el estudio se planteó como hipótesis que el crecimiento de los microorganismos co-inoculados disminuye al menos una unidad logarítmica, influenciados por el cultivo iniciador y secundario durante el proceso de maduración del queso Emmenthal. La variable respuesta fue la viabilidad del cultivo iniciador y secundario y el comportamiento de la disminución de la viabilidad de los microorganismos co-inoculados. Los datos se analizaron estadísticamente con el programa IBM® SPSS® Statistics 19 con una prueba de normalidad y homogeneidad, demostrando que los datos no presentaron una distribución normal, ni homogénea. Por lo tanto, estos datos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, con un nivel de significancia de $p \geq 0.05$, indicando que las muestras analizadas presentaron diferencias significativas. Con base en lo anterior, se realizó una prueba de comparación T multivariado, con un nivel de significancia de 0.05 (Anexo 3 y 4).

5.7. Revisión bibliográfica de la aplicación de *Propionibacterium freudenreichii* de la industria de quesos en su impacto en el sistema digestivo

Se diseñó un estudio transversal descriptivo de la revisión de la literatura científica, tomando como muestras de análisis 97 artículos de investigación original y revisión que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión: primero, publicación en revistas indexadas en bases de datos como ISI Web of Science, Scopus, ScienceDirect, Medline y EBSCO host; segundo, año de publicación entre 1999 - 2014 y por último, idioma de presentación inglés o español. Se excluyeron los artículos que no cumplieron con las anteriores características. Se elaboró una matriz para la organización y administración de los artículos teniendo como criterios de clasificación: año, autores, revista, título, palabras claves, resumen, resultados, discusión y conclusiones.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Determinación de la viabilidad de microorganismos, cultivo iniciador y secundario en etapa de producción en planta

Según la Figura 6, representa la viabilidad de cada uno de los microorganismos analizados en las cuatro etapas claves en la elaboración del queso Emmenthal y en el inicio de maduración (Anexo 3).

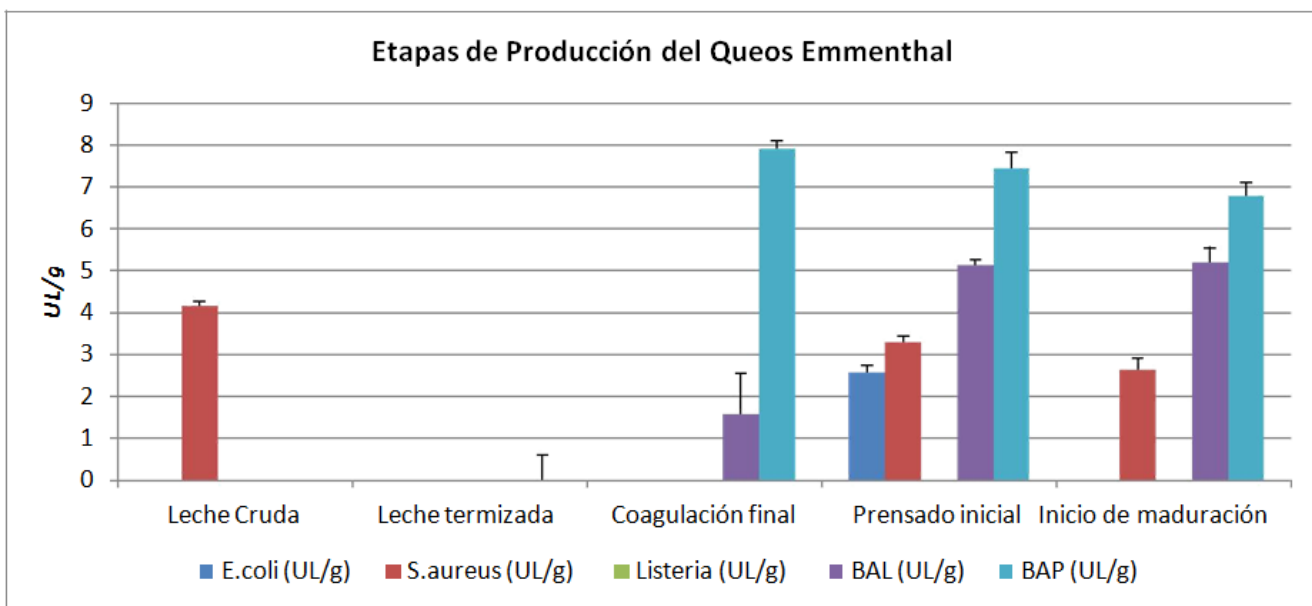


Figura 6. Viabilidad de microorganismos, cultivo iniciador y secundario en etapas de producción del queso Emmenthal.

Se puede observar, que se evidenció la presencia de *S.aureus* de 4.16 ± 0.08 unidades logarítmicas gramo (UL/g) en muestra de leche cruda; según Demarigny *et al* en 1997, afirma que es un microorganismo que con frecuencia se presenta en este tipo de muestra, sin embargo en la etapa de termización se demostró que este tratamiento térmico, modificó la calidad microbiológica de la leche, “mejorándola” respecto a la reducción de los posibles agentes contaminantes analizados (*L. monocytogenes*, *S.aureus* y *E. coli*). Para la etapa de coagulación final es de esperarse la presencia del cultivo iniciador (*L. helveticus* y *S. thermophilus*) y del cultivo secundario (*P.freudenreichii subesp. shermanii*), los cuales se encontraron en 5.1 ± 0.33 y 7.4 ± 0.34 UL/g respectivamente, siendo estos microorganismos titulares en la producción del queso tipo suizo Emmenthal (Michalski *et al.*, 2007; Gagnaire *et al.*, 2011).

En cuanto la etapa de prensado inicial se halló la presencia de *E.coli* y *S.aureus* a 2.4 ± 0.32 y 3.3 ± 0.13 UL/g respectivamente, muy probablemente por el empleo de las telas usadas para el desuerado o el utensilio empleado para el moldeado del queso, razón por la cual en estas etapas de producción es muy importante el desarrollo de correctas prácticas de higiene, como los procesos de limpieza y desinfección.

Finalmente para la etapa de inicio de maduración la concentración del cultivo iniciador y cultivo secundario fue 5.19 ± 0.33 y 6.8 ± 0.29 UL/g respectivamente, las cuales fueron las concentraciones de partida para la maduración del queso Emmenthal, además es importante mencionar que para esta etapa se encontró un recuento inicial de la presencia de *S.aureus* de 2.63 ± 0.25 UL/g y la ausencia de *E.coli* y *L.monocytogenes*.

6.2. Determinación de la viabilidad del cultivo iniciador durante el proceso de maduración del queso Emmenthal.

Para los cuatro tratamientos y el control, fue determinada la viabilidad de *L.helveticus* y *S.thermophilus* como BAL en recuento en placa empleando la técnica de microgota el medio MRS (Anexo 1), el cual se utilizó porque son microorganismos fermentadores de lactosa, siendo este el medio apropiado para su crecimiento, donde se ha reportado el empleo de este medio en diferentes estudios, los cuales han garantizado una alta recuperación de BAL para análisis microbiológicos (White *et al.*, 2003; Gutierrez *et al.*, 2005; Ashraf *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Sikorska *et al.*, 2013).

A continuación en la Tabla 1 presenta la estadística descriptiva del comportamiento de *L.helveticus* y *S.thermophilus*, durante las tres etapas de maduración, para los cuatro tratamientos y el control en el queso Emmenthal.

Etapas de Maduración	Cuarto Ambiente día 1 al 25				Cuarto Caliente día 30 al 55				Cuarto Frío día 60 al 75			
	Media**	Intervalo de confianza del 95%		Sig.*	Media**	Intervalo de confianza del 95%		Sig.*	Media**	Intervalo de confianza del 95%		Sig.*
Ensayos	UL/g	L.I	L.S	p	UL/g	L.I	L.S	p	UL/g	L.I	L.S	P
Control	6,9±1,11	6,5	7,4	0,419	8,2±0,16	8,2	8,3	0,024	8,1±0,23	8,0	8,2	0,001
Tratamiento 1	7,3±0,51	7,2	7,6	0,061	7,9±0,43	7,7	8,1	0,07	8,6±0,47	8,1	8,4	0,176
Tratamiento 2	7,2±0,68	7,2	7,6	0,061	7,6±0,73	7,3	7,9	0,06	8,3±0,43	8,2	8,5	0,02
Tratamiento 3	7,2±1,34	6,7	7,8	0,051	7,7±0,47	7,6	7,9	0,381	9,0±0,33	8,8	9,1	0,073
Tratamiento 4	7,3±1,09	6,9	7,7	0,058	8,3±0,59	8,2	8,6	0,005	8,3±0,59	8,2	8,6	0,038

*La diferencia entre las medias es significativa al nivel 0.05 **Promedio de los seis muestreos

Con base en lo anterior, en la primera etapa de maduración la temperatura oscilo entre 10.6-14.3°C y la humedad relativa entre 46.2-64.3%, además se evidenció que la concentración media de los cuatro tratamientos fue de 7.2±0.91 UL/g, considerándose mayor frente al control, además según la prueba de comparación T multivariado se presenta diferencias significativas con un nivel de significancia de $p>0.05$ (Anexo 3 y 4).

En esta etapa de maduración, es importante mencionar que se presenta una utilización completa de la fuente de carbono, empleado la ruta de Embden Meyerhof, donde la enzima β -galactosidasa hidroliza la lactosa perteneciente de estos microorganismos, para así producir ácido láctico (Wouters *et al.*, 2002; Thierry *et al.*, 2004), donde posteriormente estos subproductos serán utilizados como arranque para el cultivo secundario.

En la segunda etapa de maduración, correspondió al cuarto caliente, donde la temperatura oscilo entre 16.4-21.8°C y la humedad relativa entre 46.2-64.3%, se evidencio que la concentración media de los cuatro tratamientos fue de 7.8±0.56UL/g y el control de 8,2±0,16UL/g, aumentando 0.6y 1.3 UL/g con respecto a la etapa anterior, del mismo modo se observa que presenta diferencias significativas con un nivel de significancia de $p>0.05$ (Anexo 3y4).

Durante el período de maduración se observó, la generación de un aroma fuerte ácido, característico de los quesos madurados, esta cualidad se empezó a evidenciar después que pasó a la etapa de cuarto caliente, hasta el final de

la etapa de maduración, además se evidenció cambios en la textura del queso, haciéndose más esponjoso y ensanchándose hacia los lados, se evidencio además una sustancia grasosa que se originaba en la superficie del queso (Figura 7), estas dos últimas características ocurrieron después de haber cambiado al cuarto frío de maduración.



Figura 7. Cambios en la apariencia del queso. (A) Inicio de maduración (B) Hinchamiento y (C) Secreción de sustancia grasosaFuente: Autor

De acuerdo con lo anterior, se ha reportado por literatura que durante la maduración del queso, se generan una serie de reacciones bioquímicas, que conducen a la formación del aroma del queso y su sabor. Estos compuestos se pueden producir a partir de la lactosa, lípidos y proteínas (Beresford *et al.*, 2001; Leroy *et al.*, 2004). Para el cultivo iniciador (*L.helveticus* y *S.thermophilus*), hidroliza la lactosa para producir galactosa y glucosa, esta última se oxida a piruvato y luego pasa a la vía de Emden Meyerhof, se desarrolla el proceso de glicolisis, en cuanto la conversión de la galactosa, *L.helveticus*, la hidroliza a través de la vía de Leloir convirtiéndola a glucosa-6-P, donde luego se incorpora también a la vía de Emden Meyerhof (Marilley *et al.*, 2004). Esta ruta posee una ventaja al ser competitiva frente a otros microorganismos que no utilicen la lactosa como fuente de carbono, porque al ser metabolizado este sustrato genera la energía necesaria para el rápido crecimiento y también ayuda en el mantenimiento del pH intracelular, mientras que en el medio se ejerce rápida acidificación e inactiva cualquier otro microorganismo que sea incapaz de metabolizar este sustrato, esta inhibición se debe principalmente a los metabolitos producidos (Hugenholtz *et al.* 1999; Wouters *et al.*, 2002; Leroy *et al.*, 2004).

De este modo, se puede diferir que la interacción entre estas dos cepas empleadas, es de tipo sinérgica, pues el desarrollo de *L.helveticus*, favorece el crecimiento de *S.thermophilus* y viceversa. De acuerdo a la afirmación anterior se ha reportado que *L.helveticus* durante el proceso de proteólisis, produce en su pared celular la proteinasa *PrpP*, y la peptidasa *PepX*, la cual activa procesos de degradación de proteínas a péptidos y posteriormente a aminoácidos libres, este último paso es el resultado en conjunto de peptidasas intracelulares que actúan de forma específica, la liberación de estos aminoácidos promueven al crecimiento de *S.thermophilus*. El resultado de la proteólisis y la conversión de péptidos a aminoácidos libres mediados por enzimas específicas, confieren un proceso esencial en la formación del sabor, en especial en el queso durante el proceso de maduración, en donde en esta etapa ocurren el desarrollo intenso del sabor característico del queso (Hugenholtz *et al.* 1999; Leroy *et al.*, 2004; Van Hylckama *et al.*, 2007). En cuanto a *S.thermophilus* se ha demostrado también su actividad hidrolítica, reportándose con frecuencia como principal motor en el arranque de la acidificación inicial a metabolizar lactosa a ácido pirúvico y láctico, siendo estos compuestos los que estimulan al crecimiento de *L.helveticus* (White *et al.*, 2003; Thierry *et al.*, 2004; Lortal *et al.*, 2004).

De igual forma, en ésta etapa y aun al finalizar el proceso de maduración se desarrolla el proceso de lipólisis, pues al haberse agotado las concentraciones de los sustratos de carbono y nitrógeno, los microorganismos del cultivo iniciador y aun en mayor medida el cultivo secundario, toman los glóbulos de grasa como fuente de energía, para ser hidrolizados por lipasas a ácidos grasos de cadena corta y de cadena intermedia, estos ácidos grasos libres son sustratos de reacciones enzimáticas que producen sabores, como metil-cetonas, alcoholes secundarios y ésteres

tales como, acetato, butanoato, hexanoato de etilo, acetato de etilo, octanoato de etilo, ácido butírico y hexanoato de metilo (Mcsweeney *et al.*, 2000; Marilleyet *al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2012).

Finalmente, para la etapa de maduración de cuarto frío la temperatura oscilo entre 9.2-12.5°C y la humedad relativa entre 41.2-65.2%, además se evidenció que la concentración media de los cuatro tratamientos fue de 8.5 ± 0.46 UL/g, considerándose mayor frente al control, se presentó diferencias significativas para los tratamientos 1,3 y 4 con un nivel de significancia de $p > 0.05$ (Anexo 3y4).

Según Wouterset al en el 2002 y Beresford et al en el 2001, describieron que las BAL en las primeras etapas de la fabricación del queso, pueden alcanzar hasta 10^9 UFC/g y durante la maduración puede disminuir con rapidez a 10^6 UFC/g.

Este comportamiento similar se evidenció para los cuatro tratamientos con los co-inoculados y respecto al control en la Figura 8, se puede observar una tendencia de crecimiento similar a razón del tiempo de maduración y su interacción sobre las variables temperatura y humedad relativa, obteniendo una concentración media final de 8.46 ± 0.41 UL/g para los cinco quesos.

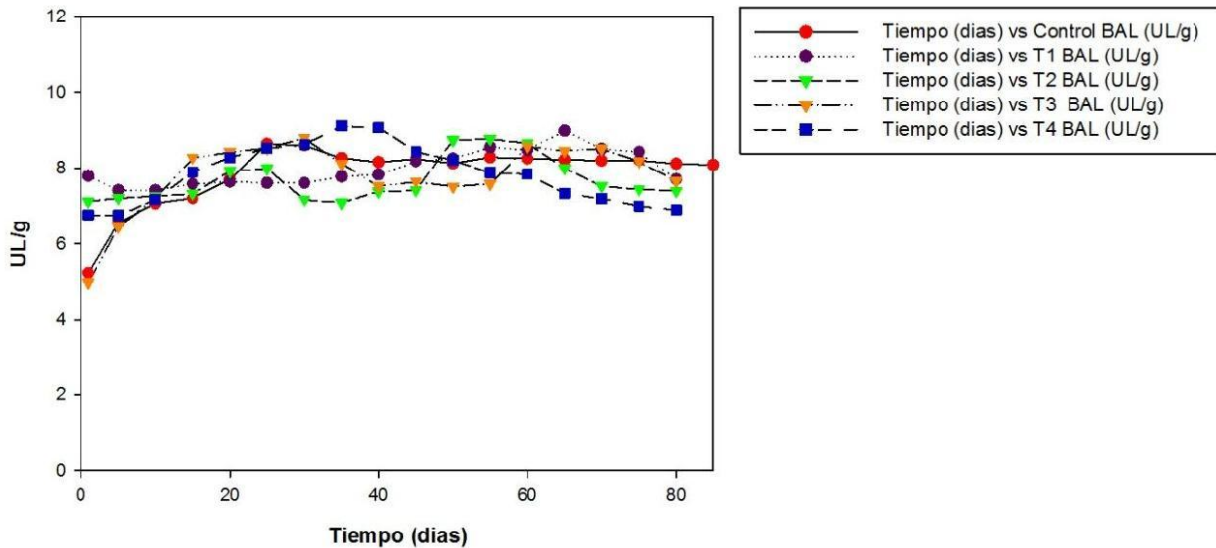


Figura 8. Grafica de la viabilidad de *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus thermophilus* durante el proceso de maduración del queso Emmenthal

6.3. Determinación de la viabilidad de *Propionibacterium freudenreichii* subesp. *shermanii* durante el proceso de maduración del queso Emmenthal.

La viabilidad de *P. freudenreichii* subesp. *shermanii* se determinó mediante el recuento en placa por la técnica de microgota empleando el medio M-17 + 0.05% de Tween®80 (Anexo 2), ya que ensayos previos realizados en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana, se determinó que al adicionarle a este medio 0.05% de Tween®80 se reduce la tensión superficial, disminuyendo las concentraciones de oxígeno y creando así las condiciones óptimas de microaerofilia para el crecimiento de este microorganismo. Además, mediante la identificación macroscópica de las colonias se hallaron características diferenciales en su crecimiento, así como en su caracterización microscópica (Anexo 1). El comportamiento de *P. freudenreichii* subesp. *shermanii* se presenta en la Tabla 2, donde se detalla la estadística descriptiva de las tres etapas de maduración para los cuatro tratamientos y el control en el queso Emmenthal.

Tabla 2. Estadística descriptiva de la viabilidad de *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* durante el proceso de maduración del queso Emmenthal

Etapas de Maduración	Cuarto Ambiente día 1 al 25				Cuarto Caliente día 30 al 55				Cuarto Frio día 60 al 75			
	Media**	Intervalo de confianza del 95%		Sig.*	Media**	Intervalo de confianza del 95%		Sig.*	Media**	Intervalo de confianza del 95%		Sig.*
Ensayos	Log (UFC/g)	L.I	L.S	p	Log (UFC/g)	L.I	L.S	p	Log (UFC/g)	L.I	L.S	p
Control	8,6±1,39	8,1	9,1	0,006	9,28±0,18	9,0	9,5	0,292	9,3±0,42	9,2	9,5	0,227
Tratamiento 1	9,1±0,43	8,9	9,2	0,007	8,6±0,29	8,5	8,7	0,327	8,6±0,47	8,4	8,8	0,001
Tratamiento 2	8,5±0,37	8,1	8,9	0,003	8,7±0,57	8,5	9,0	0,053	8,3±0,43	8,2	8,5	0,176
Tratamiento 3	8,8±0,63	8,6	9,1	0,003	8,4±0,56	8,2	8,7	0,075	9,1±0,33	8,8	9,1	0,021
Tratamiento 4	8,3±1,14	7,9	8,7	0,194	9,8±0,43	9,7	9,9	0,044	9,6±0,83	9,3	10,1	0,073

*La diferencia entre las medias es significativa al nivel 0.05 **Promedio de los seis muestreos

Este comportamiento similar se evidencio con relación a las cuatro cinéticas de crecimiento de *P.freudenreichii subsp. shermanii* en los tratamientos respecto al control, en la Figura 9 se puede observar una tendencia de crecimiento similar a razón del tiempo de maduración y su interacción sobre las variables temperatura y humedad relativa.

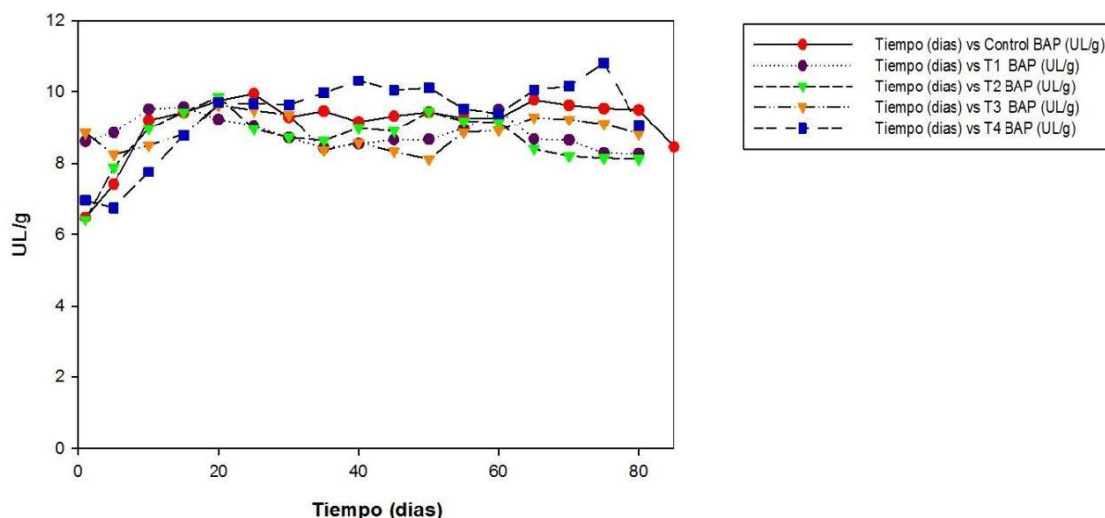


Figura 9. Grafica de viabilidad de *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* durante el proceso de maduración del queso Emmenthal

Con base en lo anterior, en la primera etapa de maduración, se evidencio que la concentración media de los cuatro tratamientos fue de 8.7 ± 0.64 UL/g similar al control, además según la prueba de comparación de T multivariado de los tratamientos con respecto al control se presentaron diferencias significativas con un nivel de significancia de $p > 0.05$ (Anexo 4).

En esta etapa de maduración *P.freudenreichii subsp. shermanii*, toma subproductos producidos por el cultivo iniciador para su óptimo crecimiento, como el D y L-lactato como fuente de energía y el aspartato como aceptor de electrones y lo convierte a succinato para luego producir propionato, acetato y CO₂, mediante la vía de Wood-Werkman (3 mol lactato → 2 mol propionato + 1 mol acetato + 1 mol CO₂ + 1 mol ATP) y la fermentación del aspartato (3 mol lactato + 6 mol aspartato → 3 mol acetato + 3 mol CO₂ + 6 mol succinato + 6 mol NH₃ + 3 mol ATP), durante la etapa de maduración (Wood *et al.*, 1981; Crow *et al.*, 1987; Frohlich *et al.*, 2002; White *et al.*, 2003;

Thierry *et al.*, 2004). Además, la presencia de amonio como fuente de nitrógeno, derivado de la hidrólisis primaria de la caseína ejercida por el cultivo iniciador, es de gran importancia para el crecimiento de *P.freudenreichii* subesp. *shermanii* (Baer *et al.*, 1995; Piveteau *et al.* 2002).

Para la segunda etapa de maduración, se evidenció una concentración media en $8.8 \pm 0.46 \text{ UL/g}$ para los cuatro tratamientos, siendo inferior en 0.4 UL/g con respecto al control, presentando diferencias significativas con un nivel de significancia de $p > 0.05$, para la prueba de comparación T multivariado (Anexo 4).

En ésta etapa, también se comprobó una adaptación en el crecimiento para los cuatro tratamientos en el día 30 y 35 de maduración como se observa en la Figura 9 y posterior a ello se mostró un crecimiento exponencial por parte de *P.freudenreichii* subesp. *shermanii*, ya que la temperatura y humedad en esta etapa de maduración son factores que influyen en el desarrollo metabólico y de crecimiento de este microorganismo (Grappin *et al.*, 1999).

Con base en lo anterior, se evidenció la formación de los “ojos” característicos de este queso, originado por la producción de CO_2 en la fermentación de lactato para producir propionato, especialmente durante la etapa de maduración en el cuarto caliente, este hecho se observó a partir del día 35, en el momento de toma de muestras (Figura 10), hasta el día 75, final de la maduración.

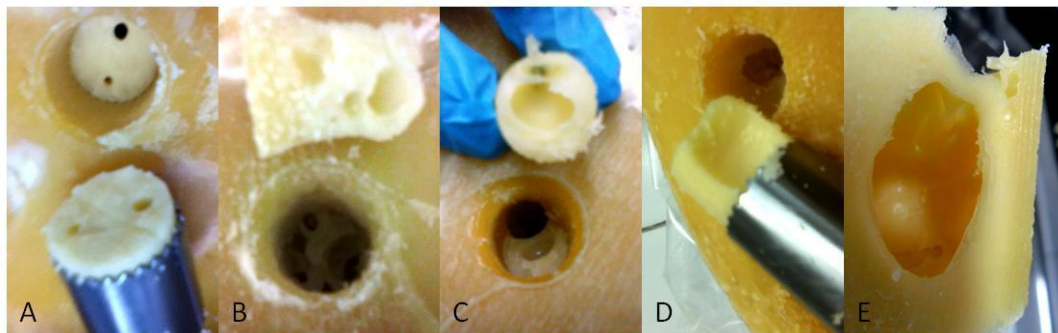


Figura 10. Desarrollo de los ojos característicos del Queso Emmenthal durante la etapa de maduración. (A) Día 35, (B) Día 45, (C) Día 55, (D) Día 65 y (E) Día 75 Fuente: Autor

Según Daly *et al.*, en el 2010, menciona que en la elaboración tradicional del queso Emmenthal, el inicio de la formación de estos ojos característicos ocurre a partir del día 20 al 30 de maduración, obteniendo la mayor producción aproximadamente en el día 50 y disminuyendo la aparición de ojos, a medida que se reduce la producción de CO_2 , la cual ocurre al paso del cuarto frío. Ya que la solubilidad del CO_2 es dependiente de la temperatura, el a_w y el pH, como consecuente al disminuir estos factores, decrece la solubilidad del CO_2 , considerándose como factores óptimos un pH de 6.5 a 7 y temperatura entre 25 a 35°C . Además el alto contenido de a_w y grasa aportan la elasticidad y textura blanda de la estructura del queso Emmenthal, así también la α_{s1} -caseína, la cual se considera la caseína primaria involucrada en el mantenimiento de la estructura elástica del queso y la que provee a la estructura de la proteína doblarse para dar cabida a la acumulación del CO_2 , contribuyendo estos factores a mantener la integridad del queso durante la formación del ojo en la etapa de maduración (Falentin *et al.*, 2010).

En la Figura 11, se observa la velocidad de producción de CO_2 , durante todas las etapas de maduración del queso Emmenthal, resaltando que el CO_2 producido por *P.freudenreichii* subesp. *shermanii*, el cual forma los ojos característicos del queso, se incrementa en la etapa de maduración del cuarto caliente, en cambio el CO_2 producido por las BAL como uno de los subproductos de su metabolismo, se ve distribuido homogéneamente durante la maduración del queso. El CO_2 producido por *P.freudenreichii* subesp. *shermanii* corresponde a $2/3$ del total de CO_2 producido en toda la etapa de maduración.

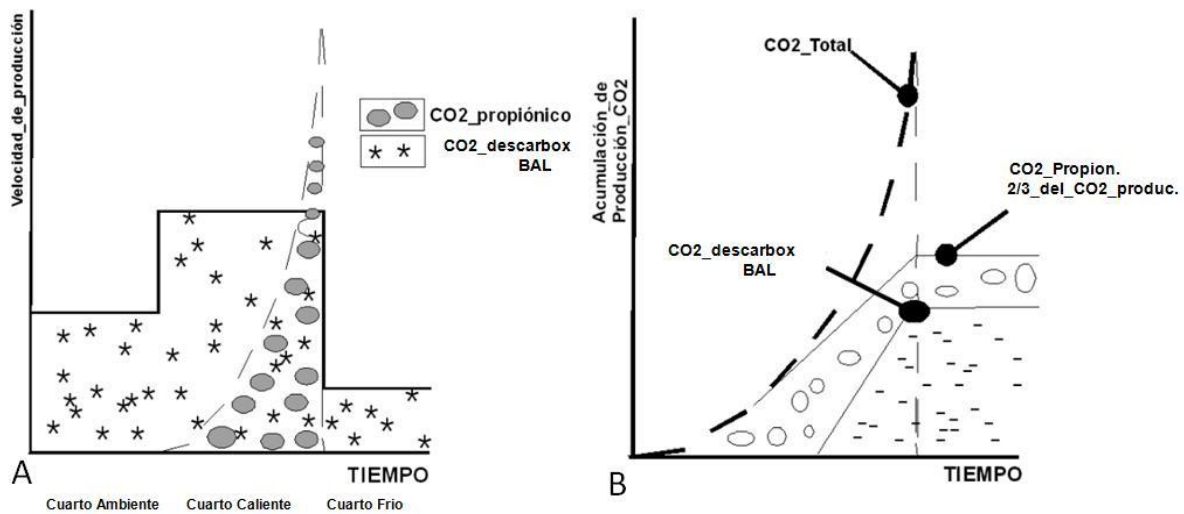


Figura 11. Producción de CO₂ en maduración del queso Emmenthal.

(A) Velocidad de producción de CO₂ y (B) Acumulación producción de CO₂ (Adaptado de: INTI, 2005)

Como se mencionó anteriormente, la humedad y la temperatura juegan un papel importante en el desarrollo del cambio de la textura y elasticidad el queso Emmenthal, este hecho va de la mano con los procesos metabólicos que ocurren en esta etapa, dos procesos como la lipólisis y proteólisis son los que intervienen en el desarrollo del intenso sabor y aroma característico del queso (Dherbécourt *et al.*, 2008). En cuanto a la lipólisis, se ha evaluado la capacidad de *P.freudenreichii* subesp. *shermanii* en la producción de compuestos de sabor, tales como ácidos grasos libres, originados a través de la lipólisis de los glóbulos de la grasa (Michalski *et al.*, 2004), resultando así ácidos de cadena corta, ramificada y de manera preponderante el ácido linoléicoconjugado (CLA), el cual este último proporciona efectos beneficiosos sobre la salud (Rainio *et al.*, 2002; Falentin *et al.*, 2010).

Además durante el proceso de la proteólisis realizada por esta bacteria, producen aminoácidos libres como consecuencia de procesos catabólicos mediados por reacciones como: desaminación, descarboxilación, desaminación oxidativa, transaminación y la eliminación. Sin embargo, sólo en la transaminación y eliminación inician la conversión de los aminoácidos de cadena ramificada y aminoácidos aromáticos, los cuales dan origen al aroma característico de este queso (Demarigny *et al.*, el 1997). En las etapas de desaminación y descarboxilación, el objetivo del catabolismo de los aminoácidos es la producción de amonio, donde se ha reportado que Asp, Ala, Ser, Arg, Val, Lys, Ile y Glu son los aminoácidos más degradados por este microorganismo, además se ha encontrado que para este último aminoácido *P.freudenreichii*, convierte el Glu al ácido γ -animobutírico y CO₂. Luego para el proceso de transaminación, las enzimas animotransferasas son expresadas donde degradan los aminoácidos sólo en la presencia de un aceptor del grupo amino como el ácido α -cetoglutárico (α -KG), donde posteriormente da la conversión a ácidos de cadena ramificada (Thierry *et al.*, el 2002). En primera instancia, cabe mencionar que *P.freudenreichii* produce tres ácidos ramificados de cadencorta, donde se presenta en su vía de biosíntesis el ácido 2-metil-butanoico, ácido 3-metil-butanoico (ácido isovalérico) y ácido 2-metil propanico, los cuales son producidos por el catabolismo de la isoleucina, leucina y valina, respectivamente (Thierry *et al.*, 2004a). En este proceso se pueden distinguir dos vías, la primera es oxidativa, a través de la descarboxilación de una cadena ramificada, mediante el complejo de la α -cetoácido deshidrogenasa, produciendo una cadena ramificada con acil-CoA, para luego ser convertida a ácido; la segunda vía, es no oxidativa en donde por descarboxilación del piruvato es producido aldehído, que posteriormente se puede convertir en ácido (Thierry *et al.*, el 2002).

De esta manera, este proceso de síntesis está estrechamente relacionado con la de los ácidos grasos de la membrana, ya que *P.freudenreichii* emplea una enzima con actividad lipolítica (esterasas), la cual es la responsable de la formación de ácidos grasos de cadena ramificada con metilo, donde posteriormente dos permeasas permiten

su transporte de leucina e isoleucina a la célula (Thierry *et al.*, 2005; Dherbécourt *et al.*, 2010; Falentin *et al.*, 2010; Thierry *et al.*, 2011). En estudios realizados determinaron que los componentes volátiles producidos por *P.freudenreichii* en el queso Emmenthal son ácidos carboxílicos de cadena corta (ácido acético, propanoico, butanoico, hexanoico e isovalérico), ésteres (derivados de ácido acético y propiónico) y algunas cetonas y alcoholes (Chamba *et al.*, 2002; Thierry *et al.*, el 2004b).

Finalmente, en la etapa de maduración de cuarto frío, se evidencia una concentración media para los tratamientos de 8.9 ± 0.52 UL/g siendo menor al control, el cual se encontró a $9,3\pm 0,42$ UL/g, así mismo se presentaron diferencias significativas con un nivel de significancia de $p>0.05$ para la prueba de comparación T multivariado (Anexo 4).

6.4. Determinación de la viabilidad de microorganismos co-inoculados durante el proceso de maduración del queso Emmenthal.

Se determinó la viabilidad de los microorganismos co-inoculados en los cuatro tratamientos, de acuerdo a los correspondientes protocolos establecidos para su recuento en placa. En la Figura 12, se observa la cinética de crecimiento de los microorganismos co-inoculados, el cultivo iniciador y secundario para cada tratamiento y el control durante el proceso de maduración del queso Emmenthal y su interacción sobre las variables temperatura y humedad relativa.

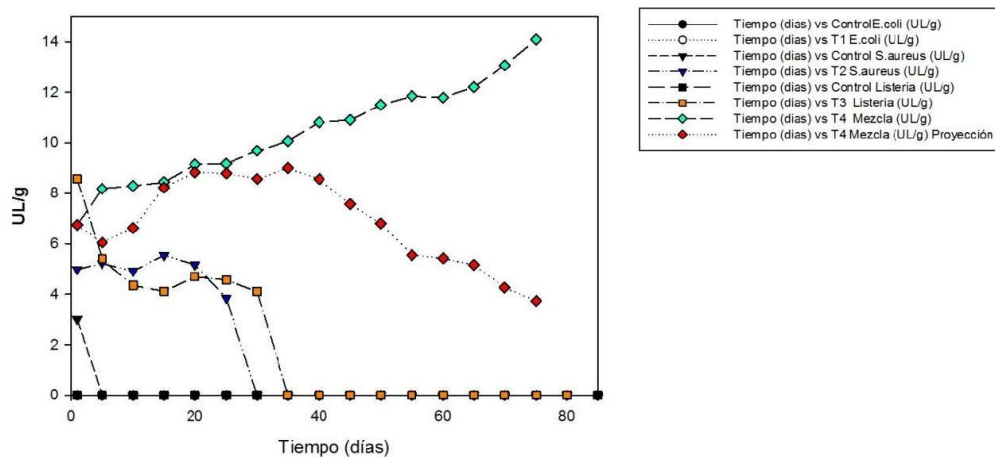


Figura 12. Gráfica de la viabilidad de microorganismos co-inoculados durante el proceso de maduración del queso Emmenthal

Con base en lo anterior, se presenta en la Tabla 3 la estadística descriptiva del comportamiento de los microorganismos co-inoculados, durante las tres etapas de maduración para los cuatro tratamientos y control en el queso Emmenthal.

Tabla 3. Estadística descriptiva de la viabilidad de patógenos co-inoculados durante el proceso de maduración del queso Emmenthal								
Etapas de Maduración	Cuarto Ambiente día 1 al 25				Cuarto Caliente día 30 al 55			
	Media**	Intervalo de confianza del 95%		Sig.*	Media**	Intervalo de confianza del 95%		Sig.*
Ensayos	Log (UFC/g)	L.I	L.S	p	Log (UFC/g)	L.I	L.S	p
Control (<i>E.coli</i>)	0	0,0	0,0	.	0	0	0	.
Control (<i>S.aureus</i>)	$0,2\pm 0,44$	0,0	0,3	0,001	0	0	0	.

Control (<i>Listeria</i>)	0	0,0	0,0	.	0	0	0	.
Tratamiento 1	0	0,0	0,0	.	0	0	0	.
Tratamiento 2	5,1±0,56	4,9	5,4	0,155	0	0	0	.
Tratamiento 3	4,8±1,02	4,4	5,2	0	0,67±1,5	0,1	1,25	0
Tratamiento 4	8,26±0,89	7,9	8,6	0,002	10,58±0,83	10,3	10,9	0,107

*La diferencia entre las medias es significativa al nivel 0.05 **Promedio de los seis muestreos

Se demostró que *E.coli* se inhibió 24 horas después de su inoculación, de modo que al inicio de maduración no se evidenció la presencia de este microorganismo, así mismo durante todo el proceso de maduración del queso Emmenthal, para el día 30 de maduración se halló una completa inhibición para *E.coli*, *S.aureus* y *L.monocytogenes* (reduciendo su viabilidad en 5.1±0.56 y 4,8±1,02 UL/g respectivamente para estos dos últimos patógenos). En cambio para el tratamiento mezcla se observó un crecimiento exponencial del mismo.

De acuerdo a lo anterior, se ha reportado que existen numerosas bacteriocinas producidas por las BAL, las cuales se consideran péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas y cada una tiene espectros de inhibición particulares, como el hecho de inhibir el crecimiento de microorganismos (Arqués *et al.*, 2005; Calderón *et al.*, 2007; Parra *et al.*, 2010). La producción de bacteriocinas está usualmente asociada con la fase de crecimiento de la cepa, y dicha producción cesa al final de la fase exponencial. Esto puede ser atribuido a la absorción de la bacteriocina por las células productoras o a la degradación de las mismas por proteasas (Joerger *et al.*, 2003), este hecho que se evidenció en el día 30 de maduración, correspondió al final de la fase de crecimiento exponencial.

Las bacteriocinas de las BAL poseen características esenciales para llevar a cabo su actividad antimicrobiana, independientemente del blanco celular. Estas incluyen una carga neta positiva, que favorece su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias gram negativas, como *E.coli* actúan como agentes quelantes y alta presión hidrostática causa lesión que destruye su membrana celular, este hecho permite la entrada de las bacteriocinas a la célula y obtener un efecto antibacterial satisfactorio (Mufandaedza *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2008).

Además, las bacteriocinas también pueden influir en la carga negativa de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias gram positivas, siendo la hidrofobicidad una característica requerida para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular (López *et al.*, 2008).

Como modo de acción al parecer, los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos que resultan en la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), ocasionando la pérdida de la fuerza motriz de protones, salida de ATP y aminoácidos. La fuerza motriz de protones juega un papel central en la síntesis de ATP, en el transporte activo y el movimiento bacteriano, por lo tanto, se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular (Bruno *et al.*, 1993; López *et al.*, 2008).

Se ha reportado que *L.helveticus* produce una bacteriocina con actividad antibacterial denominada helveticina, por lo que se clasifica de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas en clase III, correspondiendo a péptidos grandes mayores de 30 kDa y termolábiles (Avila *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2013), se ha reportado la acción inhibitoria de esta bacteriocina contra patógenos de la especie *E.coli* y *L.monocytogenes* (Gutierrez *et al.*, 2005). En cuanto a *S.thermophilus*, se ha reportado la acción de la Termofilina como bacteriocina característica de esta cepa, la cual ejerce una acción inhibitoria frente a patógenos como *S.aureus* y *L.monocytogenes* (Rossi *et al.*, 2013), según estudios se ha caracterizado genéticamente diferentes tipos de esta bacteriocina, como: *Thermophilin110* (Gilbreth *et al.*, 2005), *Thermophilin1277* (Kabuki *et al.*, 2007), *ThermophilinT* (Aktypis *et al.*, 2007) y *Thermophilin 9* (Fontaine *et al.*, 2008).

También, se ha reportado que *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* presenta una actividad antimicrobiana frente a patógenos (Gautier *et al.*, 1999); en un estudio *in vitro*, realizado por Gwiazdowska et al en el 2006, cuyo objetivo fue el aislamiento y la purificación parcial de las bacteriocinas de *P. freudenreichii* subesp *freudenreichii* y *P. freudenreichii* subesp.*shermanii* y la determinación de su actividad antimicrobiana junto a su estabilidad. Encontraron bacteriocinas, como Ácidofilina 801 y Propionicina PLG-1 que inhiben el crecimiento de bacterias gram positivas como, *C.jejuni*, *E.coli*, *Y.enterocolitica*, *P.fluorescens*, *P.aeruginosa* y *V.parahaemolyticus*, y la Ácidocina CH5 inhibiendo el crecimiento de hongos tales como *A.ventii*, *A.curvatum*, *F.tricinatum*, *P.gregata* y levaduras como *Candida* y *Saccharomyces*; estas bacteriocinas también fueron referenciadas en un estudio realizado por Holo et al en el 2002, donde se determinó una estabilidad de estas bacteriocinas a pH 4.5 a 7.0 en presencia de solventes como etanol, isopropanol y hexano. Con base en lo anterior, se puede decir que el cultivo iniciador y secundario ejerce un efecto controlador para la inhibición de cepas como *E.coli*, *S.ureus* y *L.monocytogenes*, evidenciado en el presente estudio.

De otra parte, se observó en la Figura 12, un crecimiento exponencial de los co-inoculados para el tratamiento del queso mezcla, este resultado no era esperado porque en relación a los otros tratamientos, se evidenció una inhibición de estos microorganismos para el día 30 de maduración, de esta manera se podría suponer que el medio Plate Count empleado para el recuento en placa, determinó el recuento total de bacterias presentes en el queso, incluyendo a las lácticas. De esta manera se estimó para la concentración final de los microorganismos co-inoculados en el queso mezcla, la diferencia del promedio de las concentraciones finales del cultivo iniciador y secundario, lo cual se obtuvo 3.7 ± 0.34 UL/g, reduciendo de esta manera 3.1 ± 0.89 UL/g con respecto a la concentración inicial del queso mezcla.

6.5. Crecimiento de Bacterias Ácido Lácticas en medios empleados para el recuento de microorganismos

Durante el desarrollo del estudio, se encontró el crecimiento de BAL en los medios específicos empleados para el recuento en placa de los co-inoculados (Anexo 1).

Se evidenció en los días 5 y 40 de la etapa de maduración, el recuento en el medio Chromocult, el crecimiento de colonias rojas grandes, las cuales se consideran características propias del crecimiento de los coliformes para este medio (Anexo 1). Sin embargo al momento de realizar la identificación en Gram se encontró bacilos gram positivos. De esta manera, se podría afirmar que *L.helveticus* posee la enzima β -galactosidasa la cual reaccionó con el Salmon-GAL, donde éste es un sustrato cromogénico del medio Chromocult.

Se ha reportado que ésta enzima β -galactosidasa, la produce *L.helveticus* en su metabolismo (Hashiba *et al.*, 1992; Murad *et al.*, 2011), además estudios demuestran también que *P. freudenreichii* posee ésta enzima en particular (Zarate *etal.*, 2000; Jan *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2005; Saraoui *et al.*, 2013).

Asimismo, se demostró que después del día 15 de la etapa de maduración, en el recuento del medio Ottaviani and Agosti (ALOA), hubo crecimiento de colonias verde azuladas, donde al identificarse morfológicamente con tinción en gram se encontró bacilos gram positivos. Para diferenciar las colonias de *L.helveticus*, del crecimiento de *L.monocytogenes*, se comprobó con un control, el cual determinó que después del día 30, *L.monocytogenes* no volvió a crecer, siendo este microorganismo inhibido completamente (Anexo 1).

De esta manera, se podría afirmar que *L. helveticus* posee la enzima β -glucosidasa, la cual le permite reaccionar con

el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranosido, este último es un sustrato cromógeno de medio Ottaviani and Agosti (ALOA), se ha reportado que *L. helveticus*, presenta la enzima β -glucosidasa (Malashree *et al.*,2012), en comparación a *S.thermophilus*, porque en un estudio realizado por Champagne et al en el 2010, pues quería evidenciar la desconjugación de isoflavonas de soja mediadas por *S.thermophilus* y *L.helveticus*, como resultados se obtuvo una reducción del 50% del total de los glucósidos por *L.helveticus* y comparación a *S.thermophilus*, que no se evidencio ningún efecto sobre los niveles de isoflavona.

Finalmente, durante el recuento en medio Baird Parker, se encontró el crecimiento de colonias grandes y pequeñas negras sin presencia de la zona opaca alrededor de estas, donde al identificarse en Gram se encontró cocos en cadena gram positivos, la cual no corresponde a las características de *S.aureus*. De esta manera se podría afirmar la presencia de *S.thermophilus*, debido que éste microorganismo posee la actividad de la telurito reductasa, porque condujo a la reducción deen de telurito de potasio a telurito metálico, evidenciándose en el crecimiento de colonias negras en este medio.

6.6. Revisión Bibliográfica

Aplicación de *Propionibacterium freudenreichii* en la Industria de Quesos y su Impacto como Probiótico en el sistema digestivo

6.6.1. ¿Qué es un Probiótico?

Un probiótico es definido como “un microorganismo vivo que, cuando es administrado en adecuadas cantidades, confiere beneficios para la salud del hospedero” (FAO/ WHO, 2001). Estos microorganismos vivosejercen al intestino importantes efectos fisiológicos, porque como característica principal debe sobrevivir a las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal, como pH, sales biliares, ácidos y temperaturas (Rodrigues *et al*, 2012), además deben ser ingeridos en cantidades suficientes (concentración de 10^7 a 10^9 UFC/g), para poder tener efectos beneficiosos, como contribuir al equilibrio de la microbiota intestinal del huésped por implantación o colonización y potenciar el sistema inmunitario (Rivera-Espinoza *et al.*, 2010).

Los requisitos de un microorganismo para ser considerado como probiótico, se puede ilustrar en la Figura 13. En primer lugar el microorganismo debe pertenecer a microbiota de origen humano, sobrevivir en el ecosistema intestinal de forma prolongada y estable, no conjugarse con sales biliares, tener la capacidad de adhesión y colonización a células epiteliales, no ser sensible a enzimas proteolíticas, en su metabolismo se puedan producir componentes antimicrobianos, no ser microorganismo, ser capaz de vivir en tránsito gástrico y poseer un efecto de Inmunoestimulación (Oliveira *et al.*,2007).

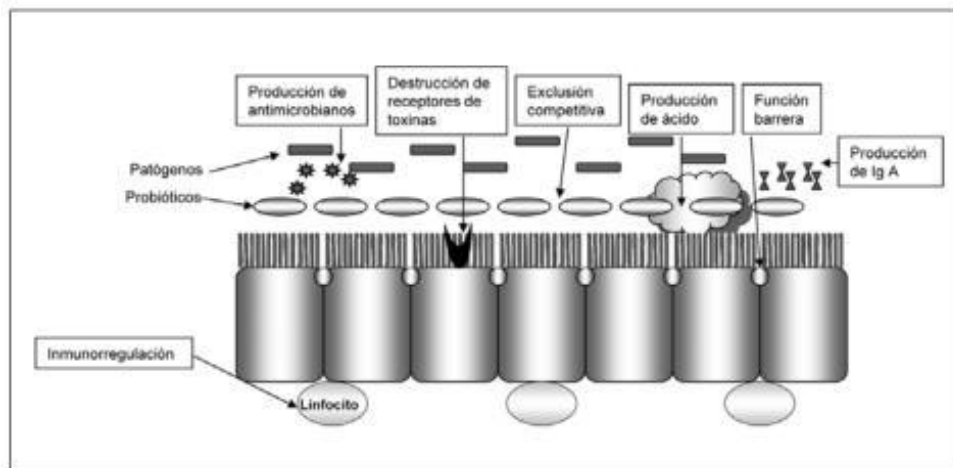


Figura 13. Mecanismo de actividad probiótica(Adaptado de Oliveira *et al.*,2007)

De acuerdo a lo nombrado anteriormente, en la Tabla 4 se ilustra como los microorganismos probióticos se pueden caracterizar presentando tres efectos principales(Oliveira *et al.*,2007).

Tabla 4. Efectos de los Probióticos		
Efectos metabólicos	Efectos protectores	Efectos tróficos
<ul style="list-style-type: none"> • Favorecen la absorción de agua y calcio. • Modulan el metabolismo lipídico. • Efecto masa: prevención y tratamiento del estreñimiento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Prevención de infecciones intestinales (diarrea aguda, crónica, por antibióticos). • Prevención de infecciones sistémicas debido a la traslocación bacteriana (pacientes graves). • Prevención de infecciones vaginales en parto prematuro. • Mejora de la esteatosis y la encefalopatía hepática. • Mejora de la tasa de erradicación de <i>Helicobacter pylori</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Prevención y control de la enfermedad inflamatoria intestinal. • Reducción del riesgo de cáncer colorrectal.
Fuente: Oliveira <i>et al.</i> , 2007		

6.6.2. Efecto sobre la salud

Hoy en día el estudio de los probióticos se ha centrado en su aplicación en formulaciones enterales inmunomoduladoras para la recuperación del estado nutricional de pacientes críticos y disminución en la estancia hospitalaria (ASPEN, 2009). De este modo, es posible encontrar como principales probióticos empleados en estudios clínicos a especies del género *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Streptococcus spp* *Enterococcus spp* (Oliveira *et al.*, 2007).

Es importante mencionar que los efectos de mejora de la salud dependen de la cepa presente en la formulación del producto, y que no hay una cepa probiótica que simultáneamente sea la que proporcione todos los beneficios anteriormente reportados (Shah *et al.*, 2007).

Por lo tanto, los estudios sobre cepas probióticas y su evaluación del potencial de promotor de la salud, deben apoyarse en estudios realizados *in vitro* utilizando modelos de célula de cultivo o *in vivo* usando modelos animales (Leroy *et al.*, 2004), sin embargo, los estudios más importantes son aquellos que han sido evaluados sujetos humanos y destacando por lo menos dos grupos de investigación siendo el control y el de intervención.

6.6.3. Queso como portador probiótico

El queso es uno de los productos alimenticios más versátiles y disponibles hoy en día, su variabilidad ofrece oportunidades para muchas estrategias de marketing y como un portador de alimento probiótico. Sin embargo, el desarrollo de quesos como portadores probióticos implica el conocimiento obligatorio de todas sus etapas de procesamiento, así como evidenciar que las bacterias probióticas incorporadas en el queso deben ser capaces de crecer y proliferar en el intestino humano y por lo tanto deben sobrevivir durante el paso por el tracto gastrointestinal, lo cual implica la exposición a ácido clorhídrico en el estómago y la bilis en el intestino delgado.

Por lo expuesto anteriormente se han realizado estudios para el desarrollo de suplementos con probióticos en matrices como quesos madurados, donde se ha evidenciado el mantenimiento de su viabilidad durante el tránsito intestinal justificando su supervivencia por la matriz densa del queso. Además, este producto presenta un alto valor nutricional, porque contiene de forma concentrada la mayoría de nutrientes de la leche, a excepción de la lactosa ya que este último ha sido metabolizado completamente por las bacterias propias en el proceso de maduración. Es importante resaltar que en esta etapa de maduración, se lleva a cabo en gran medida la hidrólisis de la caseína, aumentando la digestibilidad de la proteína, degradándola en péptidos y aminoácidos. También, en esta etapa se efectúan procesos de lipólisis, dando lugar a la liberación de ácidos grasos de cadena corta, los cuales son de fácil absorción a nivel intestinal, también encontramos a los ácidos grasos saturados y poliinsaturados, para este último, cabe la pena mencionar al ácido linoleico como omega-6, el cual se recomienda su consumo de manera

proporcional de 6:1 con el omega-3. Por otra parte, encontramos, el contenido en minerales del queso es mayor que la leche, destacando así la cantidad en calcio, fósforo y zinc. Además, se presenta un mayor contenido de vitaminas, como las del complejo B las cuales ejercen un papel antioxidante como barrera protectora de la oxidación celular, de esta manera la disponibilidad de estos nutrientes en los quesos madurados, proveen un impacto para la salud (Lucas *et al.*, 2006; Gomes da Cruz *et al.*, 2009).

6.6.4. Alimentos Funcionales

El término "alimento funcional" fue utilizado por primera vez en 1984 como resultado de un estudio sobre las relaciones entre la nutrición, la satisfacción sensorial, fortificación y la modulación de los sistemas fisiológicos con el fin de definir los productos alimenticios, con componentes fortificados que posean ventajosos efectos fisiológicos. Los objetivos de los alimentos funcionales son múltiples como: mejorar las condiciones generales del cuerpo, disminuir el riesgo de algunas enfermedades y poder ser utilizado para el tratamiento de algunas enfermedades. (Bigliardi *et al.*, 2013; Gomes da Cruz *et al.* 2009).

Actualmente los alimentos funcionales se han desarrollado prácticamente en todas las categorías de alimentos, como consecuencia a las preferencias de los consumidores donde pueden variar entre los mercados, siendo principalmente puestos en marcha en la industria láctea, confitería, refrescos, panadería y en el mercado de alimentos para bebés (Cousinet *al.* 2011).

Según la literatura se propone una clasificación de alimentos de funcionales, desde el punto de vista del producto (Bigliardi *et al.*, 2013):

- Alimentos fortificados con nutrientes adicionales (con la etiqueta que mencione producto fortificado), como jugos de frutas fortificados con vitamina C, vitamina E, ácido fólico, Zinc y Calcio
- Alimentos con nuevos nutrientes o con componentes adicionales, normalmente se encuentran en un alimento en particular (con la etiqueta que mencione producto enriquecido), como los probióticos o prebióticos
- Alimentos en donde un componente ha sido eliminado, reducido o sustituido por otro con efecto beneficioso, por ejemplo como libres de grasa *trans*
- Alimento en el que uno de los componentes han sido naturalmente mejorada (con la etiqueta que mencione producto mejorado), por ejemplo con mayor contenido de Omega3.

Actualmente la tendencia de la industria de alimentos ha sido enfocada en el desarrollo de nuevos productos, para una alimentación más saludable que ayude a mejorar la calidad de vida e impacte para la salud, razón por la cual existen un número creciente de consumidores los cuales se están dando cuenta que los alimentos funcionales ayudan a reducir ciertos riesgos de enfermedades o promover el bienestar óptimo para la salud (Hugenholtz *et al.* 2002; Cousinet *al.* 2011)

Para las tendencias de las tecnologías de desarrollo de los alimentos funcionales, se pueden identificar tres grupos diferentes:

- Tecnologías utilizadas tradicionalmente en la elaboración de alimentos y su adaptación para desarrollar nuevas funcionalidades.
- Tecnologías con la oportunidad para mejorar la salud pública, con el uso en el control de las deficiencias de las vitaminas A y D, varias del complejo B (tiamina, riboflavina y niacina), el yodo y el hierro.
- Tecnologías recientes encaminadas al diseño de nuevas formas de empaques del producto como el desarrollo de micro encapsulación, alimentos derivados lácteos como vehículo.

Por lo anterior se puede afirmar que el desarrollo de alimentos funcionales tiene y tendrá un gran auge rompiendo con las tradicionales tendencias del mercado. Por lo cual se requiere mayor desarrollo e investigación en nuevas matrices alimentarias y nuevos bioactivos que puedan llegar a ser incorporados en el desarrollo de nuevos productos funcionales, teniendo en cuenta las necesidades de los (Hussein *et al.*, 2013).

6.6.5. *Propionibacterium freudenreichii* como potencial probiótico

6.6.5.1. Tolerancia a sales biliares y pH ácidos

Las bacterias probióticas se caracterizan por sobrevivir en primer lugar a través del tracto gastrointestinal superior y luego persistir en el intestino para proporcionar efectos beneficiosos para el individuo (Cousin *et al.*, 2011). Con el fin de ser utilizado como potencial probiótico, *P. freudenreichii* ha demostrado su capacidad de la tolerancia al tránsito a las condiciones del tracto gastrointestinal, superando barreras como el entorno ácido del estómago y la bilis secretada en el duodeno (Warminska *et al.*, 2002).

Por tal motivo, se han realizado varios estudios, los cuales someten al microorganismo a condiciones de estrés metabólico, para demostrar los mecanismos de adaptabilidad y ser tomado como posible estrategia para la mejora de su resistencia a los ácidos (Huang *et al.*, 2004; Delgado *et al.* 2011; Darilmaz *et al.*, 2012).

Se encontró un estudio realizado por Jan *et al* en el 2000, el cual evaluó la susceptibilidad al estrés ácido y la adaptación por *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* procedente de un queso Emmenthal tipo suizo, a diferentes concentraciones de HCl a 100, 88, 73 y 48 mmol/L, para obtener pH de 2, 2.5, 3 y 4 respectivamente, evaluando la viabilidad del microorganismo en 15, 30 y 60 minutos después de ser homogenizadas las muestras, evidenciaron que había una respuesta eficiente de adaptación en la fase estacionaria a pH 4.0, y una tolerancia de sobrevivencia a pH 2 y 3, de éste modo se demostró una eficaz adaptación a sobrevivir a pH bajos y su potencial uso en la elaboración de quesos y aplicación probiótica.

En otro estudio, también realizado por Jan *et al* en el 2002, se investigó la capacidad de *P. freudenreichii* (cepa Propiofidus®SI41) para adaptarse y sobrevivir a tensiones de estrés metabólico. En este estudio *in vivo*, participaron 7 voluntarios (3 hombres y 4 mujeres, entre 25 y 35 años), quienes recibieron Propiofidus®SI41 en 3 tratamientos diferentes, cada tratamiento se evaluó en 3 periodos de tiempo cada uno de 4 semanas, planteándose así los 3 tratamientos: el primero en cápsulas clásicas con una dosis de 5×10^9 UFC/mL, el segundo con las mismas cápsulas pero una dosis más alta de 5×10^{10} UFC/mL y el tercer modo emplearon capsulas más duras resistentes a los ácidos a dosis 5×10^9 UFC/mL. Se evidenciaron como resultados en el primer caso, que *P. freudenreichii* fue recuperado por encima de 10^5 UFC/g en las muestras de heces. En los dos casos siguientes, que se enumeraron en todas las muestras fecales entre 10^5 y 10^7 UFC/g, se encontró que la recuperación de bacterias propiónicas *in vivo* en muestras fecales parecía estar relacionada con un mayor contenido en ácidos grasos de cadena corta. Este estudio, mostró claramente el papel de la protección gástrica en la supervivencia de *P. freudenreichii* y su adaptación al estrés.

Posteriormente para el 2008, un estudio realizado por Suomalainen *et al*, quien quería evaluar la tolerancia *in vitro* de 7 cepas de *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, a diferentes pH (2.0, 3.0, 4.0 y 6.5) y concentraciones de sales biliares (0.3 y 0.5% de bilis bovina B-3883), simultáneamente en el mismo estudio se realizó una intervención *in vivo* doble ciego de 6 semanas, para evaluar la supervivencia de esta cepa en el tracto gastrointestinal, de esta manera se les administró a adultos sanos (n=22) entre 20 a 40 años, suero de zumo de frutas incorporando a *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, de ésta manera se evaluó el seguimiento de esa cepa por muestras fecales de los sujetos. Como resultados del experimento *in vitro* se observó la viabilidad de estas cepas a las tres horas luego de ser inoculadas a pH 4 y 3, mientras que al pH 2 la viabilidad en las células se vio evidentemente disminuida, además en cuanto a la exposición a concentración de sales biliares se evidenció que a 0.5% no tuvo ningún efecto aparente en la viabilidad de las cepas, por parte del estudio *in vivo*, se demostró que durante el periodo de administración se detectó un promedio de una concentración de 7.6 UL/g y después del segundo periodo los recuentos se redujeron a <3 UL/g. Como conclusión se tuvo las especies de *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* presentes en las heces de los sujetos, se apoya con los hallazgos obtenidos con el estudio *in vitro* donde se expusieron estas cepas a diferentes niveles de pH y altas concentraciones de sales biliares.

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio *in vitro* realizado por Cousin *et al* en el 2012, el cual consistía en verificar a nivel *in vitro* la adaptación al estrés de *Propionibacterium spp.* imitando las condiciones digestivas del

intestino, para posteriormente ser empleado como vector en leche para la alimentación de cerdos. De este modo, este estudio empleó una cepa de *P. freudenreichii ssp. shermanii* BIA1, inoculándola en una concentración de sales biliares (ácido cólico y la mezcla de la sal sódica del ácido desoxicólico a una concentración de 1 g/L, donde se incubo por 1 hora a 37°C, y se evidenció que ésta cepa presento una buena tasa de supervivencia a medio ácido, donde se demostró una alta tolerancia a las sales biliares.

Para el mismo año se encontró otro estudio realizado por Darilmaz *et al*, quienes pretendían evaluar 29 cepas del genero *Propionibacterium spp.* de las cuales 18 fueron *P. freudenreichii*, donde querían evaluar la resistencia a diferentes pH y sales biliares de este modo establecer criterios para la selección de microorganismos con propiedades probióticas. Por esta razón inocularon estos microorganismos en concentraciones entre 10^5 - 10^7 UFC/mL en medio lactato de sodio (SLA), el cual fue modificado para el ensayo ajustando el pH a 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 7.0 (control) usando 4N de HCL, así mismo se evaluo el efecto de sales biliares adicionado 0.06%, 0.15% y 0.3% al medio SLA. Como resultados se destaca que la viabilidad para 7 cepas de *P. freudenreichii* en el medio a pH 2,0 y 3,0 y todas las 29 cepas evidenciaron una resistencia a pH 4,0, demostrando una relación significativa frente al control. En cuanto a la exposición de las concentraciones de sales biliares (0.06%, 0.15% y 0.3%), 11 cepas de *P. freudenreichii*, mostraron mayor resistencia a las sales biliares, concluyendo que las 29 cepas del genero *Propionibacterium spp.*, pueden ser muy resistentes a las condiciones intestinales.

Estos resultados aportan nuevas ideas sobre la tolerancia de *P. freudenreichii* a las sales del ácido y la bilis, que deben tenerse en cuenta para el desarrollo de preparados probióticos.

6.6.5.2. Termotolerancia

Propionibacterium freudenreichii ha demostrado su capacidad a la tolerancia de diferentes temperaturas, yasea en un empleo para la industria de alimentos, como fabricación del queso Emmenthal tipo Suizo o para su empleo como cepa potencial probiótica, la cual ha demostrado sobrevivir a diferentes temperaturas a las condiciones del tracto gastrointestinal. Por tal motivo se han realizado varios estudios, los cuales someten al microorganismo a condiciones de estrés térmico, para así demostrar su adaptabilidad y su empleo como probiótico.

Un estudio realizado por Anastasiou *et al* en el 2006, en donde su objetivo era evaluar la tensión térmica avarias especies de *Propionibacterium spp.* aisladas de un queso tradicional Graviera Kritis, producido en la islade Creta, Grecia, el cual es un tipo de queso Gruyere, identifico por PCR de SDS-PAGE, a 10 cepas aisladas (7 cepas de especie *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* y 3 cepas de otras especies de *Propionibacterium spp.*), las cuales se sometieron a 55, 60 y 65°C por 30 min y 60 min. Como resultados se encontraron que todas las cepas de *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, demostraron una termo tolerancia a 55°C por 60 min y una adaptación térmica a 60 y 65°C mostrando un reducción de 6 unidades Log, concluyendo así el papel de *P. freudenreichii* en la tecnología de procesos de la industria quesera y su posible mecanismo de adaptación para la sobrevivencia a las variaciones de las temperaturas del sistema digestivo humano.

6.6.5.3. Adhesión Intestinal

Otro aspecto importante de la sobrevivencia en el tracto gastrointestinal, es la capacidad de adherencia a la mucosa intestinal, la cual es uno de los principales criterios de selección para los probióticos. En cuanto a *P. freudenreichii*, se ha estudiado su efecto sobre la salud en cuanto a la adherencia a la mucosa intestinal, siendo esta, parte de su papel antagónico frente a patógenos, como modulador del sistema inmune y mejorando la integridad de la mucosa frente a daños ocasionados al intestino (Cousin *et al.*, 2011).

Con respecto a lo anterior, en un estudio *in vitro* realizado por Ouwehand *et al* en el 2002, donde se querían evaluar la capacidad de adhesión al moco del intestino humano de cuatro cepas de género *P. freudenreichii*, dos cepas del genero *Lactobacillus* y dos del genero *Bifidobacterium sp.*, para ello se emplearon tejidos decolon humano, aprobado para este estudio por el comité de ética del Hospital Central de la Universidad deTurku. Este

tejido fue procesado siendo lavado por una solución bufferada de ácido (HEPES) y posteriormente se centrifugo el moco para eliminar restos celulares y bacterias, siendo este moco inmovilizado en placas de microtitulación de pozos, y al añadir las diferentes cepas de estudio se radiomarcaron con una solución de 1 % de sulfato dodecil de sodio con 0.1mol de NaOH, y posteriormente se incubaron por 2 horas a 37°C, se determino la radiactividad por centello liquido y la adhesión se expreso como el porcentaje de adhesión, este procedimiento se evaluó en 30s, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min y 90 min. Con este estudio se observo que el porcentaje de adhesión de las cepas de género *P. freudenreichii* con respecto al tiempo fue de lenta a moderada (0.4 a 4.5%) en una hora y se concluyo que puede ser aumentado el porcentaje de adhesión a la mucosa en menor tiempo junto a otras cepas probióticos como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, mejorando la probabilidad de adherencia *in vitro*.

Otro estudio del 2002 realizado por Zarate *et al*, querían evaluar las propiedad de adhesión la mucosa intestinal de 24 cepas de género *Propionibacterium spp.* y su beneficio para la salud, de este modo se evaluaron a estas cepas, características hidrófobas, habilidades de autoagregación y hemaglutinación ya que estos rasgos han demostrado ser indicativo para la adherencia en las células epiteliales. Como resultados del estudio se mostro que todas las cepas tenían propiedades altamente hidrófobas, pero las características de hemaglutinación y autoagregación, se encontraron en bajas proporciones en estos microorganismos estudiados. De esta manera se concluyó de este estudio, que la adhesión es un buen indicador de la asociación *in vitro* de estas bacterias propiónicas sobre el epitelio intestinal, apoyando así el potencial de *Propionibacterium spp.* en el desarrollo de productos probióticos.

Finalmente, en otro estudio realizado por Huang *et al* en el 2003, el cual quiso evaluar las propiedades de cepas de *P. freudenreichii* y su interacción en líneas celulares C2BBE1, de esta manera se emplearon 13 cepas del genero *Propionibacterium spp.* (10 cepas de *P. freudenreichii*, 2 cepas de *P. ácidopropionici*, una cepa de *P. jensenii*), y dos cepas control *L. ácidophilus* MJLA1 y *B. lactis* BDBB2, donde se incubaron en una línea celular C2BBE1 a 37°C en 5% CO₂ y 95% aire atm durante una hora. Como resultados se observaron que *L. ácidophilus* MJLA1 y *B. lactis* BDBB2, tenían capacidad adhesiva en la línea celular C2BBE1 y sólo *P. freudenreichii*, de las 13 cepas de *Propionibacterium spp.*, demostró adhesión a C2BBE1, razón por la cual se concluyo que el género *Propionibacterium spp.*, tiene aplicación como potencial probiótico y la línea celular C2BBE1 es muy adecuada en estudios para adhesión celular bacteriana.

Aunque los modelos *in vitro* no pueden simular las condiciones *in vivo*, se puede asociar una colonización mediante una adhesión transitoria, esta evidencia científica nos muestran su correlación con las observaciones *in vivo* y por lo tanto se puede esperar a tener buenos resultados como potencial probiótico.

6.6.5.4. Reducción de patógenos en la mucosa intestinal

Se han conocido diferentes metabolitos producidos por una amplia gama de microorganismos los cuales tienen acción antimicrobiana, siendo proteínas o bacteriocinas, las cuales son péptidos o proteínas sintetizadas ribosómicamente, porque generalmente son secretadas fuera de la célula y difieren en sus propiedades bioquímicas, físicas, modo de acción y espectro de actividad. Los microorganismos del genero *Propionibacterium spp.* también son conocidos por su acción bactericida, por la producción de metabolitos tales como el ácido propiónico, ácido acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Estas bacteriocinas son un grupo muy interesante, debido a sus propiedades fisicoquímicas e inusual espectro de actividad. Solo se ha encontrado una bacteriocina producida por *P. freudenreichii*, que ha sido descrita y caracterizada hasta la fecha (Brede *et al.*, 2004).

De esta forma, se encontró un estudio *in vitro*, realizado por Gwiazdowska *et al* en el 2006, cuyo objetivo fue el aislamiento y la purificación parcial de las bacteriocinas de *P. freudenreichii ssp freudenreichii* y *P. freudenreichii ssp. shermanii* la determinación de su actividad antimicrobiana y la estabilidad. Los autores encontraron bacteriocinas, como Ácidofilina 801 y Propionicina PLG-1 que inhiben el crecimiento de bacterias gram positivas como, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens*,

Pseudomonas aeruginosa y *Vibrio parahaemolyticus*, y la Ácidocina CH5, inhibiendo el crecimiento de hongos tales como *Aspergillus ventii*, *Apiotrichum curvatum*, *Fusarium tricinctum*, *Phialophora gregata* y levaduras como *Candida*, y *Saccharomyces*. Estas bacteriocinas también fueron referenciadas en un estudio realizado por Holo *et al* en el 2002, se determinó la estabilidad de estas bacteriocinas a pH 4.5 a 7.0 en presencia de solventes como etanol,

isopropanol y hexano. Por tal motivo se ve necesario continuar investigando sobre los tipos de bacteriocinas producidos por *P. freudenreichii* en estudios *in vivo* y en humanos, y posibles aplicaciones como conservantes en alimentos.

6.6.6. *Propionibacterium freudenreichii* y su impacto para la salud

6.6.6.1. Modulación de la motilidad

Se conoce que varios problemas digestivos a nivel funcional, se deben a los cambios en la dieta y en la flora digestiva, que raramente han sido estudiados, pero se ha demostrado que el empleo los probióticos han mejorado el confort digestivo.

En varios estudios se evidencio que la suplementación de *P. freudenreichii* junto con otros probióticos, influye en la motilidad del intestino, tomando como posible hipótesis, que la producción de ácidos grasos de cadena corta emitidos en su metabolismo, presentan un impacto en la motilidad intestinal.

En el 2002, *Ouwehand et al* realizaron un estudio con el objetivo de evaluar el efecto de la actividad de una mezcla de probiótico para mejorar la motilidad intestinal en personas con edad avanzada. Así, dentro de esta investigación, se incluyó un total de 28 adultos mayores con un rango de edad entre 75 y 90 años, los cuales fueron divididos en tres grupos: un grupo control que recibió solo el jugo de naranja, un segundo grupo que recibió jugo de naranja enriquecido con Bioprofit® (*L. rhamnosus* LC705 y *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) y un tercer grupo que recibió jugo de naranja suplementado con Rela® (*L. reuteri* ING1). Durante las 3 primeras semanas todos los sujetos consumieron el jugo sin suplementar, en las siguientes 4 semanas, los participantes recibieron el jugo que les fue asignado y finalmente, durante las 3 últimas semanas, todos los adultos mayores recibieron de nuevo zumo sin suplementar. Se evidenció que los sujetos del segundo grupo que recibieron el jugo de naranja suplementado con Bioprofit®, mostraron un aumento del 24 % en la frecuencia de la defecación frente al grupo control, comprobando además que los probióticos evaluados no afectaron la barrera intestinal. Esta propiedad probiótica es interesante y es de resaltar, ya que el estreñimiento es un problema común en personas de edad avanzada.

Otro estudio clínico realizado por *Bouglé et al* en 1999, donde se emplearon a 18 adultos varones en edad entre 20 a 29 años, a quienes se les suministraron diariamente una capsula de dos cepas liofilizadas de *P. freudenreichii* llamada Propiofidus SI 26 y SI 41 (Standa-Industrie, Caen, Francia) a una concentración de 5×10^{10} UFC/g (equivalente a la ingestión de 100g de queso Emmenthal/día) y se realizó la suplementación durante 2 semanas. En este estudio se evidencio el efecto sobre la motilidad colónica segmentaria, donde se halló más rápida motilidad en el colon ascendente que en el izquierdo.

Dado lo demostrado en estas dos investigaciones, es de resaltar la importancia de evaluar estas implicaciones en la funcionalidad del tracto gastrointestinal y la influencia de *P. freudenreichii* en la motilidad del colon en personas con problemas estreñimiento, además poder identificar los cambios que se producen en la microbiota intestinal y la composición química durante el tránsito intestinal y así se podría explicar por qué las diferencias en la motilidad en este tipo de personas con esta alteración es su hábito intestinal.

6.6.6.2. Actividades metabólicas y absorción en el intestino

6.6.6.2.1. Actividad β -galactosidasa

En cuanto a la modulación enzimática de *P. freudenreichii*, se ha señalado la síntesis de β -galactosidasa en presencia de sales biliares, porque confiere una permeabilización a los enterocitos, otorgando esta propiedad un impacto fisiológico en la absorción y motilidad intestinal (*Jan et al.*, 2002; *Saraoui et al.*, 2013). Debido a lo anterior, el microorganismo en cuestión podría ser útil para el tratamiento y aun la prevención de la intolerancia a la lactosa,

ya que una de las β -galactosidasas más comunes es la lactasa, la enzima encargada de hidrolizar la lactosa en dos disacáridos, glucosa y galactosa, para que estos sean absorbidos y metabolizados por el organismo. Un estudio *in vitro* realizado por Zarate y Pérez en el 2000, evaluaron los efectos de los fluidos gástricos e intestinales artificiales sobre la actividad β -galactosidasa y la supervivencia de cuatro cepas de género *Propionibacterium spp.* previamente seleccionadas. Estas cepas fueron expuestas a jugo gástrico artificial a valores de pH 2 a 7 y después se sometieron a una digestión intestinal artificial. Como resultados se obtuvo que la actividad de la β -galactosidasa se vio seriamente afectada a pH 2, además la tripsina presente en el fluido intestinal inactiva la enzima β -galactosidasa en cepas de *P. freudenreichii* pero no en *P. acidipropionici*. Por otra parte, la presencia de sales biliares mejora la actividad de la β -galactosidasa de estas cepas, donde se genera una permeabilización del tejido durante la primera hora de la exposición, de esta forma la tasa de tránsito intestinal confirmó la permanencia de las bacterias en el intestino durante el tiempo suficiente para ser permeabilizadas, trayendo como conclusión que estos resultados sugieren que las especies de *Propionibacterium spp.*, son una buena fuente de actividad β -galactosidasa en el intestino, proponiéndose como cepa potencial probiótica.

Otro estudio realizado por los mismos investigadores en el 2005, en el que se quiso evaluar a nivel *in vivo* e *in vitro*, la contribución de cuatro cepas del género *Propionibacterium spp.* (dos cepas de *P. freudenreichii* y dos cepas *P. acidipropionici*), para la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), ácido láctico y la contribución de la actividad β -galactosidasa, en el ciego de ratones machos albinos alimentados con pequeños trozos de queso Emmenthal tipo Suizo, para el análisis de la actividad metabólica, los ratones fueron alimentados durante 7 días, se sacrificaron y se les analizó el tejido cecal. Como resultados se obtuvo que la producción de AGCC, se vio relacionada al consumo de ácido láctico en *Propionibacterium spp.*, donde dependía de la cantidad de lactato, ácido pirúvico y la acción de la enzima β -galactosidasa, como conclusión se mostró una mayor actividad de la β -galactosidasa y mejoró los niveles de ácido propiónico en el ciego de los ratones estudiados, sugiriendo también que el empleo de queso tipo Suizo podría ser utilizado como carrier de bacterias probióticas como las bacterias probióticas al intestino humano.

6.6.6.2.2. Modulación de ácidos de cadena corta

Es importante resaltar el papel de una población bacteriana mixta sobre el intestino, ya que intervienen en la descomposición de sustratos como carbohidratos y mediante su fermentación la producción de metabolitos, que intervienen en forma benéfica sobre la integridad intestinal. Este es el caso de la acción de las bacterias probióticas, las cuales hidrolizan los hidratos de carbono, proteínas, péptidos y glicoproteínas, para producir lactato, etanol, piruvato y succinato, y promover a la producción de acetato, propionato, butirato y aproximadamente 85-95% como ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Estos ácidos orgánicos están involucrados en una amplia gama de funciones fisiológicas, tales como el transporte de electrolitos y agua, el crecimiento y la diferenciación de la mucosa colónica, la apoptosis de colonocitos alterados y el metabolismo de los lípidos y síntesis de ácidos grasos en el hígado, las cuales suministran energía para diferentes tejidos. Por lo tanto, es de gran interés aumentar la producción de AGCC a nivel intestinal mediante el uso de cepas probióticas (Saraoui *et al.*, 2013).

En los últimos años, se ha evaluado la capacidad de *P. freudenreichii* en la producción de compuestos de sabor, tales como ácidos grasos libres, originados a través de la lipólisis de los glóbulos de la grasa, resultando en ácidos de cadena corta y ramificada. Debido a que mejoran el tránsito intestinal, se ha evaluado a nivel *in vitro* que *P. freudenreichii*, puede sobrevivir en condiciones adversas en el tracto gastrointestinal, presentando adherencia a la mucosa intestinal y contribuyendo a la producción de ácidos grasos de cadena corta y ácido linoléico conjugado (CLA), proporcionando efectos beneficiosos sobre las células epiteliales de colon del huésped (Chamba *et al.*, 2002; Falentin *et al.*, 2010).

En primera instancia, cabe la pena mencionar como *P. freudenreichii* produce tres ácidos grasos ramificados de cadena corta, donde se presenta en su vía de biosíntesis el ácido 2-metil-butanoico, ácido 3-metil-butanoico (ácido isovalérico) y ácido 2-metil propanoico, los cuales son producidos por el catabolismo de la isoleucina, leucina y valina, respectivamente (Thierry *et al.*, 2004a). Su síntesis está estrechamente relacionada con la de los ácidos

grasos de la membrana, ya que *P.freudenreichii* emplea una enzima con actividad *lipolítica (esterasas)*, la cual es la responsable de la formación de ácidos grasos de cadena ramificada con metilo, donde posteriormente dos permeasas permiten su transporte de leucina e isoleucina a la célula (Dherbécourt *et al.*, 2008,2010; Falentin *et al.*, 2010; Thierry *et al.*, 2011)

Es importante referirse que el ácido linoléico conjugado (CLA), que es un ácido graso esencial ligeramente modificado, en caracterizarse en presentar dobles enlaces conjugados en varias posiciones. Entre las acciones orgánicas más estudiadas del ácido linoléico, se reconoce por reducir los niveles plasmáticos de colesterol, además se relaciona con su efecto de capacidad antioxidante al reducir los niveles de peróxido y sustancias que presenten radicales libres, reduciendo los efecto antiterogénicos, también el CLA contribuye a la respuesta inmune, estimulando la síntesis de IgA, IgG, IgM y disminuyendo los niveles de IgE, asimismo se ha evidenciado que influye en la disminución del apetito, ayudando a disminuir los depósitos de grasa en el tejido adiposo y un aumento en la velocidad metabólica y del cociente respiratorio, resultando una disminución del peso (Eyjolfson *et al.*, 2004; Gaullier *et al.*, 2004).

De este modo, se evidenció en un estudio realizado por Rainio *et al.*, en el 2002, como *P. freudenreichii* ssp. *Shermanii*, podría convertir la isomerización del ácido linoleico en ácido linoleico conjugado (CLA), estudiando su fermentación en un fed-batch a pH controlados, donde se mostró que al suplementar estos fermentadores con 600 a 2000mg/mL de ácido linoleico, se obtuvo una tasa de formación de CLA de 80 – 87%, en mayor proporción en la fase exponencial de crecimiento de *P.freudenreichii* ssp. *shermanii*, siendo una conversión rápida y eficiente, los autores concluyeron que esta reacción de isomerización puede ser una desintoxicación sistemática del ácido linoleico que posee esta cepa para su sobrevivencia en ambientes hostiles. Además se han realizado en los últimos años, varios estudios con cepas probióticas para la formación de CLA, en matrices como quesos, donde las bacterias propiónicas en su metabolismo (incluyendo la vía lipolítica) permiten la maduración de estos productos, propiciando para este medio la producción de un mayor rendimiento de CLA, otorgando a estas matrices alimenticias la propiedad intrínseca de ser funcional y contribuyendo para la salud ayudando a reducir los índices de aterogeneidad para el consumidor. (Rodrigues *et al.*, 2012).

Es importante mencionar, que este ácido graso interviene en la modulación del sistema inmune. En este sentido es importante destacar que varios de los mediadores de la inflamación asociados con el shock, la septicemia y la insuficiencia de órganos como las prostaglandinas, leucotrienos y factor activador de plaquetas, derivan del ácido graso omega 6 como el linoleico, anteriormente mencionado, Este ácido graso se metaboliza a ácido araquidónico el cual es precursor de Prostaglandinas tipo 2 y Leucotrienos 4 que inducen la respuesta inflamatoria e inducen la inmunosupresión. Es relevante mencionar que el ácido linoléico omega 3 es metabolizado a ácido eicosapentanoico precursor de Prostaglandinas de tipo 3 y Leucotrienos 5 que ejercen el efecto contrario, produciendo un efecto antiinflamatorio y mejoría la función inmune. Sin embargo es importante tener en cuenta la relación de 6:1 en el consumo de omega 6 y omega 3 respectivamente, puesto que esta proporción debe ser apropiada en pro de no inducir a una mayor respuesta inflamatoria, ocasionado inmunosupresión (Pérez *et al.*, 2013).

6.6.6.2.3. Producción de trehalosa

Como se ha nombrado anteriormente el género *Propionibacterium spp.*, se caracterizan por su capacidad de producir propionato, acetato, succinato y dióxido de carbono a partir de la fermentación de una gama de sustratos de carbono (ácidos orgánicos, carbohidratos, polioles). Los estudios con *Propionibacterium spp.*, han ido avanzando en los últimos años y se ha llegado a reportar la obtención en extractos celulares de trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido).

Se ha demostrado que la trehalosa se encuentra en un amplio número de organismos, como en las bacterias y las levaduras, existe gran evidencia de la función de este disacárido como un compuesto de reserva y como un metabolito que se acumula en la respuesta de estrés a la agresión osmótica o térmica. De esta forma la trehalosa ejerce una propiedad de preservación y estabilización en protección de la célula y las proteínas celulares, de los daños causados por los radicales de oxígeno, previniendo la agregación de proteínas y así facilitar su replegamiento. (Hugenholtz *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2004).

En el estudio realizado por Cardoso *et al.* en el 2004, se evaluó la capacidad de producir trehalosa por *P.freudenreichii* ssp. *shermanii* B365 en un medio de cultivo basado en leche descremada y se evaluó el efecto de las condiciones ambientales tales como el pH, la salinidad, oxígeno y carbono. De este modo, para el estudio se evidenció como resultado que la lactosa fue la mejor fuente de carbono para la producción de trehalosa en cambio del lactato. La trehalosa se consumió después del agotamiento de la fuente de carbono, lo que sugiere su papel como un compuesto de reserva, así mismo se encontró que la producción de trehalosa no fue afectada por la explosión a temperatura de 30 a 20°C y además, que la máxima acumulación de trehalosa aumentó aproximadamente 200 a 400 mg al disminuir el pH 7.0 a 4.7 y la concentración de NaCl a 2 % (w/v). De esta manera, los datos proporcionan evidencia de una doble función de trehalosa como un compuesto de reserva y como una respuesta de frente al estrés y se determinó que *P.freudenreichii* ssp. *Shermanii* B365 fue capaz de producir altos niveles de trehalosa en la leche descremada, confiriendo esta capacidad para la aplicación del microorganismo en productos lácteos fermentados.

6.6.6.3. Producción de vitaminas

6.6.6.3.1 Vitamina B₁₂ (Cobalamina)

La vitamina B₁₂ desempeña funciones importantes en el metabolismo. La deficiencia de esta vitamina puede ocasionar anemia perniciosa y el desarrollo de cambios neurológicos que puedan originar daños en el cerebro, así como también se ha asociado al desarrollo de ataxia cerebelosa, lo que provoca convulsiones en pacientes epilépticos y movimientos involuntarios en los adultos. De esta manera, al presentar bajos niveles de ácido fólico y la vitamina B₁₂ se han evidenciado el desarrollo de enfermedades gástricas, intestinales, epilépticas, renales, entre otras. (Van Wyk *et al.*, 2010).

Según la ENSIN 2010 se afirma que la deficiencia de Vitamina B₁₂, con mucha frecuencia se ve enmascarada por la severidad de la deficiencia de hierro y el desarrollo de anemia. Hoy en día se conoce que al presentar deficiencia de Vitamina B₁₂, se origina al desarrollo de anemia perniciosa (ENSIN, 2010). Para Colombia se reportó una prevalencia a depleción de esta vitamina para la población del 3%, sin diferencias significativas por edad, sexo, etnia, nivel del SISBEN, área geográfica o región (ENSIN, 2010). Sin embargo, considerando que la deficiencia de este micronutriente es un continuo problema para la salud pública, se ha prestado gran atención al desarrollo de nuevas estrategias para la industria en el desarrollo de alimentos fortificados en micronutrientes, que contribuyan a reducir el riesgo de deficiencias de los mismos y tengan un impacto para la nutrición pública.

Recientemente se han desarrollado estudios con *P.freudenreichii* para la producción de cobalamina (vitamina B₁₂) y ácido propiónico en investigaciones *in vitro* en matrices alimenticias como los quesos (Murooka *et al.* 2005). Se han reportado ensayos a escala industrial en la producción de vitamina B₁₂ obtenida exclusivamente por fermentación biosintética por *P.freudenreichii*, mediante medios de cultivos con una composición controlada (Kosmider *et al.*, 2012). A través de estos estudios, se ha podido entender que la síntesis de esta vitamina es a nivel intracelular y se

libera fácilmente en soluciones ácidas ($\text{pH} < 5.0$), incluyendo el estómago humano (Van Wyket *al.*, 2010). De esta forma, esta cepa emplea dos rutas para la biosíntesis de vitamina B₁₂: una aeróbica o dependiente de oxígeno y otra en un ambiente anaerobio, manteniéndose a 30 ° C, pH 6-7; para la biosíntesis de la vitamina B₁₂, que se puede dividir en tres secciones: la primera parte es la síntesis del componente del anillo corrina, el segundo es la construcción del ligando axial inferior y la tercera es la unir las piezas de los componentes para producir la coenzima final (Murooka *et al.* 2005; Falentinet *al.*, 2011; Thierry *et al.*, 2011).

Un estudio realizado por Van Wyket *al.* en el 2010, cuyo objetivo para superar las deficiencias nutricionales de vitamina B₁₂ en ciertas poblaciones, se han desarrollado alimentos funcionales enriquecidos. Sin embargo, los métodos microbiológicos actuales utilizados para determinar con precisión los niveles de vitamina B₁₂ en los productos alimenticios, para el control de calidad y fines de regulación, son complejos y requieren de mucho tiempo, razón por la cual en este estudio se describe un método de identificación de la vitamina B₁₂ en los productos lácteos y los medios de crecimiento cultivados con *P. freudenreichii*, denominada Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), como resultados obtuvieron que los valores de vitamina B₁₂ variaron desde 98,6 % a 103,2 %, lo que indica que el método de identificación garantiza la completa disolución de la vitamina B₁₂ de las matrices en estudio; concluyendo de esta forma que el método HPCL es una alternativa rápida para la identificación de vitamina B₁₂ en ensayos microbiológicos, confirmando menos tiempo en los análisis.

Posteriormente, en el 2011 estos mismos autores realizaron un estudio *in vitro*, como objetivo querían evaluar la inclusión de *P. freudenreichii* de 1×10^8 UFC/mL, en granos de kéfir para la producción de folato y vitamina B₁₂ como metas obtener los niveles de estas vitaminas como mínimo 15% RDA de folato y máximo 200% RDA de vitamina B₁₂ en una porción de 200mL de kéfir, siendo este un producto económico y un posible alimento para ser incluido *P. freudenreichii*, ofreciendo una alternativa como un alimento fortificado. Como resultados se obtuvo la mayor producción de folato y vitamina B₁₂ después de tres días de haber sido inoculado el kéfi, de esta manera se obtuvo para vitamina B₁₂ un 186%RDA y para folato un 19%RDA en una porción de 200 mL, siendo así el kéfir como producto fortificado en folato y vitamina B₁₂.

6.6.6.3.2. Vitamina B₉ (Ácido fólico)

El ácido fólico es una vitamina esencial en la dieta humana, las deficiencias de ácido fólico pueden dar lugar a diferentes formas de anemia, espina bífida (defecto del tubo neural) en los recién nacidos y varios defectos relacionados con las funciones cognitivas (Cortés *et al.*, 2000). Además, hay una creciente evidencia de que el enriquecimiento con ácido fólico en los alimentos pueden dar protección contra las enfermedades congénitas como los defectos del tubo neural (DTN), síndrome de Down y de otras anomalías asociadas al déficit de este compuesto vitamínico (Martinez *et al.*, 2001; Lardoe *et al.*, 2005; Paz *et al.*, 2006; Saraoui *et al.*, 2013).

El ácido fólico está presente en la leche y los productos lácteos fermentados, a veces en concentraciones aún más altas como resultado de la producción de ácido fólico por las bacterias (van Hylckama *et al.*, 2007). Se ha reportado también la capacidad biosintética para la producción de vitamina B₉ por *P. freudenreichii* y

Streptococcus thermophilus, estimulando el crecimiento de *L. bulgaricus* (Falentinet *al.*, 2011).

En un estudio realizado por Hugenschmidt *et al.* en el 2011, afirmaron que una ingesta suficiente de ácido fólico es fundamental para la mejora en la salud en las personas, demostrando que los suplementos de ácido fólico en los alimentos se lleva a cabo con éxito en algunos países, pero los datos recientes también indican la importancia de mantener un equilibrio adecuado entre el folato y vitamina B₁₂, debido a sus metabolismos interdependientes; por

esta razón en su estudio evaluaron a *L.plantarum* SM39 como productor también de folato y a *P. freudenreichii* DF13 como productor de vitamina B₁₂ y B₉, en donde en un medio de cultivo se suplemento con extracto de levadura y cloruro de cobalto para así la optimizar la producción de estas vitaminas, como resultados obtuvieron que los rendimientos de folato y vitamina B₁₂ fue 10 veces superior a los valores máximos reportados en estudios previos, concluyendo así que se podrían emplear estas cepas para el desarrollo de alimentos fortificados.

6.6.6.3.3. Vitamina B₂ (Riboflavina)

El uso de cepas productoras de riboflavina en la producción de productos lácteos tales como leche fermentada, yogur, queso son factibles y económicos, ya que disminuiría los costos involucrados durante el enriquecimiento de la vitamina convencional y satisfacer las demandas del consumidor de alimentos más sanos (Yeneisy *et al.*, 2003; Parra *et al.*, 2010).

De tal forma, un estudio realizado por LeBlanc *et al* en el 2006, cuyo objetivo era evaluar *in vivo* la respuesta de la administración de yogur convencional en ratas de raza Wistar con estado deficiencia de riboflavina (n=80), donde esta bebida contenían como suplementación *P. freudenreichii* B374 a 5×10^8 UFC/mL, la cual fue suministrada en tres grupos durante 21, 28 y 49 días respectivamente, como resultados se evidencio disminución en las manifestaciones de deficiencia de riboflavina tales como retraso en el crecimiento y valores altos del *coeficiente de activación* de la enzima glutatión reductasa eritrocitaria, trayendo así como conclusión *que el consumo de este tipo de productos con mayores niveles de riboflavina en forma regular, pueden ayudara prevenir las deficiencias de esta vitamina esencial.*

6.6.6.4. Interacción con la microbiota intestinal

6.6.6.4.1 Identificación de componentes bifidogénicos

Una ventaja importante de *P.freudenreichii* para la modulación de la microbiota es su capacidad para mejorar el crecimiento de bifidobacterias. Unos compuestos bifidogénicos han sido ya identificados a nivel *in vitro* como el ácido 1,4-dihidroxi-2-naftoico (DHNA), el cual es un precursor de menaquinona (la ruta de biosíntesis de la vitamina K₂) y también 2-amino-3-carboxi-1,4-naftoquinona (ACNQ) que se puede derivar del DHNA y sirve como donante de electrones de NAD(P)H peroxidasa en bifidobacterias. La regeneración de NAD(P)⁺ sería responsable de la estimulación del crecimiento de bifidobacterias por *P.freudenreichii* través DHNA y ACNQ (Saraoui *et al.*, 2013), empleándose así esta cepa para uso potencial en las industrias de alimentos y suplementos para el consumo humano (Uchida *et al.*, 2011; Saraoui *et al.*, 2013).

También, se realizo un estudio por Warminska-Radykoet *al* en el 2002, cuyo objetivo era evaluar 27 cepas de *Propionibacterium spp*, donde 4 de estas eran de la especie *P.freudenreichii*, y demostrar que estas cepas eran capaz de producir metabolitos bifidogénicos durante la fermentación del cultivo y evaluar su acción sobre las cepas de *Bifidobacterium spp*. Así también se evaluó su tolerancia al estrés del medio en el intestino, como resultado se evidencio que 2-amino-3-carboxi-1,4-naftoquinona (ACNQ) estimulo el crecimiento *Bifidobacterium sppy* se observó que sobrevivieron todas las cepas del genero *Propionibacterium spp* tanto en los entornos de sales biliares y ácido, así como en la mayoría de los antibióticos utilizados en la investigación, de modo que se pudo concluir que *Propionibacterium spp* se puede utilizar como microflora probiótica, ya que puede sobrevivir en el intestino humano y presenta habilidad para colonizar y proliferar allí, así como posible alternativa para la administración segura en suplementos con el fin de mantener su interacción con otras bifidobacterias y probióticos como microbiota del intestino (Meile *et al.*, 2008).

Finalmente, otro estudio *in vivo* realizado por Okada *et al* en el 2006, se planteo como hipótesis que el ácido 1,4-dihidroxi-2-naftoico (DHNA) es un estimulador del crecimiento bifidogénico por *P.freudenreichii*, ya que se cree que tiene un efecto beneficioso como prebiótico e interviene en la inflamación intestinal, de este modo ellos querían determinar si la administración oral en 3 semanas de DHNA podía mejorar la colitis, la cual fue inducida por sulfato sódico de dextrano (DSS) sobre ratones en este estudio, donde se observó como resultados que el DHNA mejora la tasa de supervivencia y el daño histológico en ratones administrados con DSS tanto en los estudios preventivos y terapéuticos. Se este modo DHNA aumento de la expresión de la adhesión celular adreina de la mucosa molécula-1 (MAdCAM-1), el aumento de interleuquina-1 beta (IL-1 β) y la IL-6, además la disminución del número de *Lactobacillus* y *Enterobacteriaceae* por el DHNA. Asimismo, se observaron efectos preventivos sobre disminución en la concentración de butirato y la disminución en el nivel de pH en los ratones. De este modo se concluye, que el DHNA, se podría categorizar como un nuevo tipo de prebiótico, ya que atenúa la inflamación del colon no sólo mediante el equilibrio de la flora bacteriana intestinal, sino también por la supresión de la infiltración de linfocitos a través de la reducción de MAdCAM – 1.

6.6.6.4.2. Reducción de microorganismos en adhesión a células intestinales

En otro estudio realizado por Darilmaz *et al.*, en el 2012, se evaluó la actividad antimicrobiana de 29 cepas del genero *Propionibacterium spp*, de las cuales 18 fueron *P. freudenreichii*, frente a cepas como *Escherichia coli* ATCC 11229, *E. coli* O157:H7, *S.s aureus* ATCC 25923, *L.a monocytogenes* ATCC 7644, *S. enteritidis* ATCC 13076, *B. cereus* RSKK 863, *S. sonnei* 57, *M. luteus* NRLL B-4375 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Como resultados sedemostró que *P. freudenreichii* mostró actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos probados. Las cepas más sensibles fueron *E. coli* ATCC 11229 y *S. sonnei* Mu: 57, que se inhibió en un 91% de todos los cultivos *Propionibacterium spp*. Además, mientras que el crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 fue inhibida por *P. freudenreichii*, se mostró mayor actividad antimicrobiana contra *M. luteus* NRRL-B 4375, y menos frente a *S. aureus* ATCC 25923, concluyendo de esta forma que las cepas de género *P. freudenreichii* podrían ser utilizados como agentes terapéuticos para prevenir la diarrea y la shigelosis. Otros estudios similares de *P. freudenreichii* frente a patógenos como *S. typhimurium*, *E. coli*, *C.albicans*, *Clostridium sp.* y *Y.enterocolitica*, demostró su efecto contra microorganismos relacionados a ETAs que afectan directamente lamucosa intestinal (Warminska-Radyko *et al.*, 2002; Tharmaraj *et al.*, 2009; Uchida *et al.*, 2011; Saraoui *et al.*, 2013).

Además, se ha demostrado la resistencia a un gran espectro de antibióticos (ampicilina, eritromicina, virginiamicina, gentamicina, estreptomycin, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, vancomicina, narasina, bacitracina), mediante la técnica de concentración mínima inhibitoria (MIC) por VetMICTM, demostrando que *P.freudenreichii*, es susceptible a la mayoría de los antibióticos (Suomalainen *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2011; Cousin *et al.*, 2011).

Como se ha revisado hasta ahora *P. freudenreichii* tiene gran influencia sobre la salud gastrointestinal y es capaz de competir contra cepas patógenas. Así pues, es totalmente pertinente nombrar los efectos de *P.freudenreichii* en torno a la reducción de *H. pylori* en su adhesión intestinal, ya que este microorganismo es el agente etiológico de enfermedades como la gastritis crónica, úlceras pépticas y el principal factor de riesgo para desarrollar cáncer gástrico, un problema actual de salud pública en varios países (Sanchez *et al.*, 2007; Ortega *et al.*, 2010).

Estudios han reconocido el papel de *P. freudenreichii* con potencial antimicrobiano para la erradicación de *H.pylori* (Suomalainen *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2011), trayendo a colación un estudio realizado por Myllyluoma *et al.*, en el 2005, donde querían evaluar cuatro cepas diferentes probióticas (*L.rhamnosus* GG, *L.rhamnosus* LC705, *Bifidobacterium* BB99 y *P.freudenreichii* subsp. *shermanii*), para evaluar función de barrera, la muerte celular, la adhesión y la respuesta inflamatoria en las células epiteliales infectadas por el *H. pylori*; evaluando la adherencia de *H.pylori* por inmuno fluorescencia in situ; la función de la barrera epitelial por medición de la resistencia transepitelial; la apoptosis mediante la medición de la activación de caspasa-3 y la inflamación mediante la medición de la interleuquina-8 (IL-8), PGE-2, el *leucotrieno B4* y la liberación de IL-10. Dentro de los principales resultados, se destaca que todos los probióticos inhibieron la adherencia de *H.pylori* inducida por fugas de membrana celular, la combinación de las cuatro cepas mejoró la función de

barrera epitelial y *L.rhamnosus* GG, *L.rhamnosus* LC705, y *P. freudenreichii* subsp. *Shermanii* inhibe a *H. pylori* inducido por liberación de IL-8, concluyendo así que la respuesta terapéutica por las cepas probióticas se caracteriza por la reducción de la inflamación inducida por *H. pylori* en la mucosa gástrica. Sugiriendo así, que los probióticos estudiados, que contienen a *P. freudenreichii* subsp. *Shermanii*, pueden ser útiles en el tratamiento de la infección por *H.pylori* (Cousin *et al.*, 2011).

6.6.6.5. Efecto antimutagénico

Se ha evidenciado que *Propionibacterium spp*, puede contribuir a la reducción de los factores de riesgo para el desarrollo del cáncer en particular a través de la capacidad de unirse *in vitro* a los compuestos carcinógenos como micotoxinas, especialmente de aflatoxina B, cianotoxinas tales como microcistina-LR, lectinas de plantas tales como concanavalina A y jacalina (Zárate *et al.*, 2009), así como algunos metales pesados como el cadmio y el plomo (Cousinet *al.*, 2011).

Se ha reportado que *P. freudenreichii* presenta efectos antimutagénicos, como la reducción de la absorción intestinal de compuestos carcinogénicos, limitando así la aparición o el desarrollo de cáncer. Mecanismos como la inducción de la expresión del ligando-NKG2D el cual precipita la toxicidad mediadas por las células, presentando también un posible efecto proapoptótico sobre las células cancerosas, considerando también que la acción de AGCC inducen a la apoptosis de las células de cáncer gástrico y colon rectal (Cousinet *al.*, 2011).

También, se ha encontrado otros mecanismos que emplea *P. freudenreichii* en su impacto antimutagénico, como la unión a compuestos carcinogénicos para disminuir el riesgo de aparición de cáncer. Un estudio realizado por Gratz *et al.*, en el 2005 donde se quería evidenciar la capacidad de *P. freudenreichii* subsp. *Shermanii* y *L. rhamnosus* 705 para unirse a compuestos carcinogénicos como la aflatoxina B1, evidenciando en éste estudio que la absorción por membrana de éste carcinógeno se redujo, cuando las bacterias probióticas estaban presentes en un bucle duodenal, concluyendo así que la ingestión de *P. freudenreichii* subsp. *Shermanii* puede limitar la biodisponibilidad, la absorción y la metabolización de estos compuestos cancerígenos en el intestino.

6.6.6.5.1. Lectinas

Recientemente se ha expresado la influencia de las lectinas y su efecto mutagenico sobre las células epiteliales, debido que las lectinas como concanavalina A y jacalina, son un tipo de proteínas que se encuentran en los frijoles, legumbres y granos, que se unen a azúcares con una elevada especificidad; al ingerir en altos niveles estos alimentos, aumenta los niveles de lectinas en el organismo, actuando sobre la resistencia a enzimas proteolíticas, pasando así por el tracto gastrointestinal e interactuando con carbohidratos uniéndose en la superficie de las células epiteliales. La unión de estas lectinas causan cambios morfológicos y fisiológicos en el epitelio intestinal, los cuales pueden incluir la inhibición de las enzimas digestivas, aplanamiento de las microvellosidades de borde de las células intestinales, conduciendo a una reducción de la absorción y utilización de nutrientes, además el aumento de la proliferación celular actuando como promotores tumorales (Gonzalez *et al.*, 2011).

En estudios realizados por Zárate *et al.*, en 2009 y 2012, cuyos objetivos de sus experimentos fueron evaluar la capacidad de *Propionibacterium spp*, para enlazar lectinas como concanavalina A (Con A) y jacalin (AIL), evaluaron la relación de la adhesión bacteriana a los enterocitos, evitando así su toxicidad en células del epitelio intestinal en ratones. De esta manera, como metodología alimentaron a ratones durante 3 semanas con 8mg/kg/día de lectinas y el consumo de 5×10^8 UFC/mL de *P. acidipropionici* y *P. freudenreichii*, como resultados se evidenció que estas cepas, mediante su unión con restos de azúcares específicos en la superficie bacteriana, se obtuvo la eliminación de lectinas por estas bacterias, concluyendo de este modo que la eliminación de la Con A y AIL por estas cepas fue eficaz para evitar el efecto toxico contra las células de colon, siendo así una herramienta para proteger los epitelios intestinales.

6.6.6.5.2. Enzimas

Asimismo, se ha estudiado que enzimas como β -glucosidasa, β -glucuronidasa, azorreductasa y ureasa, están involucradas en la producción de carcinógenos dentro del intestino (Jan *et al.*, 2002), se han realizado estudios con cepas *P. freudenreichii*, donde éstas modulan la reducción de la actividad de estas enzimas a nivel intestinal (Saraoui *et al.*, 2013).

Como se menciona anteriormente, este hecho se evidencia en un estudio realizado por Ouwehand *et al.*, en el 2002 cuyo objetivo era evaluar la actividad de la enzima azorreductasa en pacientes con edad avanzada. De esta forma, los suplementaron con un zumo de naranja enriquecido con *L. rhamnosus*(LC705) y *P. freudenreichii* sudes *shermanii* (PJS), mostrando como resultados la disminución de la actividad azorreductasa en estos pacientes.

Otro estudio realizado en el 2008 por Hatakka *et al.*, propuso como objetivo examinar las actividades de β -glucosidasa, β -glucuronidasa y ureasa durante la suplementación en capsulas de las cepas LC705 y PJS a 2×10^{10} UFC/mL, a 38 hombres sanos entre 24 a 55 años que participaron en este estudio aleatorio, doble ciego con placebo control el cual duro 4 semanas. Como resultados se evidenció que condujo a una disminución significativa en la actividad de β -glucosidasa de 10 % y en la actividad de ureasa de 13 % y en cuanto a la actividad β -glucuronidasa no cambio en el tratamiento comparado con el control, concluyendo así que la administración de LC705 y PJS intervino en la disminución en la actividad de β -glucosidasa, ureasa y β -glucuronidasa en relación con el aumento de los recuentos de bacterias propiónicas, en comparación con el placebo.

6.6.6.6. Efecto antiinflamatorio a nivel intestinal

6.6.6.6.1. Atenuación de colitis

En cuanto a la inflamación intestinal, se ha reportado la acción de *P. freudenreichii*, ayuda a la disminuir la inducción de colitis ulcerativa (Mitsuyama *et al.*, 2007), este hecho se ha visto evidenciado en un estudio realizado por Uchida *et al.*, en el 2005, su objetivo era evaluar el efecto de una suplementación de alimento para ratones con 600mg/mL de *P. freudenreichii* ET-3 durante 28 días y la atenuación de colitis en 47 ratas masculinas y 47 ratas hembras de la raza Sprague–Dawle, estas fueron inducidas por ácido 2,4,6-tribencenosulfónico (TNBS) para el desarrollo de colitis, como resultados se observó que *P. freudenreichii* ET-3 mejora la colitis mediante la aceleración de la cicatrización de las úlceras a través de una regeneración del epitelio del colon, además la producción de DHNA por parte de esta cepa, atenúa la inflamación del colon, no solo mediante el equilibrio del ecosistema bacteriano intestinal sino también por la supresión de la infiltración de linfocitos, obteniendo así un efecto antiinflamatorio sobre la colitis inducida por TNBS en los ratones.

Otro estudio el cual fue realizado en el 2006 por Suzuki *et al.*, su objetivo fue demostrar que una preparación prebiótica denominada, Bifidogénico estimulador de crecimiento (BGS), basada en AGCC producidos por *P. freudenreichii*, podría ser eficaz y segura para el tratamiento de colitis ulcerosa, razón por la cual se intervinieron doce pacientes con colitis ulcerosa moderadamente activa, a quienes se les suministró por vía oral 4.5g de BGS durante 4 semanas, evaluando la respuesta del tratamiento clínicamente y endoscópicamente, además se evaluaron las concentraciones de AGCC y su interacción con BGS. Como principales hallazgos se demostró en los pacientes una mejora en las concentraciones de hemoglobina y albumina de suero, además un aumento de las concentraciones de AGCC la cual se midió después de la ingestión de BGS, siendo significativa solo para butirato, concluyendo así que BGS restaura un equilibrio microbiano, favoreciendo las interacciones competitivas microbianas, para prevenir o tratar la colitis ulcerosa.

6.6.6.2. Tratamiento del síndrome de intestino irritable

Se conoce que múltiples especies de probióticos, pueden tener efectos beneficiosos para el tratamiento del síndrome de intestino irritable. Aunque se han demostrado efectos beneficiosos, no se ha conocido muy bien su mecanismo de acción. Motivo por el cual Kajander *et al.*, en el 2007, querían investigar el modo de acción de una mezcla de probióticos como *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705, *P. freudenreichii* sudesp. *shermanii* y *Bifidobacterium* BB99, mediante el control de sus efectos sobre la microbiota intestinal y marcadores de la actividad microbiana. Los autores realizaron un ensayo doble ciego con un control como placebo, evaluando así a 55 pacientes con síndrome de intestino irritable, a quienes se les suministro una suplementación con una mezcla de estos probióticos durante 6 meses, analizando la composición de la microbiota, los ácidos de reacción en cadena de la polimerasa, los AGCC por cromatografía de gases y las enzimas por espectrofotometría. Como resultados del estudio se evidencio que la microbiota intestinal se mantuvo estable durante el tratamiento y se detectó una disminución de la actividad β -glucuronidasa en el 67% de los sujetos tratados, frente a un 38 % en el grupo placebo (control) y una disminución en la inflamación del intestino; concluyendo de este modo, que la suplementación de la mezcla de estos probióticos y los metabolitos producidos por los mismos, parecen ser responsables del el alivio de los síntomas del síndrome del intestino irritable.

6.6.6.7. Efecto inmunomodulador

Los probióticos presentan un efecto inmunomodulador y en su mayoría han sido estudiados en ciertas enfermedades, como las alergias y las enfermedades inflamatorias, ya que se ha estudiado la capacidad de las bacterias probióticas potencialmente para inducir la producción de citoquinas en cultivos celulares humanos y encontrado también que las bacterias probióticas poseen respuestas inmunes con acción anti-inflamatoria y ayuda a la estimulación del sistema inmunitario. (Kekkonen *et al.*, 2008).

6.6.6.7.1. Acción antiinflamatoria

Se ha observado el efecto de *P. freudenreichii* como modulador del sistema inmune a nivel *in vitro*, en un estudio realizado por Andresen *et al.*, 2009, demostró que *P. freudenreichii* y *P. acidipropioni* inducen la expresión de los ligandos de NKG2D-MICA/B en los linfocitos T activados y AGCC tales como lactato, acetato, butirato y propionato, los cuales pueden ser producidos durante el metabolismo celular y tiene la una función significativa inmunorreguladora.

Otro estudio realizado por Kekkonen *et al* en el 2008 se evaluó el efecto antiinflamatorio de tres cepas probióticas (*L. rhamnosus* GG (LGG) ($1,6 \times 10^{10}$ UFC/mL), *B. animalis* ssp. *lactis* 12 (Bb12) ($1,4 \times 10^8$ UFC/mL) y *P. freudenreichii* sudesp. *Shermanii* ($3,3 \times 10^{10}$ UFC/mL)) suministradas como suplementos en una bebida láctea de 250mL aun grupo aleatorizado de 68 voluntarios entre 23 a 58 años durante 3 semanas, siendo este estudio controlado con placebo a doble ciego, donde se les examinó mediante muestras de sangre, la línea celular roja, la concentración de inmunoglobulinas, la concentración de la proteína C reactiva (PCR) y los niveles de citoquinas a nivel sérico, se evidencio como resultados, al grupo de intervención una reducción del nivel sérico de proteína C reactiva (PCR), linfocitos T y factor IL-2, en comparación con el grupo control, concluyendo que estos marcadores son de respuesta a la inflamación en la fase aguda, este estudio confirma el potencial antiinflamatorio de *P. freudenreichii* sobre el sistema inmune.

6.6.6.7.2. Efectoanti-alergenico

En cuanto al efecto anti-alergenico, Kukkonen et al, en el 2007 realizo un estudio controlado con placebo, doble ciego aleatorizado, el cual querían evaluar como objetivo el efecto de una mezcla de 4 cepas bacterianas probióticas (*L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* 705, *B. breve* BB99 y *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*), junto con prebióticos como galacto-oligosacáridos en la prevención de las enfermedades alérgicas, de este modo se evaluaron 1.223 mujeres en gestación que se les había identificado una gestación de alto riesgo. De esta manera, se seleccionaron aleatoriamente a las mujeres del grupo control y al otro grupo se suplementaron con la mezcla probiótica durante 2 a 4 semanas antes del parto y los neonatos se les siguió suplementando hasta los 6 meses. Posteriormente, se evaluaron a los niños durante dos años, la incidencia de enfermedades alérgicas (alergia a los alimentos, eczema, el asma y la rinitis alérgica) y la sensibilización de IgE, como resultado se encontró que los niños en estudio tendieron a reducir la incidencia de enfermedades asociadas con IgE (atópico), como el eczema atópico, demostrando así que la prevención del eccema atópico en lactantes de alto riesgo es posible mediante la modulación de la microbiota intestinal del lactante con probióticos y prebióticos. Para el 2009 un estudio reportado por Kuitunen *et al.*, el cual continuo con el estudio anterior, donde cinco años después del nacimiento de los niños evaluados por Kukkonen et al, en el 2007, se evaluó la incidencia de enfermedades alérgicas (eczema, alergia alimentaria, la rinitis alérgica y el asma) y la sensibilización de IgE, tuvo como resultados que las frecuencias de la enfermedad alérgica asociada por IgE en los grupos de probióticos y placebo fueron similares, se demostró que se produjo menos enfermedades asociadas IgE, especialmente el eczema, trayendo como conclusión que durante las primeras etapas de la vida, la administración de suplementos probiótico incluyendo bacterias propiónicas parece promover el sistema inmune la maduración, la prevención de las infecciones y las alergias.

6.6.7. *Propionibacterium freudenreichii*, Alimentos Funcionales y Nutraceuticos

Se han mencionado durante esta revisión de la literatura científica el impacto beneficioso de *P. freudenreichii* sobre la salud. Ante este panorama, en la Tabla 5 se presenta una recopilación de los estudios *in vivo* más representativas, donde *P. freudenreichii* fue incluido en matrices alimenticias bajo el desarrollo de alimentos funcionales, así como sus diferentes aplicaciones nutraceuticas.

Tabla 5. Matriz de correlación de estudios in vivo en suplementación con *Propionibacterium freudenreichii*

Efectos para la Salud	Características	Modelo Estudio	Microorganismos	Matriz	Individuos	Duración	Resultados	Conclusión	Referencia
Tolerancia a sales biliares y pH ácidos	Resistencia a tensiones de estrés metabólico	<i>in vivo</i>	Suplementación de 10 ⁹ - 10 ¹⁰ UFC/dL (Propiofidus®SI41)	Cápsulas	Adultos (n:7) (25 - 35 años)	12 semanas	Sobrevivencia de 10 ⁵ y 10 ⁷ UFC/g	Protección gástrica y Adaptación al estrés	Jan et al., 2002
	Resistencia a sales biliares y diferentes niveles de pH	<i>in vivo</i>	Suplementación a 10 ⁷ UFC/mL <i>P.freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	Zumo de Naranja	Adultos (n:22) (20 - 40 años)	2 semanas	Sobrevivencia <3UL/g)	Sobrevivencia a altas concentraciones sales biliares y diferentes niveles de pH	Suomalainen et al., 2008
Modulación de la motilidad	Aumento en frecuencia de evacuación	<i>in vivo</i>	Bioprofit ®	Jugo de Naranja	Adultos varones (n:28) (75 - 90 años)	10 semanas	Aumento del 24 % en la frecuencia de la defecación y reducción de la actividad azorreductasa	Mejora problemas como el estreñimiento y disminuye la actividad de la enzima azorreductasa	Ouwehand et al., 2002
	Aumento de motilidad de colon	<i>in vivo</i>	Suplementación a 10 ¹⁰ UFC/dL Propiofidus SI 26 y SI 41	Cápsulas	Adultos varones (n:18) (20-29 años)	2 semanas	Se halló más rápida motilidad en el colon ascendente	Mejora la motilidad intestinal	Bouglé et al., 1999
Actividades metabólicas y absorción en el intestino	Actividad β-galactosidasa	<i>in vivo</i>	Suplementación de Emmenthal con <i>P.freudenreichii</i>	Queso	Ratones machos albinos	7 días	Actividad de la β-galactosidasa y mejora de los niveles de ácido propiónico en el ciego	Mayor actividad de la β-galactosidasa	Pérez et al., 2005
	Disminución de colesterol sérico	<i>in vivo</i>	Suplementación a 10 ⁸ UFC/mL de <i>P.freudenreichii</i>	Alimento para ratones con leche entera	Ratones	7 días	Efecto hipolipidémico y aumento de la actividad fagocítica de los macrófagos	Impacto favorable del metabolismo de los lípidos y el sistema inmune	Cousin et al., 2011
Producción de Vitaminas	Producción de Vitamina B12 (Cobalamina)	<i>in vitro</i>	Fortificación de kéfir con <i>P. freudenreichii</i> a 1x10 ⁸ UFC/mL	Kéfir	NA	3 días	Producción de vitamina B12 a 186%RDA y folato a 19% RDA en una porción de 200mL	El kéfir como alternativa de producto fortificado en folato y vitamina B12.	Van Wyk et al., 2010
	Producción de Vitamina B2 (Riboflavina)	<i>in vivo</i>	Suplementación a 5x10 ⁸ UFC/mL de <i>P.freudenreichii</i> B374	Yogurt	Ratones con deficiencias de riboflavina, Wistar (n:80)	Tres grupos: 21,28, y 49 días	Se evidenció disminución en retraso en el crecimiento y activación de la glutatión reductasa	La suplementación con riboflavina de ayuda a prevenir el desarrollo de deficiencia de esta vitamina esencial.	LeBlanc et al., 2006
Interacción con la microbiota intestinal	Identificación de componente bifidiogénico (DHNA)	<i>in vivo</i>	Producción de (DHNA) por <i>P.freudenreichii</i>	Capsulas	Ratones	3 semanas	Evidencia de aumento de (MAdCAM-1), IL-1β y la IL-6 por DHNA en ratas con inducción de colitis por DSS	El DHNA interviene el equilibrio de la flora bacteriana intestinal, y reducción de MAdCAM 1	Okada et al., 2006

Efecto antimutagénico	Inhibición de lectinas concanavalina A y jacalin	<i>in vivo</i>	Suplementación a 5x10 ⁸ UFC/mL de <i>P.freudenreichii</i>	Capsulas	Ratones	3 semanas	Eliminación de adherencia de lectinas Con A y AIL a enterocitos	Se evito el toxico contra las células de colon, protegiendo los epitelios intestinales	Zarate <i>et al.</i> , 2009 y 2012
	Reducción de la actividad β-glucosidasa, β-glucuronidasa, azorreductasa y ureasa	<i>in vivo</i>	Suplementación a 2x10 ¹⁰ UFC/mL de (PJS) y (LC705)	Capsulas	Adultos varones (n:38) (24-55años)	4 semanas	Disminución significativa en la actividad de β-glucosidasa de 10 % y ureasa de 13 %	Disminución enzimas por carcinogénicas	Hatakka <i>et al.</i> , 2008
Efecto antiinflamatorio a nivel intestinal	Atenuación de colitis	<i>in vivo</i>	Suplementación con 600mg/mL de <i>P. freudenreichii</i> ET-3	En alimento para ratones	Ratones con colitis Sprague-Dawle inducidos por TNBS (n:94)	28 días	Mejora la colitis mediante la aceleración de la cicatrización de las úlceras	Disminución de colitis y producción de DHNA, atenuando al inflamación del colon	Uchida <i>et al.</i> , 2006
	Atenuación de colitis ulcerosa	<i>in vivo</i>	Suplementación de 4.5g de (BGS), basada en AGCC producidos por <i>P.freudenreichii</i>	Capsulas	Adultos varones (n:12)	4 semanas	Mejora en las concentraciones de Hb, albumina y concentraciones de AGCC.	La ingestión de BGS, restaura el equilibrio microbiano, ayudando a prevenir o tratar la colitis ulcerosa.	Suzuki <i>et al.</i> , 2006
	Tratamiento del Síndrome de intestino irritable	<i>in vivo</i>	Suplementación de una mezcla de probioticos como	Capsulas	Adultos con SII (n:55)	6 meses	Disminución del 67% de la actividad β-glucuronidasa	La suplementación indujo al alivio de los síntomas del SII.	Kajander <i>et al.</i> , 2007
Efecto Inmunomodulador	Acción Antiinflamatoria	<i>in vivo</i>	Suplementación de <i>P. freudenreichii</i> <i>L.rhamnosus</i> GG y <i>B.animalis</i> (Bb12)	Bebida Láctea	Adultos varones (n:68) (23-58 años)	3 semanas	Reducción del nivel sérico de proteína C reactiva (PCR), linfocitos T y factos IL-2	Potencial antiinflamatorio sobre el sistema inmune	Kekkonen <i>et al.</i> , 2008
	Efecto Anti-alergenico	<i>in vivo</i>	Suplementación de <i>P. freudenreichii</i> <i>ssp. shermanii</i> , <i>L.rhamnosus</i> GG y <i>B.animalis</i> (Bb12) junto con galacto-oligosacáridos	Capsulas	Madres gestantes:1.22 3 Bebes en tratamiento:8 91	Madres: 4 semanas antes parto y Bebes: dos años y 5 años	Se evidencio menos enfermedades asociadas IgE, especialmente el eczema, enfermedades alérgicas (rinitis alérgica y asma)	La suplementacion con probiótico promueve el sistema inmune la maduración, la prevención de infecciones y alergias.	Kukkonen <i>et al.</i> , 2007 Kuitunen <i>et al.</i> , 2009

7. CONCLUSIONES

- Se evidenció la viabilidad de *L. helveticus* y *S. thermophilus* durante el proceso de maduración del queso Emmenthal, observando una concentración promedio final del cultivo iniciador para los tratamientos de 7.2 ± 0.91 UL/g el control 8.1 ± 0.23 UL/g el cultivo secundario *P. freudenreichii* subesp. *shermanii* observando una concentración media al final para los tratamientos de 8.9 ± 0.52 UL/g el control 9.3 ± 0.42 UL/g.
- Se demostró un efecto controlador del cultivo iniciador y el secundario, en la reduciendo de la viabilidad *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y mezcla en 5.1 ± 0.56 , $4,8 \pm 1,02$, 8.2 y 3.1 ± 0.89 UL/g respectivamente, durante el proceso de maduración del queso Emmenthal.
- Con relación a los estudios *in vivo* y a las pruebas realizadas *in vitro*, podemos inferir que *Propionibacterium freudenreichii*, posee un alto potencial probiótico en sus características metabólicas, protectoras y tróficas, ya que sobrevive en el ecosistema intestinal de forma prolongada y estable, presenta resistencia a las sales biliares, tiene la capacidad de adhesión y colonización a células epiteliales, produce en su metabolismo componentes antimicrobianos y es también capaz de vivir en tránsito gástrico a pH bajos y temperaturas altas.
- El queso Emmenthal puede ser un vehículo alimenticio propicio para evaluar la inclusión de *P. freudenreichii* como probiótico, el cual se conoce que después de su etapa de maduración alcanza concentraciones de 9.3 ± 0.42 UL/g, de este microorganismo, además es un alimento que presenta las condiciones aptas para el desarrollo de su metabolismo y poder mejorar su valor nutricional.

8. RECOMENDACIONES

- Evaluar *in vitro* la interacción de *L. helveticus*, *S. thermophilus* y *P. freudenreichii* subesp. *shermanii*, en su efecto controlador frente a microorganismos como *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y una mezcla de ellos.
- Al evaluar la presencia de microorganismos en muestras de alimentos como derivados lácteos, siempre se debe realizar Gram para confirmar su identificación microscópica, pues se observó que los medios de cultivo no son totalmente selectivos.
- Se deben estudiar los efectos fisiológicos y como el rol probiótico de *P. freudenreichii* a través de estudios clínicos controlados y con un alto nivel de rigurosidad, que involucren cohortes de humanos en pro de dilucidar completamente el impacto de este microorganismo en la salud.

9. BIBLIOGRAFÍA

- A.S.P.E.N.(2009) Enteral Nutrition Practice Recommendations. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2009 33: 122 originally published online 26 January 2009. 33 (2):122-167
- Aktypis A (2007) Studies on bacteriocin (Thermophilin T) production by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 in batch and fed-batch fermentation modes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92 (2):207-220
- Anastasiou R (2006) Changes in protein synthesis during thermal adaptation of *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii*. *International Journal of Food Microbiology* 108: 301–314
- Andresen L (2009) Propionic acid secreted from propionibacteria induces NKG2D ligand expression on human-activated T lymphocytes and cancer cells. *J Immunol* 183:897–906
- Argañaraz-Martinez E (2013) Physiological and functional characteristics of *Propionibacterium* strains of the poultry microbiota and relevance for the development of probiotic products. *Anaerobe* 23: 27-3
- Arqués J (2005) Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *International Dairy Journal* 15: 893–900
- Ashraf (2011) A review - Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium spp.* In yoghurt. *International Journal of Food Microbiology* 149: 194–208
- Avila M (2005) Effect of milk inoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. *J Food Prot* 68(5):1026-33
- Baer A (1995) Influence of casein proteolysis by starter bacteria, rennet and plasmin on the growth of propionibacteria in Swiss-type cheese. *Lait* 75: 391-400
- Bamforth Ch (2007) Alimentos: fermentación y microorganismos. Editorial Acribia S.A Zaragoza (España)
- Beresford T (2001) Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11: 259–274
- Bigliardi B (2013) Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science and Technology* 31: 118-129
- Bouglé D (1999) Effect of Propionibacteria Supplementation on Fecal Bifidobacteria and Segmental Colonic Transit Time in Healthy Human Subjects. *Scand.J.Gastroenterol* 34 (2) :144-148
- Bourdichon F (2012) Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*. 154: 87–97
- Brede D (2004) A bacteriocin from *Propionibacterium freudenreichii*, *Applied and Environmental Microbiology Molecular and genetic characterization of Propionicin F* 70: 7303–7310.
- Bruno M (1993) Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 3003-3010
- Calderón O (2007). Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*
- Cardoso F (2004) Enhancement of trehalose production in dairy propionibacteria through manipulation of environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 91: 195– 204
- Cardoso F (2007) Biochemical and genetic characterization of the pathways for trehalose metabolism in *Propionibacterium freudenreichii*, and their role in stress response. *Microbiology* 153: 270
- Catering (2007) Informe lácteos, derivados y huevos: De la granja al plato. *Catering* No 5 Ed.22
- Chamba J (2002) Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese. *Lait* 82 (1): 33-44
- Champagne (2010) Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage. *Food Microbiol.* 27(7):968-72
- Charlier C (2009) Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 131: 30–39

Contextoganadero (2013) Consumo per cápita de queso en Colombia es de 1.1 kilos. Rev. [HTTP://CONTEXTOGANADERO.COM/ECONOMIA/CONSUMO-CAPITA-DE-QUESO-EN-COLOMBIA-ES-DE-11-KILOS](http://contextoganadero.com/economia/consumo-capita-de-queso-en-colombia-es-de-11-kilos)

Cortés M (2000) Importancia del ácido fólico en la medicina actual. *Rev. méd. Chile* (128) 2: 213-220
Cousin F (2012) The first dairy product exclusively fermented by *Propionibacterium freudenreichii*: A new vector to study probiotic potentialities in vivo. *Food Microbiology* 32: 135-146

Cortés M (2000) Importancia del ácido fólico en la medicina actual. *Rev. méd. Chile* 128 (2): 213-220

Cousin F (2012) The first dairy product exclusively fermented by *Propionibacterium freudenreichii*: A new vector to study probiotic potentialities in vivo. *Food Microbiology* 32: 135-146

Cousin F (2011) Dairy propionibacteria as human probiotics: A review of recent evidence. *Dairy Science and Technology* 91:1-26

Crow V (1987) Citrate Cycle Intermediates in the Metabolism of Aspartate and Lactate by *Dairy Science and Technology* 89: 31-41

Daly D (2010) A review: Split defect and secondary fermentation in Swiss-type cheeses. *Dairy Sci. & Technol* 90: 3-26

Darilmaz D (2012) Acid-bile, antibiotic resistance and inhibitory properties of propionibacteria isolated from Turkish traditional home-made cheeses. *Anaerobe* 18: 122-127

Delgado S (2011) Identification, typing and characterisation of *Propionibacterium* strains from healthy mucosa of the human stomach. *International Journal of Food Microbiology* 149: 65-72

Demarigny Y (1997) Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses : II. Biochemical and sensory characteristics. *Lait* 77: 151

Deutsch S (2008) Capsular exopolysaccharide biosynthesis gene of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *International Journal of Food Microbiology* 125: 252-258

Dherbécourt J (2008) Production of branched-chain aroma compounds by *Propionibacterium freudenreichii*: links with the biosynthesis of membrane fatty acids. *Journal of Applied Microbiology* ISSN: 1364-5072

Downes J (2009) *Propionibacterium acidifaciens*, isolated from the human mouth. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2778-2781

EAN (2011) Encuesta Anual Manufacturera. Indicadores Encuesta Anual Manufacturera 2000 – 2011

ENSIN (2010) Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia

Eyjolfson V (2004) Conjugated linoleic acid improves insulin sensitivity in young, sedentary humans. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36:814-820

Falentin H (2010) The Complete Genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1 T, a Hardy Actinobacterium with Food and Probiotic Applications. *Public Library of Science*(7):1-12

FAO/OMS (2006) Evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, 2006. Consultado el 6 de Abril del 2014 en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>

Fontaine L (2008) The Inhibitory Spectrum of Thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 Dependson the Production of Multiple Peptides and the Activity of BlpGST, a Thiol-Disulfide Oxidase.

Fröhlich M (2002) Interaction between propionibacteria and starter / non-starter lactic acid bacteria in Swiss-type cheeses. *Lait* 82 (2): 1-15

Gagnaire V (2004) Survey of bacterial proteins released in cheese: a proteomic approach. *International Journal of Food Microbiology* 94: 185-201

Gaullier J. (2004) Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 7:1118-1125

Gautier M (1999) Bacteriophages of dairy propionibacteria. *Lait* 79: 93-104

Gilbreth S (2005) A bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* ST110. *Current Microbiology* 51(3):175-1

- Gomes da Cruz A (2009) Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science and Technology* 20: 344-354
- González L (2010) Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. *Food Microbiology* 27: 592-
- Gonzalez L (2011) Lectina: una biomolécula que promete en las ciencias biomédicas. *Ciencias Médicas* 15(2): 3-12
- Grappin R (1999) Advances in the biochemistry and microbiology of Swiss-type cheeses. *Lait* 79: 3
- Gratz S (2005) Aflatoxin B-1 binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: in vitro versus ex vivo. *J Food Prot* 68:2470-2474
- Gutierrez R (2005). Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de *E. coli*, *Salmonella sp.* y *Listeria monocytogenes*. (Spanish). *CENIC Ciencias Biológicas*
- Gutierrez R (2008) Determinación del potencial bactericida In vitro de un aislado nativo de *Lactobacillus casei* frente *E. coli*. (Spanish). *Lasallista De Investigación* 5(2): 68-73
- Gwiazdowska D (2006) Antimicrobial activity and stability of partially purified bacteriocins produced by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* and ssp. *Shermanii*. *Lait* 86: 141-154
- Hashiba (1992) Establishment of a host-vector system in *Lactobacillus helveticus* with beta-galactosidase activity as a selection marker. *Biosci Biotechnol Biochem* (2):190-4
- Hatakka K (2008) The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. *International Dairy Journal* 17: 1290-1297
- Holo H (2002) Bacteriocins of propionic acid bacteria. *Lait* 82 (1): 59-68
- Huang Y (2004) In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology* 91:253-260
- Huang Y (2003) An in vitro model for investigating intestinal adhesion of potential dairy propionibacteria probiotic strains using cell line C2BBE1. *Applied Microbiology* 36:213-216
- Huang Y (2004) In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology* 91:253-260
- Hughenoltz J (2002) Nutraceutical production by propionibacteria. *Lait* 82(1): 103-112
- Hughenoltz J (2002) Nutraceutical production by propionibacteria. *Lait* 82(1): 103-112
- Hugenschmidt S (2011) Concurrent high production of natural folate and vitamin B12 using a co-culture process with *Lactobacillus plantarum* SM39 and *Propionibacterium freudenreichii*. *Process Biochemistry* 46: 1063-1070
- INTI (2005) Elaboración de Quesos de pasta semidura. Cuadreno Tecnológico N°3 Lácteos. Instituto de tecnología Industrial. Sede Buenos Aires
- ISO 11290-2:2004 Procedimiento enumeración *Listeria monocytogenes* en alimentos
- ISO 4833:2003 Specifies a horizontal method for the enumeration of microorganisms, by counting the colonies growing in a solid medium after aerobic incubation at 30 degrees Celsius.
- ISO 6888-1:2000 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa-positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Parte 1: Técnica que utiliza el medio agar de Baird-Parker.
- Jan G (2000) Acid stress susceptibility and acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*. *Lait* 80(3): 325-336
- Jan G (2002) Survival and beneficial effects of propionibacteria in the human gut: in vivo and in vitro investigations. *Lait* 82(1): 131-144
- Joerger R (2003). Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *Poultry Science*: 640 – 647

- Kabuki T (2007) Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. *Journal Of Applied Microbiology* 102(4):971-980
- Kajander (2007) Effects of multispecies probiotic supplementation on intestinal microbiota in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 26: 463–473
- Kekkonen (2008) Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World J Gastroenterol* 14:2029–2036
- Kosmider A (2012) Vitamin B 12 production from crude glycerol by *Propionibacterium freudenreichii* sp. *shermanii*: Optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Bioresource Technology* 105: 128–133
- Kuitunen M (2009) Probiotics prevent IgE-associated allergy until age 5 years in cesarean-delivered children but not in the total cohort. *J Allergy Clin Immunol* 123:335–341
- Kukkonen K (2007) Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 119:192–198
- Lardoeft F (2005) Fundamentos del ácido fólico en la prevención primaria farmacológica de defectos congénitos. *Med Gen Integr* 21: 1-2
- LeBlanc J (2006) A novel dairy product fermented with *Propionibacterium freudenreichii* improves the riboflavin status of deficient rats. *Nutrition* 22: 645–651
- Leroy F (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry.
- López (2008) Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Ciencias Farmacéuticas* 39(3): 49-57
- Lortal S (2005) Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal* 15: 857–871
- Lucas A (2006) Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest. *Lait* 86:21-41
- Malashree (2012) β -Glucosidase Activity of Lactobacilli for Biotransformation of Soy Isoflavones. *Food Biotechnology* 26:154–163
- Marilley L (2004) Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* 90: 139 – 159
- Martín Del Campo (2009) Initial studies into the characterization of ripening stages of Emmental cheeses by mid-infrared spectroscopy *Dairy Sci. Technol.* 89: 155–167
- Martinez D V (2001) Efecto de la administración semanal de ácido fólico sobre los valores sanguíneos. *Salud pública México* vol.43: n.2 pp. 103-107
- Mc Sweeney P (2000) A review: Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening. *Lait* 80: 293-324
- Meile L (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*.
- Meurice G (2004) Whole genome sequencing project of a dairy *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* genome: progress and first bioinformatic analysis. *Lait* 84:15-24
- Michalski M (2007) Functionality of smaller vs control native milk fat globules in Emmental cheeses manufactured with adapted technologies. *Food Research International* 40: 191–202
- Mitsuyama K (2007) Treatment of ulcerative colitis with milk whey culture with *Propionibacterium freudenreichii*. *J Intest Microbiol* 21:143–147
- Mufandaedza J (2006) Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains.
- Murad (2011) Utilization of UF-permeate for production of beta-galactosidase by lactic acid bacteria. *Pol J Microbiology* (2):139-44
- Murooka Y (2005) An overview. Production of tetrapyrrole compounds and vitamin B12 using genetically engineering of *Propionibacterium freudenreichii* *Lait* 85: 9-22

- Myllyluoma E (2008) Effects of multispecies probiotic combination on *Helicobacter pylori* infection in vitro. *ClinVaccineImmunol* 15:1472– 1482
- NTC 4458:2007 Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos.
- OAC (2006) Observatorio Agrociencias Colombia Secretaria Técnica del consejo nacional de la Leche. Segundo Informe. Consultado el 10 de Abril del 2014 en: <http://www.redlactea.org/documentos/Inf%2y%202%202006.pdf>
- Okada Y (2006) *Propionibacterium freudenreichii* component 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) attenuates dextran sodium sulphate induced colitis by modulation of bacterial flora and lymphocyte homing.
- Olveira F (2007) Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutr Hosp.* 22(Supl. 2):26-34
- Ortega J (2010) Infección por *Helicobacter pylori* en pacientes sintomáticos con patología gastroduodenal benigna: Análisis de 5.664 pacientes. *Chile* 138(5): 529-535
- Ouwehand A (2002a) Effect of probiotics on constipation, fecal azoreductase activity and fecal mucin content in the elderly. *Annals of Nutrition and Metabolism* 46:159–162
- Ouwehand A (2002b) In vitro adhesion of propionic acid bacteria to human intestinal mucus. *Lait* 82 (1): 123-130
- Parra H (2010) Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Bio.Agro.*8(1): 93-105
- Parra R (2010) Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de ciencias Agropecuarias* 8:93-105
- Paz R (2006) Manejo, prevención y control de la anemia megaloblástica secundaria a déficit de ácido fólico. *Nutr. Hosp.* vol.21: n.1 pp. 113-119
- Pérez (2013) Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en pacientes con cáncer. *Rev Hosp Jua Mex* 80(1): 20-27
- Pérez A (2005) Dairy propionibacteria from milk or cheese diets remain viable and enhance propionic acid production in the mouse cecum. *Lait* 85: 85-98
- Piveteau P (1995) Interactions between lactic and propionic acid bacteria. *Lait* 75: 331-343
- Piveteau P (1999) Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. *Lait* 79: 23-41
- Piveteau P (2002) Characterisation of the stimulants produced by *Lactobacillus helveticus* in milk for *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *Applied and Environmental Microbiology* 2600-2600
- ProChile (2008) Perfil de mercado quesos – Colombia Rev. *ProChile Bogota* Nov 2008.
- Dalmasso M (2011) Multilocus sequence typing of *Propionibacterium freudenreichii*. *International Journal of Food Microbiology* 145: 113–120
- Rainio A (2002) Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Lait* 82 (1): 91-101
- Richoux R (2009) Impact of the proteolysis due to lactobacilli on the stretchability of Swiss-type cheese.
- Rivera-Espinoza Y (2010) Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* 27: 1–11
- Robinson R (1995) A color guide to Cheese and fermentes milks. *Champangand & Hall*. Hong Kong 1995
- Rodrigues D (2012) Lipolysis in probiotic and synbiotic cheese: The influence of probiotic bacteria, prebiotic compounds and ripening time on free fatty acid profiles. *Food Chemistry* 131: 1414–1421
- Rossi F (2013) Diversity of *Streptococcus thermophilus* in bacteriocina production: inhibitory spectrum and occurrence of thermophilin genes. *Food Microbiology* 35(1):27-33
- Sanchez C (2007) Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en población sana en la Comunidad de Madrid. *Enferm. dig.* 99 (9): 497-501
- Saraoui T (2013) A unique in vivo experimental approach reveals metabolic adaptation of the probiotic
- Settanni L (2010) Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*

Shah N (2007) Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* 17: 1262-1277

Sikorska H (2013) Role of probiotics in the prevention and treatment of met icillin-resistant

Speranza B (2009) Non starter lactic acid bacteria biofilms: A means to control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Food Microbiology* 27: 1-11

Staphylococcus aureus infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* Vol. 42 Issue 6:475-481

Suomalainen T (2008) In vitro and in vivo gastrointestinal survival, antibiotic susceptibility and genetic identification of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS. *International Dairy Journal* 18: 271-278

Suzuki A (2006) Bifidogenic growth stimulator for the treatment of active ulcerative colitis: a pilot study.

Tharmaraj N (2009) Antimicrobial effects of probiotic bacteria against selected species of yeasts and moulds in cheese-based dips. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 1916-1926

Thierry A (2002) Production of cheese flavor compounds derived from amino acid catabolism by

Thierry A (2004a) Varied volatile compounds are produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Emmental cheese. *Food Chemistry* 87: 439-446

Thierry A (2004b) A simple screening method for iso-valeric acid production by *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss cheese. *International Dairy Journal* 14: 697-700

Thierry A (2005) *Propionibacterium freudenreichii* strains quantitatively affect production of volatile compounds in Swiss cheese. *Lait* 85 (1-2): 57-74

Thierry A (2011) New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *Trends in Food Science & Technology* 15: 67-78

Uchida M (2005) Milk whey culture with *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 is effective on the colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *J Pharmacol. Science* 99 (4): 329-334.

Uchida M (2011) Safety evaluation of *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 culture. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 60:249-261

Van Hylckama V (2007) Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits.

Van Wyk J (2011) Optimisation of vitamin B12 and folate production by *Propionibacterium freudenreichii* strains in kefir. *International Dairy Journal*. 21: 69-74

Warminska I (2002) Possibilities for stimulation of *Bifidobacterium* growth by propionibacteria. *Lait* 82 (1):113-121

White S (2003) Effect of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*

Wood H, (1981) Metabolic cycles in the fermentation of propionic acid bacteria, in: Current topics in cellular regulation. *Academic*. 255-287

Wouters J (2002) Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* 12: 91-109

Wu Q (2012) Changes in growth and survival of *Bifidobacterium* by co-culture with *Propionibacterium* in soy milk, cow's milk, and modified MRS medium. *International Journal of Food Microbiology* 157: 65-72

Yeneisy (2003) Estado nutricional y vitaminas B1 y B2 en ancianos no institucionalizados. *Salud Pública*. 29(3): 209-214

Zarate G (2000) Viability and beta-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *J Food Prot* 63:1214-1221

Zarate G (2002) Adhesion of dairy propionibacteria to intestinal epithelial tissue in vitro and in vivo.

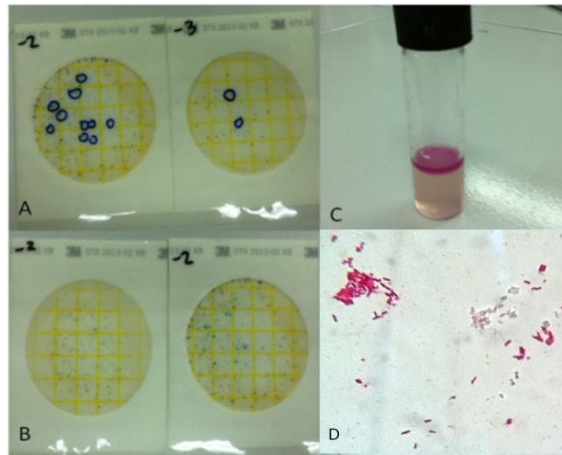
Zarate G (2009) Dairy bacteria remove in vitro dietary lectins with toxic effects on colonic cells. *J Appl Microbiol* 106:1050-105

Zarate G (2012) Feeding with dairy *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 reduces the incidence of Concanavalin-A induced alterations in mouse small intestinal epithelium. *Food Research International* 47: 13-22

Zhang T (2013) Molecular cloning and antimicrobial activity of enterolysin A and helveticin J of bacteriolysins in the genome of Chinese traditional fermented foods. *Food Control* 31(2): 499 - 507

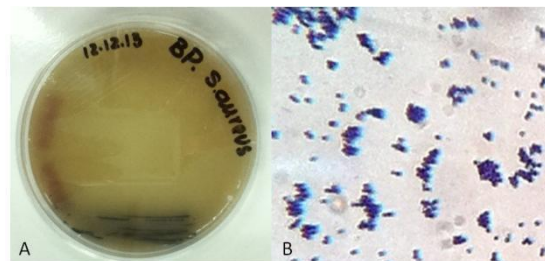
ANEXOS

Anexo 1. Evidencia Fotográfica



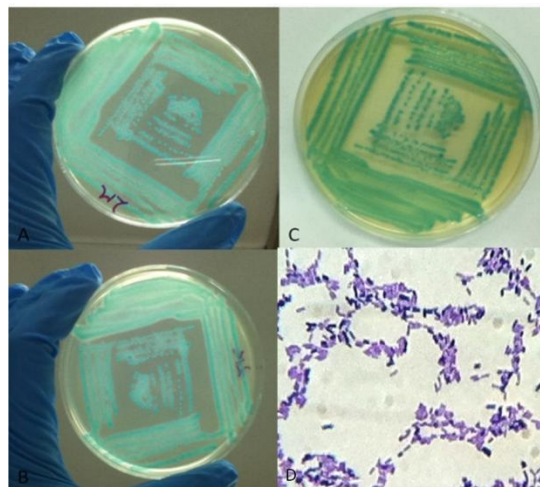
Identificación de *Escherichia coli*.

(A) y (B) Colonias azules en PetrifilmTM 3MTM Selective *E. coli* Count Plate, (C) Prueba Indolen Agua Triptonay (D) Bacilos cortos Gram Negativos (100x). Fuente: Autor



Identificación de *Staphylococcus aureus*.

(A) Colonias negras en Agar Baird Parker, (B) Cocos en forma de racimo Gram Positivos (100x). Fuente: Autor



Identificación de *Listeria monocytogenes*.

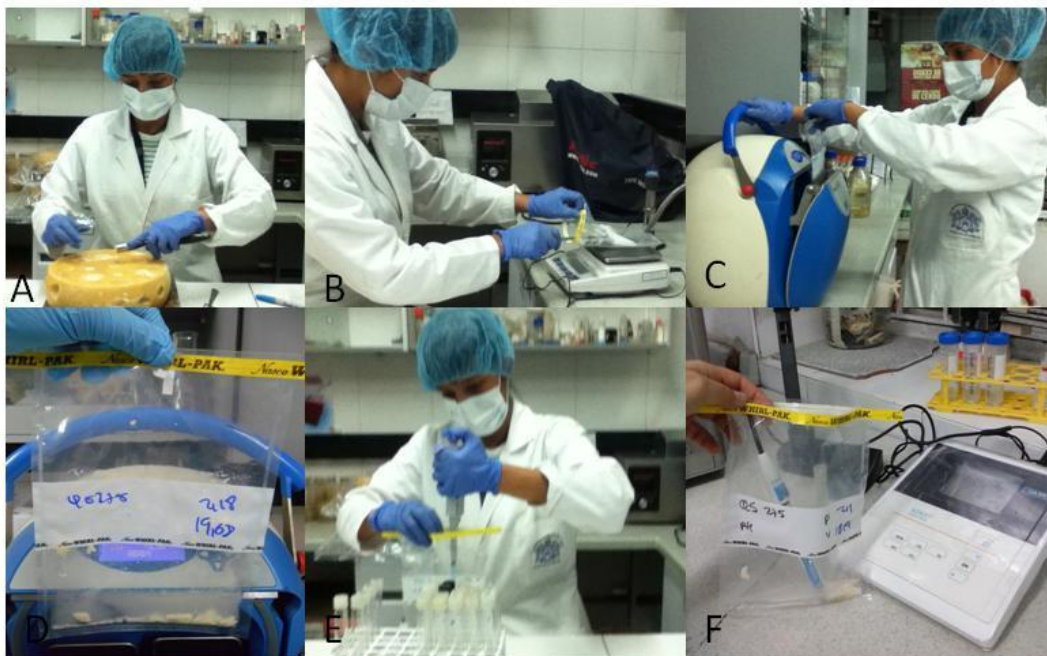
(A) Visión Posterior, (B) y (C) Visión Frontal, (D) Bacilos cortos Gram Positivos (100x). Fuente: Autor



Cinco tortas de queso Emmenthal tamaño a escala en inicio de maduración.
Fuente: Autor

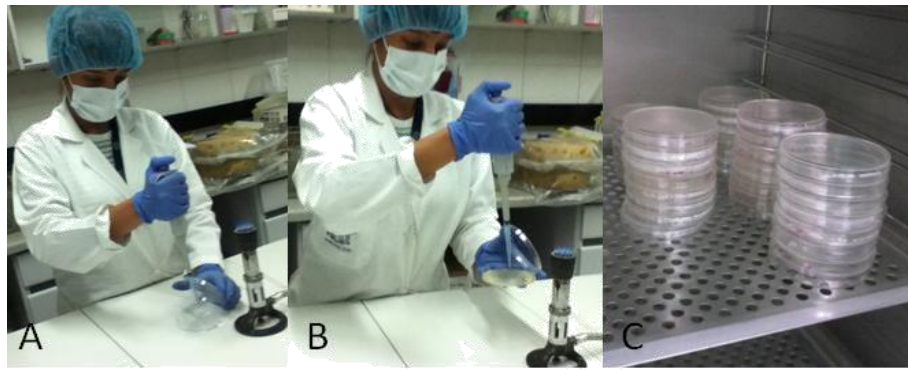


Equipos empleados para control de Temperatura y Humedad.
(A) Termohigrómetro y (B) Humificador. Fuente: Autor

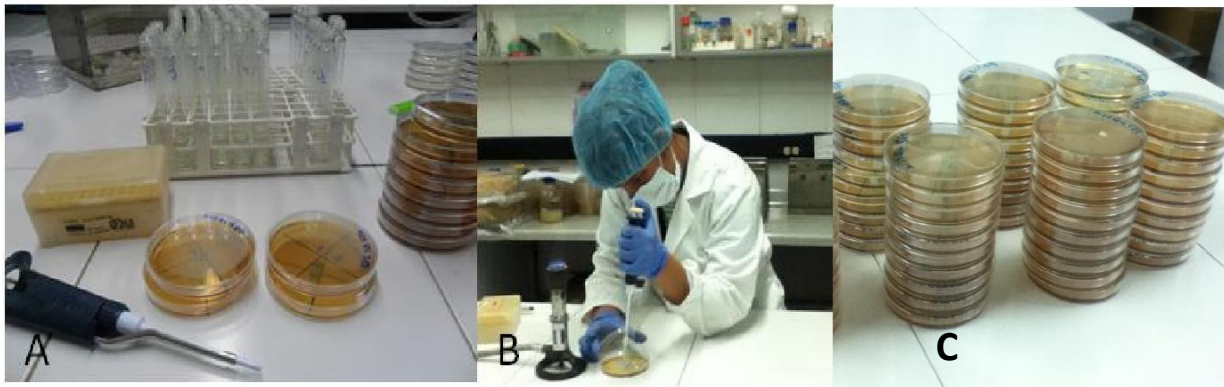


Preparación de la Muestra.

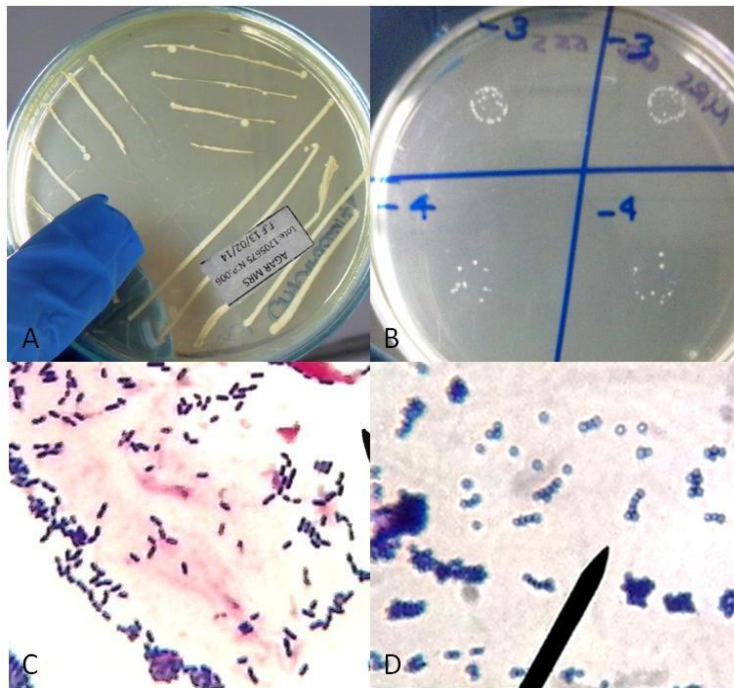
(A) Toma de muestra, (B) Corte y Peso de la muestra, (C) Homogenizar en un Stomacher, (D) Muestra Homogenizada y Rotulada, (E) Diluciones Seriadas y (F) Medición de pH. Fuente: Autor



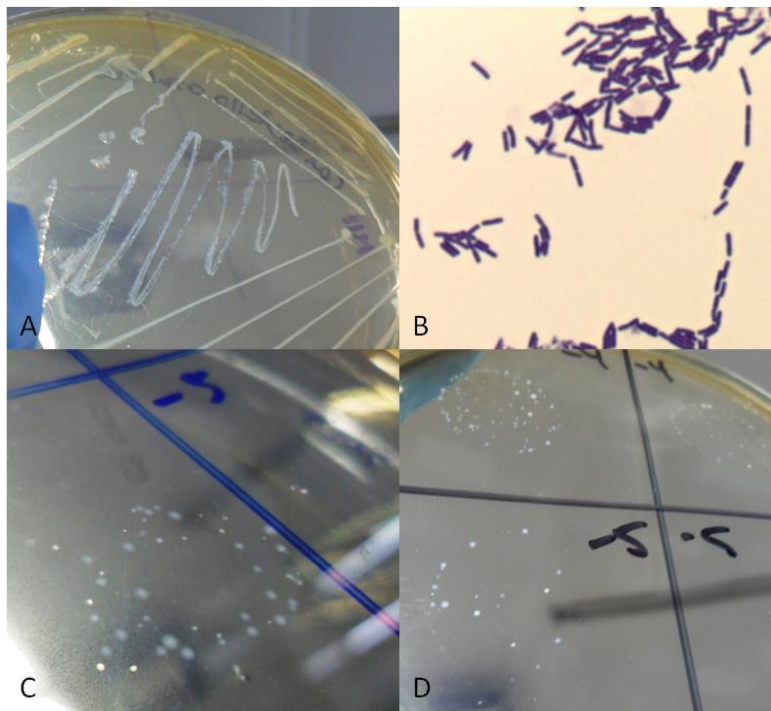
Análisis de Viabilidad de microorganismos co-inoculados.
 (A) Siembra en Profundidad, (B) Siembra en Superficie y (C) Incubación Fuente: Autor



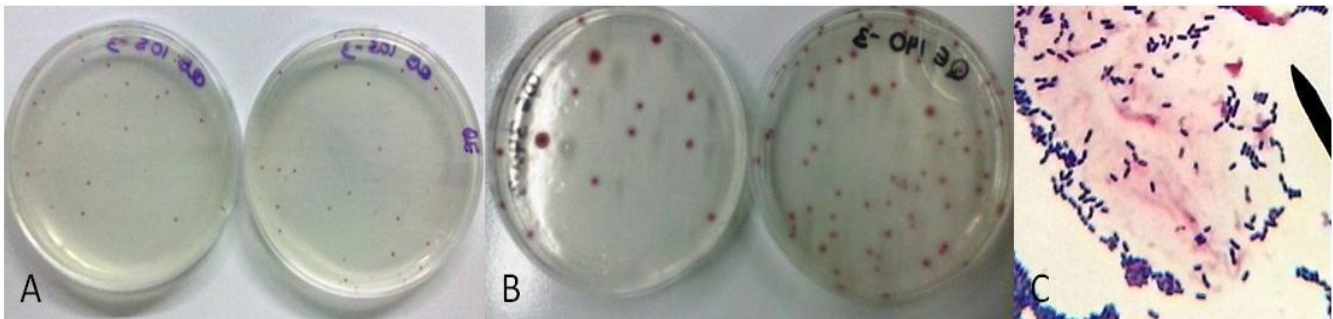
Análisis de Viabilidad de Cultivo iniciador y secundario.
 (A) Materiales, (B) Técnica de microgota y (C) Cajas para recuento. Fuente: Autor



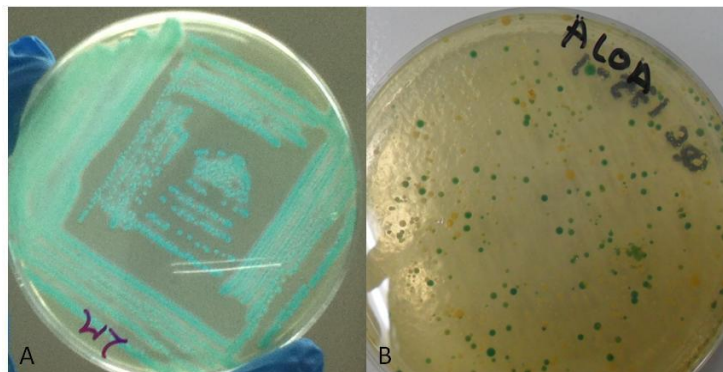
Características de crecimiento de *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus thermophilus* en medio MRS. (A) Cepa Control, (B) Técnica microgota, (C) Bacilo Gram Positivo (100x) y (D) Cocos en cadena Gram Positivo (100x) Fuente: Autor



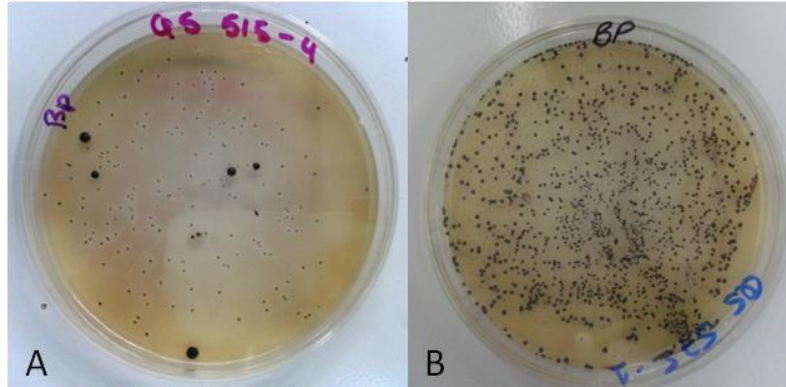
Características de crecimiento de *Propionibacterium freudenreichii* subesp. *shermanii* en medio M-17 + 0.05% de Tween®80. (A) Cepa control, (B) Bacilo Gram Positivo (100x) (C) Crecimiento característico (D) Técnica microgota. Fuente: Autor



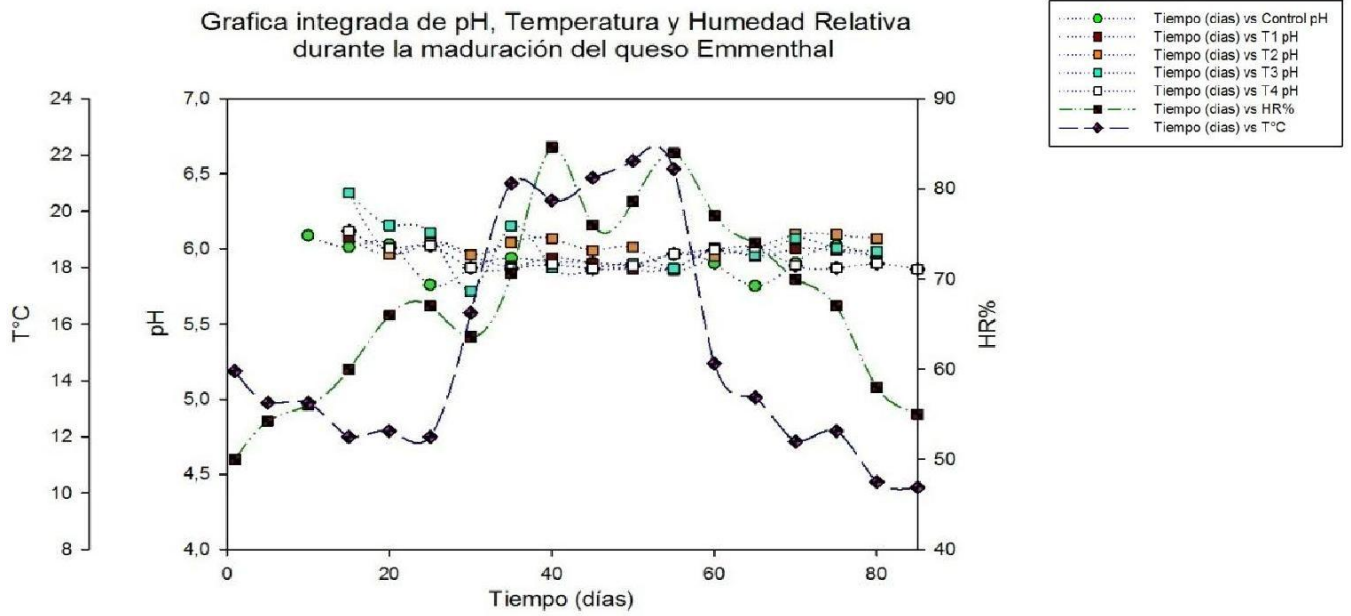
Crecimiento de bacilos gram positivos en medio Chromocult (A) Día 5, (B) Día 40 Y (C) Bacilos Gram positivos (100x) Fuente: Autor



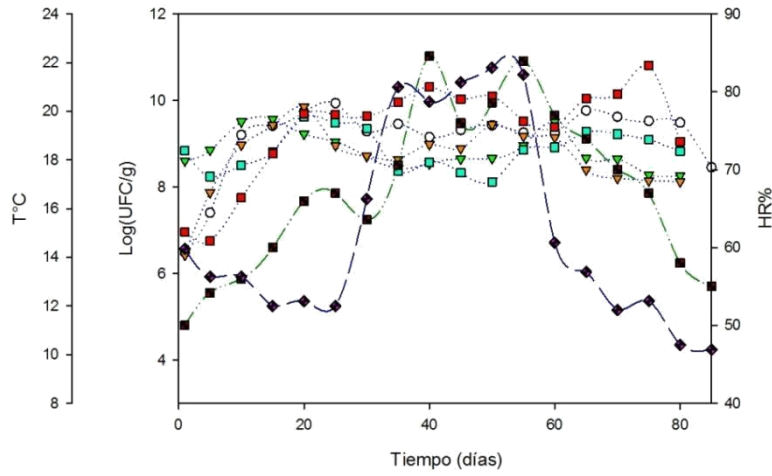
Crecimiento de bacilos gram positivos en medio ALOA (A) Cepa control y (B) Día 75 Fuente: Autor



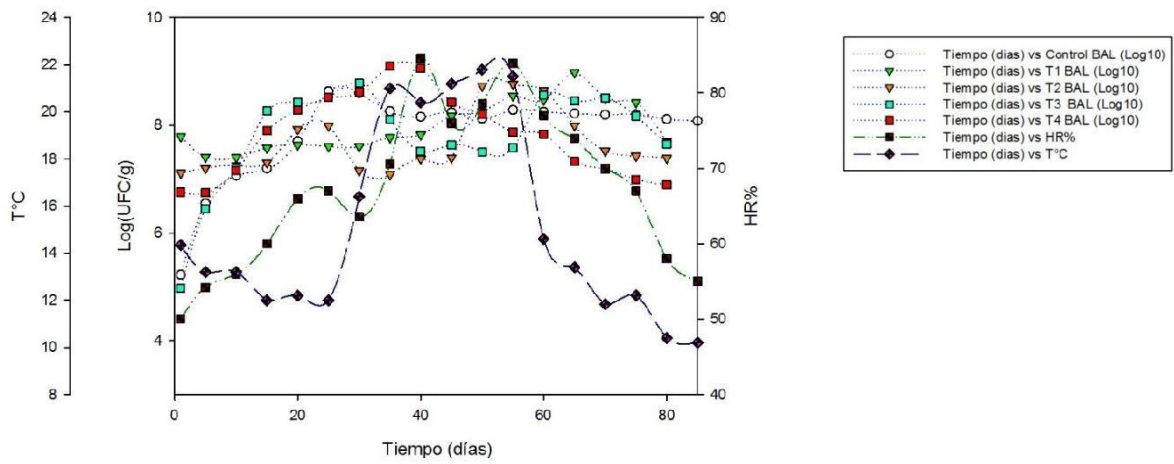
Crecimiento de BAL en medio Baird Parker
 (A) *S.aureus* día 15 y (B) BAL día 75 Fuente: Autor



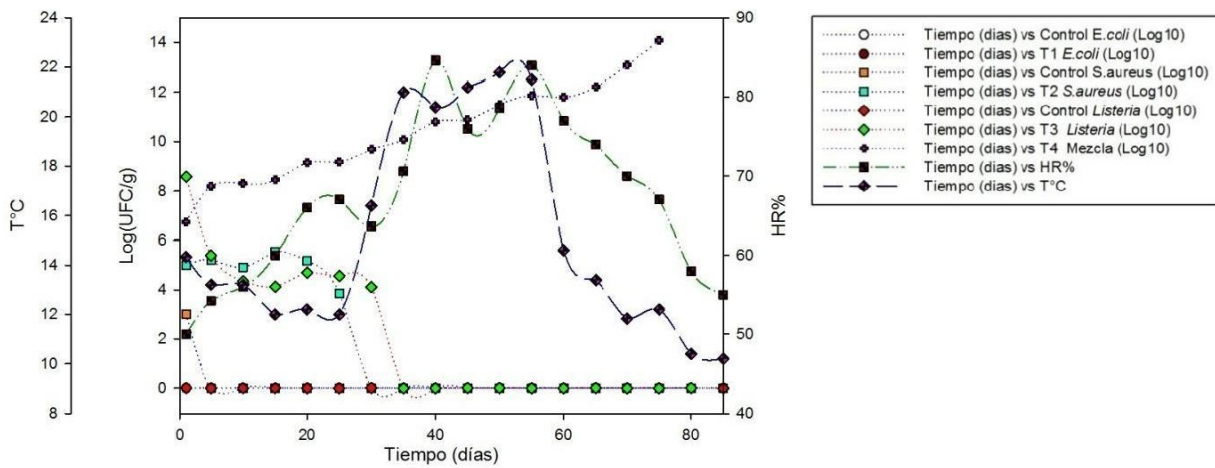
Grafica integrada de la viabilidad de pH, temperatura y humedad relativa, durante el proceso de maduración del queso Emmenthal y su interacción sobre las variables



Grafica integrada de la viabilidad de *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* durante el proceso de maduración del queso Emmenthal y su interacción sobre las variables temperatura y humedad relativa



Grafica integrada de la viabilidad de *Lactobacillus helveticus* y *Streptococcus thermophilus* durante el proceso de maduración del queso Emmenthal y su interacción sobre las variables temperatura y humedad relativa



Grafica integrada de la viabilidad de microorganismos co-inoculados durante el proceso de maduración del queso Emmenthal y su interacción sobre las variables temperatura y humedad relativa

Anexo 2. Medios de Cultivos

Caldo Triptona		Caldo BHI		Caldo TSAYE	
Componente	(g/L)	Componente	(g/L)	Componente	(g/L)
Triptona	10	Infusión de cerebro y corazón de (sólidos)	8	Peptona tripticasa	15
Cloruro de Sodio	5	Digerido péptico de tejido animal	5	Peptona fitona	5
		Digerido pancreático de caseína	16	Extracto de levadura	0.6%
		Cloruro sódico	5	NaCl	5
		Glucosa	2		
		Fosfato disódico de hidrógeno	2.5		
Medio MRS		Medio M-17 + 0.05% de Tween® 80		Medio Baird Parker	
Componente	(g/L)	Componente	(g/L)	Componente	(g/L)
Proteosa Peptona N° 3	10	Caseína Pancreática	5	Triptona	10
Extracto de Carne	10	Peptona de soya	5	Extracto de carne	5
Extracto de Levadura	5	Extracto de carne	5	Extracto de levadura	1
Glucosa	20	Extracto de levadura	2.5	Cloruro de Litio	5
Monoleato de Sorbitán	1 mL	Acido ascórbico	0.5	Glicina	1
Fosfato Dipotásico	2	Sulfato de Magnesio	0.25	Piruvato sódico	12
Acetato de Sodio	5	Disodio de β-glicerofosfato	19	Telurito potásico	10
Citrato de Amonio	2	Tween® 80	0.05%	Agar	0.1
Sulfato de Magnesio	0.2	Agar	11	Emulsión de yema de huevo	50mL
Sulfato de Manganeso	0.05				
Medio Chromocult		Medio ALOA		Medio PlateCount	
Componente	(g/L)	Componente	(g/L)	Componente	(g/L)
Peptona	3	Peptona de Carne	18	Triptona	5
Cloruro de Sodio	5	Litio Cloruro	10	Dextrosa	1
Fosfato di hidrogeno de sodio	2.2	Extracto de Levadura	10	Extracto de Levadura	2.5
di-Sodio Hidrógeno Fosfato	2.7	Triptona	6	Agar	12
Piruvato de sodio	1	Sodio Cloruro	5		
Triptofano	1	di-Sodio Hidrógeno Fosfato	2.5		
Sorbitol	1	Glucosa	2		
Tergitol	0.15	Sodio Piruvato	2		
Mezcla cromógena	0.4	Magnesio Glicerofosfato	1		
Agar	10	Magnesio Sulfato	0.5		
		X-Glucosido	0.05		
		Agar	13.5		

Anexo 3. Estadística descriptiva de Microorganismos

1.1 Estadística descriptiva de Microorganismos en etapa de producción

ANOVA de un factor

ONEWAY LogControlBAL LogE.coliBAL LogS.aureusBAL LogListeriaBAL LogMezclaBAL BY Tiempo
/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS.

Fecha: 17-may-2014 20:10:06 Tiempo de procesador 00 00:00:00,015

Recuento en Placa	Etapa en Planta	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<i>E.coli</i>	1	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,0000000	,0000000
	2	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,0000000	,0000000
	3	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,0000000	,0000000
	4	2,438621825	,3213340881	,1606670440	1,927307584	2,949936066	2,0000000	2,6989700
	5	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,0000000	,0000000
	Total	,304827728	,8254780474	,1459252813	,007211155	,602444301	,0000000	2,6989700
<i>S.aureus</i>	1	4,164305233	,0877939871	,0358417452	4,072171094	4,256439372	4,0669470	4,2632413
	2	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,0000000	,0000000
	3	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,0000000	,0000000
	4	3,290157133	,1366846175	,0558012614	3,146715424	3,433598842	3,1549020	3,4559320
	5	2,635910380	,2510420311	,0793864607	2,456325729	2,815495031	2,3010300	2,9542425
	Total	2,090761118	1,6565318743	,2840928727	1,512769822	2,668752413	,0000000	4,2632413
<i>Listeria</i>	1	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	2	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	3	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	4	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	5	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	Total	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
BAL	1	,000000	,0000000	,0000000	,000000	,000000	,0000	,0000
	2	,000000	,0000000	,0000000	,000000	,000000	,0000	,0000
	3	2,899667	2,9429509	1,2014547	-,188771	5,988104	1,0000	6,6990
	4	5,138300	,1083767	,0442446	5,024566	5,252034	5,0000	5,2258
	5	5,194320	,3342411	,1056963	4,955218	5,433422	4,9031	5,7975
	Total	2,946206	2,6280270	,4507029	2,029244	3,863168	,0000	6,6990
BAP	1	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,000000000	,0000000	,0000000
	2	,347130900	,5377728779	,2195448580	-,217227124	,911488924	,0000000	1,0413927
	3	7,915252533	,1771574277	,0723242170	7,729337215	8,101167852	7,7403626	8,1303340
	4	7,439901667	,3410019458	,1392134614	7,082042072	7,797761262	7,0000000	7,6746106
	5	6,804304540	,2933525177	,0927662113	6,594452791	7,014156289	6,4134520	7,1721250
	Total	4,772257529	3,4831045377	,5973475001	3,556944903	5,987570156	,0000000	8,1303340

Etapas en planta: 1. Leche Cruda / 2. Leche termizada / 3.Coagulación final / 4. Prensado inicial/ 5. Inicio de maduración

1.2 Estadística descriptiva de Bacterias Acido Lácticas

ANOVA de un factor

ONEWAY LogControlBAL LogE.coliBAL LogS.aureusBAL LogListeriaBAL LogMezclaBAL BY Tiempo
/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS.

Fecha: 16-may-2014 01:09:15 Tiempo de procesador 00 00:00:00,015

Ensayo	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
				Límite inferior	Límite superior			
Control	1	5,190406240	,2072739018	,0926957069	4,933041698	6,898999244	5,0212678	5,3735805
	5	6,306346800	,4773050079	,2134572887	5,713694356	6,898999244	5,7781510	7,0791810
	10	6,965175700	,3825864951	,1710978820	6,490131823	7,440219577	6,3590220	7,2632413
	15	7,189465240	,1184446742	,0529700686	7,042396752	7,336533728	7,0000000	7,2787538
	20	7,621170180	,2949208728	,1318926239	7,254977550	7,987362810	7,3651476	8,0413920
	25	8,558065800	,3206897738	,1434168268	8,159876853	8,956254747	8,0202040	8,8750610
	Total	6,971771660	1,1062781678	,2019778358	6,558680603	7,384862717	4,8336687	8,8750610
	30	8,539191250	,2436781505	,1218390753	8,151444935	8,926937565	8,3979400	8,9030900
	35	8,246942000	,1225700430	,0548149896	8,094751190	8,399132810	8,0606980	8,3710680
	40	8,156795900	,0409441478	,0183107796	8,105957026	8,207634774	8,1139430	8,2174835
	45	8,230479800	,0971345244	,0434398799	8,109871358	8,351088242	8,1461280	8,3979400
	50	8,119514600	,0671203760	,0300171447	8,036173646	8,202855554	8,0606980	8,2304490
	55	8,280551400	,0539574294	,0241304960	8,213554403	8,347548397	8,2304490	8,3651480
	Total	8,252695983	,1671018487	,0310300343	8,189133839	8,316258127	8,0606980	8,9030900
	60	8,23368380	,127563607	,057048179	8,07529266	8,39207494	8,079182	8,431364
	65	8,19145660	,167122437	,074739426	7,98394669	8,39896651	8,019305	8,442907
	70	8,00022480	,531453447	,237673207	7,34033819	8,66011141	7,381853	8,421005
	75	8,19169880	,107477803	,048065535	8,05824748	8,32515012	8,019305	8,291046
	80	8,11160960	,050584385	,022622025	8,04880079	8,17441841	8,037788	8,176091
	85	8,07449280	,096647343	,043222006	7,95448927	8,19449633	7,912850	8,134699
Total	8,13386107	,234367193	,042789399	8,04634692	8,22137521	7,381853	8,442907	
Tratamiento 1	1	7,073380	1,0151650	,4539956	5,812886	8,333874	6,2258	8,2139
	5	7,391180	,1456947	,0651567	7,210276	7,572084	7,3010	7,6488
	10	7,325900	,3236211	,1618106	6,810947	7,840853	6,9363	7,6398
	15	7,374880	,4745243	,2122137	6,785680	7,964080	7,0000	7,9586
	20	7,497440	,3532058	,1579584	7,058877	7,936003	7,2486	8,1047
	25	7,567133	,2242596	,1294763	7,010042	8,124225	7,3736	7,8129
	Total	7,358867	,5063495	,0974470	7,158561	7,559172	6,2258	8,2139
	30	7,591700	,1177502	,0526595	7,445494	7,737906	7,4983	7,7975
	35	7,703000	,2802183	,1253174	7,355063	8,050937	7,3736	8,0607

	40	7,608980	,4537066	,2029038	7,045629	8,172331	7,1200	8,3388
	45	8,086020	,3402364	,1521583	7,663561	8,508479	7,6488	8,4058
	50	8,221780	,1679383	,0751043	8,013257	8,430303	8,0378	8,4638
	55	8,543440	,0746439	,0333818	8,450757	8,636123	8,4500	8,6353
	Total	7,959153	,4370621	,0797963	7,795952	8,122355	7,1200	8,6353
	60	9,442425	,2787080	,1393540	8,998938	9,885912	9,0726	9,6576
	65	8,555380	,3796035	,1697638	8,084040	9,026720	8,0726	8,9586
	70	8,642080	,0676055	,0302341	8,558137	8,726023	8,5326	8,7183
	75	8,258400	,1699822	,0760184	8,047339	8,469461	8,0212	8,4314
	80	8,263700	,0646055	,0373000	8,103211	8,424189	8,1891	8,3010
	85			
	Total	8,629095	,4737533	,1010045	8,419045	8,839146	8,0212	9,6576
Tratamiento 2	1	6,996280	,4617907	,2065191	6,422891	7,569669	6,1761	7,2704
	5	6,645540	,8985723	,4018537	5,529815	7,761265	5,7404	7,6532
	10	6,952425	,8401535	,4200767	5,615553	8,289297	5,6990	7,4486
	15	7,252200	,2466304	,1102965	6,945968	7,558432	6,9777	7,5870
	20	7,770100	,3690491	,1650438	7,311865	8,228335	7,4771	8,3979
	25	7,828860	,4044592	,1808797	7,326658	8,331062	7,3010	8,4393
	Total	7,250848	,6859196	,1273721	6,989938	7,511758	5,6990	8,4393
	30	7,082475	,3102190	,1551095	6,588847	7,576103	6,7404	7,3854
	35	7,078060	,0995099	,0445022	6,954502	7,201618	6,9031	7,1461
	40	7,292700	,3168532	,1417011	6,899275	7,686125	6,9542	7,6320
	45	7,327800	,2999149	,1341260	6,955406	7,700194	7,0000	7,6173
	50	8,333120	,6009824	,2687675	7,586902	9,079338	7,8129	9,3324
	55	8,753460	,1058504	,0473377	8,622029	8,884891	8,6021	8,8751
	Total	7,663986	,7337828	,1362600	7,384870	7,943102	6,7404	9,3324
	60	9,052280	,3147377	,1407550	8,661482	9,443078	8,7404	9,4698
	65	8,362580	,2219166	,0992441	8,087034	8,638126	7,9798	8,4964
	70	8,199260	,0480399	,0214841	8,139611	8,258909	8,1461	8,2672
	75	8,099740	,2594242	,1160180	7,777622	8,421858	7,6532	8,3108
	80	8,046480	,2805885	,1254830	7,698083	8,394877	7,6990	8,4771
	85			
Total	8,352068	,4349635	,0869927	8,172524	8,531612	7,6532	9,4698	
Tratamiento 3	1	4,882740	,3105040	,1388616	4,497198	5,268282	4,4771	5,2486
	5	6,357760	,3270742	,1462720	5,951644	6,763876	5,9542	6,6990
	10	7,171040	,1814544	,0811489	6,945735	7,396345	6,9294	7,4135
	15	8,236620	,1867737	,0835277	8,004710	8,468530	7,9294	8,4150
	20	8,340100	,3503447	,1566789	7,905090	8,775110	7,7404	8,5819
	25	8,521840	,0158077	,0070694	8,502212	8,541468	8,5088	8,5441
	Total	7,251683	1,3455480	,2456623	6,749247	7,754119	4,4771	8,5819

	30	8,560840	,4326086	,1934685	8,023685	9,097995	8,2553	9,3222
	35	8,034340	,2833488	,1267175	7,682516	8,386164	7,7404	8,4624
	40	7,452160	,2807851	,1255709	7,103519	7,800801	7,0889	7,7439
	45	7,618920	,1403026	,0627452	7,444711	7,793129	7,4357	7,8129
	50	7,483380	,1703585	,0761867	7,271852	7,694908	7,2788	7,7160
	55	7,532280	,2455349	,1098066	7,227408	7,837152	7,1761	7,7818
	Total	7,780320	,4773112	,0871447	7,602089	7,958551	7,0889	9,3222
	60	8,824380	,3232113	,1445445	8,423060	9,225700	8,5103	9,2175
	65	9,204240	,3123656	,1396942	8,816387	9,592093	8,6990	9,5441
	70	9,088740	,4280955	,1914501	8,557189	9,620291	8,5798	9,4150
	75	9,089280	,0874770	,0391209	8,980663	9,197897	9,0414	9,2430
	80	8,734700	,3787072	,2186467	7,793939	9,675461	8,3010	9,0000
	85
	Total	9,010317	,3377315	,0704219	8,864271	9,156363	8,3010	9,5441
Tratamiento 4	1	5,593320	1,0834813	,4845476	4,248000	6,938640	4,7782	7,4500
	5	6,720780	,1711759	,0765522	6,508237	6,933323	6,5441	6,9294
	10	7,110420	,2553443	,1141934	6,793368	7,427472	6,7782	7,3736
	15	7,713380	,4148949	,1855466	7,198220	8,228540	7,2672	8,3938
	20	8,238080	,2340665	,1046777	7,947448	8,528712	7,9031	8,4964
	25	8,501340	,1328191	,0593985	8,336423	8,666257	8,3010	8,6398
	Total	7,312887	1,0976221	,2003975	6,903028	7,722746	4,7782	8,6398
	30	8,614440	,0711146	,0318034	8,526140	8,702740	8,5250	8,7033
	35	8,802500	,6629994	,2965023	7,979278	9,625722	7,9031	9,4472
	40	8,938400	,4276604	,2138302	8,257897	9,618903	8,3522	9,3222
	45	8,420060	,1120754	,0501217	8,280900	8,559220	8,3010	8,5441
	50	8,088360	,4544838	,2032514	7,524044	8,652676	7,2788	8,3617
	55	7,632420	,5363887	,2398803	6,966405	8,298435	7,1303	8,2596
	Total	8,398017	,5972360	,1109039	8,170841	8,625194	7,1303	9,4472
	60	9,261060	,3680630	,1646028	8,804049	9,718071	8,8617	9,6990
	65	10,017850	,1723678	,0861839	9,743574	10,292126	9,8037	10,1891
	70	9,191360	,9674888	,4326742	7,990064	10,392656	8,4357	10,8337
	75	10,788680	,1805284	,0807347	10,564524	11,012836	10,4771	10,9224
	80	9,002625	,2610622	,1305311	8,587217	9,418033	8,6576	9,2596
	85
Total	9,664670	,8315851	,1733975	9,305065	10,024274	8,4357	10,9224	

1.3 Estadística descriptiva de *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*

ANOVA de un factor

ONEWAY LogControlBAP LogE.coliBAP LogS.aureusBAP LogListeriaBAP LogMezclaBAP BY Tiempo /STATISTICS DESCRIPTIVES
HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS.

Fecha: 16-may-2014 01:09:15 Tiempo de procesador 00 00:00:00,016

Ensayo	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
				Límite inferior	Límite superior			
Control	1	6,257702740	,5970688197	,2670172936	5,516343882	6,999061598	5,3010300	6,7814290
	5	7,396879780	,0799832894	,0357696144	7,297567409	7,496192151	7,3107900	7,4771214
	10	9,139950000	,2763865979	,1236038442	8,796770712	9,483129288	8,7191730	9,4698220
	15	9,298673400	,3937407395	,1760862118	8,809779699	9,787567101	8,8129130	9,6353010
	20	9,727211200	,1228682134	,0549483355	9,574650163	9,879772237	9,6260605	9,9386110
	25	9,920818200	,1444076712	,0645810739	9,741512394	10,100124006	9,7403630	10,0606980
	Total	8,623539220	1,3914513928	,2540431052	8,103962731	9,143115709	5,3010300	10,0606980
	30	9,25469360	,176011010	,078714516	9,03614707	9,47324013	9,088941	9,549672
	35	9,42253020	,196689471	,087962205	9,17830797	9,66675243	9,201645	9,586996
	40	9,14419620	,099091073	,044314875	9,02115838	9,26723402	9,060698	9,259637
	45	9,23858300	,262207696	,117262846	8,91300914	9,56415686	9,041392	9,698970
	50	9,40377860	,163989275	,073338233	9,20015902	9,60739818	9,148939	9,602060
	55	9,25441560	,077894063	,034835284	9,15769735	9,35113385	9,119975	9,320335
	Total	9,28636620	,186531245	,034055790	9,21671429	9,35601811	9,041392	9,698970
	60	9,22802600	,148543480	,066430664	9,04358491	9,41246709	9,079182	9,405766
	65	9,70921480	,274598056	,122803984	9,36825628	10,05017332	9,329675	9,912849
	70	9,58917900	,208605870	,104302935	9,25724051	9,92111749	9,279840	9,726998
	75	9,42968600	,321377511	,143724392	9,03064311	9,82872889	9,037788	9,912849
	80	9,42995780	,289504551	,129470371	9,07049042	9,78942518	8,936331	9,644349
	85	8,45224767	,008089255	,004670333	8,43215284	8,47234249	8,442907	8,456918
Total	9,35918081	,425018156	,081794782	9,19104923	9,52731240	8,442907	9,912849	
Tratamiento 1	1	8,506400	,3305644	,1478329	8,095950	8,916850	8,1761	8,8829
	5	8,805960	,2116071	,0946336	8,543215	9,068705	8,6021	9,1614
	10	9,503400	,0751443	,0336055	9,410096	9,596704	9,4284	9,6261
	15	9,536400	,1893416	,0846761	9,301301	9,771499	9,3565	9,7847
	20	9,211320	,1219946	,0545577	9,059844	9,362796	9,0726	9,4058
	25	8,944100	,3629336	,1623088	8,493458	9,394742	8,4357	9,3222
	Total	9,084597	,4356903	,0795458	8,921907	9,247286	8,1761	9,7847
	30	8,621900	,3051529	,1525765	8,136334	9,107466	8,3565	9,0378
	35	8,333920	,3892529	,1740792	7,850599	8,817241	7,6532	8,6118

Ensayo	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
				Límite inferior	Límite superior			
40	8,517175	,1755546	,0877773	8,237829	8,796521	8,2704	8,6704	
45	8,639480	,1242911	,0555847	8,485152	8,793808	8,4771	8,7782	
50	8,643880	,1409283	,0630250	8,468894	8,818866	8,5209	8,8308	
55	8,774200	,4142900	,1852761	8,259791	9,288609	8,3819	9,4569	
Total	8,589775	,2953490	,0558157	8,475251	8,704299	7,6532	9,4569	
60	9,442425	,2787080	,1393540	8,998938	9,885912	9,0726	9,6576	
65	8,555380	,3796035	,1697638	8,084040	9,026720	8,0726	8,9586	
70	8,642080	,0676055	,0302341	8,558137	8,726023	8,5326	8,7183	
75	8,258400	,1699822	,0760184	8,047339	8,469461	8,0212	8,4314	
80	8,263700	,0646055	,0373000	8,103211	8,424189	8,1891	8,3010	
85	
Total	8,629095	,4737533	,1010045	8,419045	8,839146	8,0212	9,6576	
Tratamiento 2	1	6,400700	,1706552	,0763193	6,188804	6,612596	6,2016	6,6385
	5	7,750980	,3755419	,1679474	7,284683	8,217277	7,3617	8,1761
	10	8,831660	,4208274	,1881997	8,309134	9,354186	8,3203	9,2553
	15	9,425320	,0868985	,0388622	9,317421	9,533219	9,3010	9,5119
	20	9,830680	,1918364	,0857918	9,592484	10,068876	9,4901	9,9294
	25	8,770360	,4836394	,2162901	8,169842	9,370878	8,1461	9,2672
	Total	8,501617	1,1947084	,2181229	8,055505	8,947728	6,2016	9,9294
	30	8,640800	,2752111	,1230781	8,299080	8,982520	8,4135	9,0969
	35	8,636120	,0329552	,0147380	8,595201	8,677039	8,5870	8,6788
	40	8,361380	,8165244	,3651608	7,347531	9,375229	7,4771	9,6180
	45	8,605660	,5293095	,2367144	7,948436	9,262884	8,1402	9,4393
	50	9,394120	,2479793	,1108997	9,086213	9,702027	9,0000	9,6870
	55	8,918200	,7185775	,3213576	8,025968	9,810432	7,6778	9,4569
	Total	8,759380	,5754535	,1050630	8,544502	8,974258	7,4771	9,6870
	60	9,052280	,3147377	,1407550	8,661482	9,443078	8,7404	9,4698
	65	8,362580	,2219166	,0992441	8,087034	8,638126	7,9798	8,4964
	70	8,199260	,0480399	,0214841	8,139611	8,258909	8,1461	8,2672
	75	8,099740	,2594242	,1160180	7,777622	8,421858	7,6532	8,3108
80	8,046480	,2805885	,1254830	7,698083	8,394877	7,6990	8,4771	
85	
Total	8,352068	,4349635	,0869927	8,172524	8,531612	7,6532	9,4698	
Tratamiento 3	1	8,792100	,2245076	,1004029	8,513337	9,070863	8,6704	9,1931
	5	8,237660	,0675434	,0302063	8,153794	8,321526	8,1489	8,3388
	10	8,172000	,7549575	,3774788	6,970694	9,373306	7,1761	8,8129
	15	8,692960	,3729714	,1667979	8,229855	9,156065	8,1761	9,1303

Ensayo	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
				Límite inferior	Límite superior			
				20	9,604880			,1492615
25	9,414440	,2990558	,1337418	9,043113	9,785767	8,9294	9,7324	
Total	8,841317	,6332070	,1175836	8,600458	9,082176	7,1761	9,7559	
30	9,324020	,1878756	,0840205	9,090742	9,557298	9,0414	9,5088	
35	8,189740	,4545587	,2032848	7,625331	8,754149	7,6532	8,6990	
40	8,549520	,1754121	,0784467	8,331717	8,767323	8,2906	8,7160	
45	8,124100	,6355568	,3177784	7,112787	9,135413	7,1761	8,5209	
50	8,078500	,2319807	,1037449	7,790458	8,366542	7,6990	8,2788	
55	8,580820	,5003691	,2237719	7,959530	9,202110	8,1761	9,4210	
Total	8,486531	,5634340	,1046271	8,272212	8,700850	7,1761	9,5088	
60	8,824380	,3232113	,1445445	8,423060	9,225700	8,5103	9,2175	
65	9,204240	,3123656	,1396942	8,816387	9,592093	8,6990	9,5441	
70	9,088740	,4280955	,1914501	8,557189	9,620291	8,5798	9,4150	
75	9,089280	,0874770	,0391209	8,980663	9,197897	9,0414	9,2430	
80	8,734700	,3787072	,2186467	7,793939	9,675461	8,3010	9,0000	
85	
Total	9,010317	,3377315	,0704219	8,864271	9,156363	8,3010	9,5441	
Tratamiento 4	1	6,862860	,3165264	,1415549	6,469841	7,255879	6,5027	7,3203
	5	7,317460	,0846430	,0378535	7,212362	7,422558	7,2139	7,4284
	10	7,614920	,3621281	,1619486	7,165279	8,064561	7,2596	8,1891
	15	8,755740	,1363605	,0609822	8,586426	8,925054	8,5209	8,8423
	20	9,674720	,1225889	,0548234	9,522506	9,826934	9,5326	9,8308
	25	9,622640	,2137271	,0955817	9,357263	9,888017	9,3565	9,9363
	Total	8,308057	1,1447681	,2090051	7,880593	8,735520	6,5027	9,9363
	30	9,591760	,2549752	,1140284	9,275167	9,908353	9,1489	9,7943
	35	9,492000	,7640149	,3820075	8,276282	10,707718	8,6576	10,4901
	40	10,293420	,1563156	,0699065	10,099329	10,487511	10,0193	10,3900
	45	10,011460	,1580302	,0706732	9,815240	10,207680	9,9153	10,2890
	50	10,041560	,2654501	,1187129	9,711960	10,371160	9,6576	10,3565
	55	9,491000	,1793200	,0801943	9,268345	9,713655	9,3478	9,7943
	Total	9,831517	,4390265	,0815252	9,664520	9,998514	8,6576	10,4901
	60	9,261060	,3680630	,1646028	8,804049	9,718071	8,8617	9,6990
	65	10,017850	,1723678	,0861839	9,743574	10,292126	9,8037	10,1891
	70	9,191360	,9674888	,4326742	7,990064	10,392656	8,4357	10,8337
	75	10,788680	,1805284	,0807347	10,564524	11,012836	10,4771	10,9224
80	9,002625	,2610622	,1305311	8,587217	9,418033	8,6576	9,2596	
85	

Ensayo	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Total	9,664670	,8315851	,1733975	9,305065	10,024274	8,4357	10,9224

1.4 Estadística descriptiva de microorganismos patógenos co-inoculados

ANOVA de un factor

ONEWAY LogControlE.coli LogControlS.aureus LogControlListeria LogE.coli LogS.aureus LogListeria LogMezcla BY

Tiempo/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS

Fecha: 16-may-2014 01:09:15 Tiempo de procesador 00 00:00:00,094

Ensayo	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
				Límite inferior	Límite superior			
Control (<i>E.coli</i>)	1	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	5	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	10	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	Total	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
Control (<i>S.aureus</i>)	1	1,026066760	,5867032070	,2623816507	,297578510	1,75455501	,0000000	1,4771212
	5	,000000000	,0000000000	,0000000000	,000000000	,000000000	,0000000	,0000000
	10	,000000000	,0000000000	,0000000000	,000000000	,000000000	,0000000	,0000000
	Total	,171011127	,4458081940	,0813930681	,004543611	,337478642	,0000000	1,4771212
Control (<i>Listeria</i>)	1	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	5	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	10	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	Total	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
Tratamiento 1	1	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	5	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	10	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	Total	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
Tratamiento 2	1	5,026180	,6084326	,2720993	4,270711	5,781649	3,9542	5,4232
	5	5,501740	,1726662	,0772187	5,287347	5,716133	5,3819	5,8062
	10	5,464680	,1242521	,0555672	5,310401	5,618959	5,3118	5,6021
	15	5,383940	,4102490	,1834689	4,874549	5,893331	5,0000	5,9777
	20	5,110167	,4472400	,2582141	3,999161	6,221172	4,6532	5,5470
	25	4,143500	,1888267	,0944134	3,843035	4,443965	4,0000	4,3979
	Total	5,140267	,5670569	,1091301	4,915946	5,364587	3,9542	5,9777
	30	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	35	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	40	,00	,000	,000	,00	,00	0	0

Ensayo	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
				Límite inferior	Límite superior			
				45	,00			,000
50	,00	,000	,000	,00	,00	0	0	
55	,00	,000	,000	,00	,00	0	0	
Total	,00	,000	,000	,00	,00	0	0	
Tratamiento 3	1	7,370700	2,1191990	1,4985000	-11,669548	26,410948	5,8722	8,8692
	5	5,334640	,2538561	,1135279	5,019436	5,649844	5,1047	5,7404
	10	4,302820	,2143367	,0958543	4,036686	4,568954	4,0969	4,6532
	15	3,925540	,5573914	,2492730	3,233447	4,617633	3,0000	4,5039
	20	4,649600	,2329457	,1164728	4,278931	5,020269	4,4429	4,8779
	25	4,559760	,1063934	,0475806	4,427655	4,691865	4,4624	4,7160
	Total	4,767446	1,0284044	,2016867	4,352065	5,182828	3,0000	8,8692
	30	4,070400	,2153881	,0963245	3,802960	4,337840	3,7782	4,3222
	35	,000000	,0000000	,0000000	,000000	,000000	,0000	,0000
	40	,000000	,0000000	,0000000	,000000	,000000	,0000	,0000
	45	,000000	,0000000	,0000000	,000000	,000000	,0000	,0000
	50	,000000	,0000000	,0000000	,000000	,000000	,0000	,0000
	55	,000000	,0000000	,0000000	,000000	,000000	,0000	,0000
	Total	,678400	1,5449534	,2820686	,101505	1,255295	,0000	4,3222
	60	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	65	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	70	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	75	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	80	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
	85	,00	,000	,000	,00	,00	0	0
Total	,00	,000	,000	,00	,00	0	0	
Tratamiento 4	1	6,558180	,4526455	,2024292	5,996146	7,120214	6,1903	7,1139
	5	8,178360	,1178053	,0526841	8,032085	8,324635	8,0117	8,3232
	10	8,264520	,1646571	,0736369	8,060071	8,468969	8,1139	8,4472
	15	8,439660	,0217684	,0097351	8,412631	8,466689	8,4195	8,4709
	20	9,113880	,1697061	,0758949	8,903162	9,324598	8,9345	9,3444
	25	9,021500	,4725271	,2113205	8,434780	9,608220	8,2430	9,4265
	Total	8,262683	,8947020	,1633495	7,928596	8,596771	6,1903	9,4265
	30	9,636920	,2325995	,1040217	9,348110	9,925730	9,2808	9,8633
	35	9,694980	,6834924	,3056671	8,846312	10,543648	9,0969	10,4459
	40	10,760720	,2354837	,1053115	10,468328	11,053112	10,4764	11,0777
	45	10,769640	,3577255	,1599797	10,325465	11,213815	10,3651	11,3288
	50	11,374680	,3985688	,1782454	10,879791	11,869569	10,8248	11,7723

Ensayo	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
				55	11,263560		
Total	10,583417	,8329391	,1520732	10,272392	10,894441	9,0969	12,4771
60	11,569600	,4973962	,2224423	10,952001	12,187199	11,1508	12,1342
65	12,057880	,3861828	,1727062	11,578371	12,537389	11,6580	12,6665
70	12,755867	,6360245	,3672089	11,175894	14,335839	12,3711	13,4900
75	13,947180	,4065151	,1817991	13,442425	14,451935	13,4624	14,3617
80
85
Total	12,563383	1,0560064	,2489031	12,038244	13,088523	11,1508	14,3617

Anexo 4. Análisis Estadísticos

4.1 Análisis Estadísticos de Bacterias Acido Lácticas

ANOVA de un factor

ONEWAY LogE.coliBAL LogS.aureusBAL LogListeriaBAL LogMezclaBAL LogControlBAL BY Tiempo /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC= TUKEY SCHEFFE ALPHA(0.05)
 Fecha: 16-may-2014 02:43:01 Tiempo de procesador 00 00:00:00,172

Prueba de homogeneidad de varianzas												
Etapas de Maduración	Cuarto Ambiente día 1 al 25				Cuarto Caliente día 30 al 55				Cuarto Frio día 60 al 75			
Ensayos	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.* p	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.* p	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.* p
Control	1,037	5	24	0,419	3,217	5	23	0,024	7,558	4	17	0,001
Tratamiento 1	15,021	5	21	0	2,371	5	24	0,07	1,765	4	20	0,176
Tratamiento 2	2,795	5	23	0,041	2,498	5	23	0,06	3,847	4	18	0,02
Tratamiento 3	2,606	5	24	0,051	1,11	5	24	0,381	2,576	4	18	0,073
Tratamiento 4	2,826	5	24	0,038	4,625	5	23	0,005	22,795	5	24	0

Comparación T Multivariado

GLM LogE.coliBAL LogS.aureusBAL LogListeriaBAL LogMezclaBAL BY LogControlBAL /METHOD=SSTYPE(3) /INTERCEPT=INCLUDE /POSTHOC=LogControlBAL(TUKEY SCHEFFE) /CRITERIA=ALPHA(.05) /DESIGN= LogControlBAL.
 Fecha: 16-may-2014 02:43:01 Tiempo de procesador 00 00:00:00,172

Pruebas de los efectos inter-sujetos							
Cuarto Ambiente día 1 al 25							a. R cuadrado = 1,000 (R cuadrado corregida = .)
Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.* p	
Control	Tratamiento 1	6,633	25	0,265	0,933	0,619	

	Tratamiento 2	11,657	25	0,466	1,849	0,277	
	Tratamiento 3	48,972	25	1,959	1,002	0,58	
	Tratamiento 4	32,353	25	1,294	2,571	0,169	
Modelo corregido	Tratamiento 1	6,633 ^a	25	0,265	0,933	0,619	
	Tratamiento 2	11,657 ^a	25	0,466	1,849	0,277	
	Tratamiento 3	48,972 ^a	25	1,959	1,002	0,58	
	Tratamiento 4	32,353 ^a	25	1,294	2,571	0,169	
Intersección	Tratamiento 1	1405,335	1	1405,335	8021,544	0	
	Tratamiento 2	1346,7	1	1346,7	4792,971	0	
	Tratamiento 3	1337,793	1	1337,793	10286,851	0	
	Tratamiento 4	1360,491	1	1360,491	11396,178	0	
Cuarto Caliente día 30 al 55							
Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.* p	
Control	Tratamiento 1	4,194	22	0,191	0,93	0,599	a. R cuadrado = ,804 (R cuadrado corregida = ,060)
	Tratamiento 2	13,017	22	0,592	1,846	0,257	b. R cuadrado = ,890 (R cuadrado corregida = ,408)
	Tratamiento 3	3,314	22	0,151	0,999	0,56	c. R cuadrado = ,815 (R cuadrado corregida = ,001)
	Tratamiento 4	9,106	22	0,414	2,568	0,149	d. R cuadrado = ,919 (R cuadrado corregida = ,561)
Modelo corregido	Tratamiento 1	4,194 ^a	22	0,191	0,93	0,599	
	Tratamiento 2	13,017 ^b	22	0,592	1,846	0,257	
	Tratamiento 3	3,314 ^c	22	0,151	0,999	0,56	
	Tratamiento 4	9,106 ^d	22	0,414	2,568	0,149	
Intersección	Tratamiento 1	1642,771	1	1642,771	8016,544	0	
	Tratamiento 2	1534,822	1	1534,822	4787,971	0	
	Tratamiento 3	1550,923	1	1550,923	10281,851	0	
	Tratamiento 4	1836,011	1	1836,011	11391,178	0	
Cuarto Frio día 60 al 75							
Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.* p	
Control	Tratamiento 1	5,33	19	0,281	2,4	0,257	a. R cuadrado = ,938 (R cuadrado corregida = ,547)
	Tratamiento 2	5,995	19	0,316	0,792	0,685	b. R cuadrado = ,834 (R cuadrado corregida = ,219)
	Tratamiento 3	2,976	19	0,157	0,317	0,951	c. R cuadrado = ,668 (R cuadrado corregida = 1,436)
	Tratamiento 4	2,48	19	0,131	0,939	0,613	d. R cuadrado = ,856 (R cuadrado corregida = ,056)
Modelo corregido	Tratamiento 1	5,330 ^a	19	0,281	2,4	0,257	
	Tratamiento 2	5,995 ^b	19	0,316	0,792	0,685	
	Tratamiento 3	2,976 ^c	19	0,157	0,317	0,951	
	Tratamiento 4	2,480 ^d	19	0,131	0,939	0,613	
Intersección	Tratamiento 1	1483,672	1	1483,672	12692,302	0	
	Tratamiento 2	1305,019	1	1305,019	3275,632	0	
	Tratamiento 3	1473,692	1	1473,692	2987,052	0	
	Tratamiento 4	1131,402	1	1131,402	8141,061	0	

Pruebas no Paramétricas

Prueba de Kruskal-Wallis

NPAR TESTS /K-W=LogControlBAP LogE.coliBAP LogS.aureusBAP LogListeriaBAP LogMezclaBAP BY Tiempo(1 25) /STATISTICS DESCRIPTIVES /MISSING ANALYSIS /METHOD=MC CIN(95) SAMPLES(10000).

Fecha: 15-may-2014 Tiempo de procesador 10:06:01 00:00:00,350

Estadísticos de contraste a,b									
	Cuarto Ambiente día 1 al 25			Cuarto Caliente día 30 al 55			Cuarto Frio día 60 al 75		
Ensayos	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintót.	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintót.	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintót.
Control	26,935	5	0	17,954	5	0,003	4,106	5	0,534
Tratamiento 1	1,616	5	0,899	19,879	5	0,001	11,465	4	0,22
Tratamiento 2	15,206	5	0,1	20,428	5	0,001	17,562	4	0,02
Tratamiento 3	26,446	5	0	19,436	5	0,002	12,754	4	0,13
Tratamiento 4	24,639	5	0	18,155	5	0,003	17,56	4	0,02

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Tiempo

4.2 Análisis Estadísticos de *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*

ANOVA de un factor

ONEWAY LogE.coliBAP LogS.aureusBAP LogListeriaBAP LogMezclaBAP LogControlBAL BY Tiempo

/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=TUKEY SCHEFFE ALPHA(0.05

Fecha: 16-may-2014 02:43:01 Tiempo de procesador 00 00:00:00,172

Prueba de homogeneidad de varianzas												
Etapas de Maduración	Cuarto Ambiente día 1 al 25				Cuarto Caliente día 30 al 55				Cuarto Frio día 60 al 75			
Ensayos	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.* p	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.* p	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.* p
Control	4,338	5	24	0,006	1,312	5	24	0,292	1,517	5	21	0,227
Tratamiento 1	4,252	5	24	0,007	1,233	5	22	0,327	7,558	4	17	0,001
Tratamiento 2	4,89	5	24	0,003	2,575	5	24	0,053	1,765	4	20	0,176
Tratamiento 3	5,003	5	23	0,003	2,336	5	23	0,075	3,847	4	18	0,02
Tratamiento 4	1,617	5	24	0,194	2,735	5	23	0,044	2,576	4	18	0,073

Comparación T Multivariado

GLM LogE.coliBAL LogS.aureusBAL LogListeriaBAL LogMezclaBAL BY LogControlBAL /METHOD=SSTYPE(3)

/INTERCEPT=INCLUDE /POSTHOC=LogControlBAL(TUKEY SCHEFFE) /CRITERIA=ALPHA(.05) /DESIGN= LogControlBAL.

Fecha: 16-may-2014 02:43:01 Tiempo de procesador 00 00:00:00,172

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Cuarto Ambiente día 1 al 25						
Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Medias cuadráticas	F	Sig.* p
Control	Tratamiento 1	5,358	26	0,206	16,507	0,059
	Tratamiento 2	41,138	26	1,582	14,354	0,067
	Tratamiento 3	11,22	26	0,432	140,102	0,007
	Tratamiento 4	36,991	26	1,423	37,254	0,026
Modelo corregido	Tratamiento 1	5,358 ^a	26	0,206	16,507	0,059
	Tratamiento 2	41,138 ^b	26	1,582	14,354	0,067
	Tratamiento 3	11,220 ^c	26	0,432	140,102	0,007
	Tratamiento 4	36,991 ^d	26	1,423	37,254	0,026
Intersección	Tratamiento 1	2311,154	1	2311,154	2E+05	0
	Tratamiento 2	2029,046	1	2029,046	18408,019	0
	Tratamiento 3	2191,348	1	2191,348	711404,349	0
	Tratamiento 4	1943,004	1	1943,004	50876,985	0
Cuarto Caliente día 30 al 55						
Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Medias cuadráticas	F	Sig.* p
Control	Tratamiento 1	4,194	22	0,191	0,93	0,599
	Tratamiento 2	13,017	22	0,592	1,846	0,257
	Tratamiento 3	3,314	22	0,151	0,999	0,56
	Tratamiento 4	9,106	22	0,414	2,568	0,149
Modelo corregido	Tratamiento 1	4,194 ^a	22	0,191	0,93	0,599
	Tratamiento 2	13,017 ^b	22	0,592	1,846	0,257
	Tratamiento 3	3,314 ^c	22	0,151	0,999	0,56
	Tratamiento 4	9,106 ^d	22	0,414	2,568	0,149
Intersección	Tratamiento 1	1642,771	1	1642,771	8016,544	0
	Tratamiento 2	1534,822	1	1534,822	4787,971	0
	Tratamiento 3	1550,923	1	1550,923	10281,851	0
	Tratamiento 4	1836,011	1	1836,011	11391,178	0
Cuarto Frio día 60 al 75						
Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Medias cuadráticas	F	Sig.* p
Control	Tratamiento 1	3,836 ^a	15	0,256	1,822	0,343
	Tratamiento 2	3,422 ^b	15	0,228	2,406	0,256
	Tratamiento 3	1,384 ^c	15	0,092	0,714	0,719
	Tratamiento 4	10,437 ^d	15	0,696	1,845	0,339
Modelo corregido	Tratamiento 1	1302,815	1	1302,815	1,822	0,343
	Tratamiento 2	1230,002	1	1230,002	2,406	0,256
	Tratamiento 3	1395,536	1	1395,536	0,714	0,719
	Tratamiento 4	1656,83	1	1656,83	1,845	0,339
Intersección	Tratamiento 1	3,836	15	0,256	9282,52	0
	Tratamiento 2	3,422	15	0,228	12970,393	0
	Tratamiento 3	1,384	15	0,092	10796,204	0
	Tratamiento 4	10,437	15	0,696	4393,51	0

a. R cuadrado = 1,000 (R cuadrado corregida = .)

a. R cuadrado = ,804 (R cuadrado corregida = ,060)

b. R cuadrado = ,890 (R cuadrado corregida = ,408)

c. R cuadrado = ,815 (R cuadrado corregida = ,001)

d. R cuadrado = ,919 (R cuadrado corregida = ,561)

a. R cuadrado = ,901 (R cuadrado corregida = ,406)

b. R cuadrado = ,923 (R cuadrado corregida = ,539)

c. R cuadrado = ,781 (R cuadrado corregida = ,313)

d. R cuadrado = ,902 (R cuadrado corregida = ,13)

Pruebas no Paramétricas

Prueba de Kruskal-Wallis

NPAR TESTS /K-W=LogControlBAP LogE.coliBAP LogS.aureusBAP LogListeriaBAP LogMezclaBAP BY Tiempo(1 25) /STATISTICS DESCRIPTIVES /MISSING ANALYSIS /METHOD=MC CIN(95) SAMPLES(10000).

Fecha: 15-may-2014 Tiempo de procesador 10:06:01 00:00:00,350

Ensayos	Estadísticos de contraste a,b								
	Cuarto Ambiente día 1 al 25			Cuarto Caliente día 30 al 55			Cuarto Frio día 60 al 75		
	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintót.	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintót.	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintót.
Control	27,015	5	0	8,723	5	0,121	13,634	5	0,18
Tratamiento 1	23,179	5	0	4,81	5	0,439	13,727	4	0,08
Tratamiento 2	27,024	5	0	9,945	5	0,077	15,372	4	0,004
Tratamiento 3	21,39	5	0,001	16,332	5	0,006	6,358	4	0,174
Tratamiento 4	26,343	5	0	16,539	5	0,005	14,284	4	0,006

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Tiempo

4.3 Análisis Estadísticos de microorganismos patógenos co-inoculados

ANOVA de un factor

ONEWAY LogE.coliBAP LogS.aureusBAP LogListeriaBAP LogMezclaBAP LogControlBAL BY Tiempo /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=TUKEY SCHEFFE ALPHA(0.05)

Fecha: 16-may-2014 02:43:01 Tiempo de procesador 00 00:00:00,172

Prueba de homogeneidad de varianzas												
Etapas de Maduración	Cuarto Ambiente día 1 al 25				Cuarto Caliente día 30 al 55				Cuarto Frio día 60 al 75			
Ensayos	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.* p	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.* p	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.* p
Control (<i>E.coli</i>)	.	5	.	.	.	5	.	.	.	5	.	.
Control (<i>S.aureus</i>)	6,302	5	24	0,001	.	5	.	.	.	5	.	.
Control (<i>Listeria</i>)	.	5	.	.	.	5	.	.	.	5	.	.
Tratamiento 1	.	5	.	.	.	5	.	.	.	4	.	.
Tratamiento 2	1,809	5	21	0,155	.	5	.	.	.	4	.	.
Tratamiento 3	18,859	5	20	0	16,945	5	24	0	.	4	.	.
Tratamiento 4	5,212	5	24	0,002	2,053	5	24	0,107	1,205	3	14	0,344

Comparación T Multivariado

Pruebas de los efectos inter-sujetos						
Cuarto Ambiente día 1 al 25						
Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.* p
Control (<i>E.coli</i>)	Tratamiento 1	0	0	.	.	.
	Tratamiento 2	0	0	.	.	.
	Tratamiento 3	0	0	.	.	.
	Tratamiento 4	0	0	.	.	.
Control (<i>S.aureus</i>)	Tratamiento 1	0	1	0	.	.
	Tratamiento 2	0,06	1	0,06	0,193	0,664
	Tratamiento 3	1,274	1	1,274	1,114	0,303
	Tratamiento 4	4,651	1	4,651	16,335	0,001
Control (<i>Listeria</i>)	Tratamiento 1	0	0	.	.	.
	Tratamiento 2	0	0	.	.	.
	Tratamiento 3	0	0	.	.	.
	Tratamiento 4	0	0	.	.	.
Modelo corregido	Tratamiento 1	,000 ^a	1	0	.	.
	Tratamiento 2	,060 ^b	1	0,06	0,193	0,664
	Tratamiento 3	1,274 ^c	1	1,274	1,114	0,303
	Tratamiento 4	4,651 ^d	1	4,651	16,335	0,001
Intersección	Tratamiento 1	0	1	0	.	.
	Tratamiento 2	107,601	1	107,601	346,944	0
	Tratamiento 3	107,505	1	107,505	94	0
Cuarto Caliente día 30 al 55						
Origen	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.* p
Control (<i>E.coli</i>)	Tratamiento 1	0	0	.	.	.
	Tratamiento 2	0	0	.	.	.
	Tratamiento 3	0	0	.	.	.
	Tratamiento 4	0	0	.	.	.
Control (<i>S.aureus</i>)	Tratamiento 1	0	0	.	.	.
	Tratamiento 2	0	0	.	.	.
	Tratamiento 3	0	0	.	.	.
	Tratamiento 4	0	0	.	.	.
Control (<i>Listeria</i>)	Tratamiento 1	0	0	.	.	.
	Tratamiento 2	0	0	.	.	.
	Tratamiento 3	0	0	.	.	.
	Tratamiento 4	0	0	.	.	.
Modelo corregido	Tratamiento 1	,000 ^a	0	.	.	.
	Tratamiento 2	,000 ^a	0	.	.	.

a. R cuadrado = . (R cuadrado corregida = .)
 b. R cuadrado = ,009 (R cuadrado corregida = -,036)
 c. R cuadrado = ,048 (R cuadrado corregida = ,005)
 d. R cuadrado = ,426 (R cuadrado corregida = ,400)

a. R cuadrado = . (R cuadrado corregida = .)
 b. R cuadrado = ,000 (R cuadrado corregida = ,000)

	Tratamiento 3	,000 ^b	0	.	.	.
	Tratamiento 4	,000 ^b	0	.	.	.
Intersección	Tratamiento 1	0	1	0	.	.
	Tratamiento 2	0	1	0	.	.
	Tratamiento 3	13,807	1	13,807	5,784	0,023

Pruebas no Paramétricas

Prueba de Kruskal-Wallis

NPAR TESTS /K-W=LogControlBAP LogE.coliBAP LogS.aureusBAP LogListeriaBAP LogMezclaBAP BY Tiempo(1 25) /STATISTICS DESCRIPTIVES /MISSING ANALYSIS /METHOD=MC CIN(95) SAMPLES(10000).

Fecha: 15-may-2014 Tiempo de procesador 10:06:01 00:00:00,350

Ensayos	Estadísticos de contraste c,d								
	Cuarto Ambiente día 1 al 25			Cuarto Caliente día 30 al 55			Cuarto Frio día 60 al 75		
	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintót.	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintót.	Chi-cuadrado	gl	Sig. asintót.
Control (<i>E.coli</i>)	0	5	1	0	5	1	0	5	1
Control (<i>S.aureus</i>)	22,18	5	0	0	5	1	0	5	1
Control (<i>Listeria</i>)	0	5	1	0	5	1	0	5	1
Tratamiento 1	0	5	1	0	5	1	0	5	1
Tratamiento 2	13,12	5	0,022	0	5	1	0	5	1
Tratamiento 3	19,993	5	0,001	28,694	5	0	0	4	1
Tratamiento 4	23,41	5	0	20,654	5	0,001	13,117	3	0,004

b. Basado en 10000 tablas muestrales con semilla de inicio 562334227.

c. Prueba de Kruskal-Wallis

d. Variable de agrupación: Tiempo

Pruebas de normalidad							
Ensayos	Tiempo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig. p	Estadístico	gl	Sig. p
Control (BAL)	15	0,311	5	0,129	0,82	5	0,116
	20	0,292	3	.	0,924	3	0,467
	25	0,38	3	.	0,763	3	0,028
	30	0,351	3	.	0,826	3	0,179
	35	0,255	4	.	0,959	4	0,771
	40	0,286	3	.	0,931	3	0,491
	45	0,273	4	.	0,888	4	0,376
	50	0,236	5	,200*	0,869	5	0,264
	55	0,223	5	,200*	0,902	5	0,42
	60	0,255	4	.	0,958	4	0,767
	65	0,212	4	.	0,964	4	0,805
	70	0,187	3	.	0,998	3	0,918
75	0,224	5	,200*	0,901	5	0,414	

Control (BAP)	15	0,338	5	0,063	0,791	5	0,068
	20	0,345	3	.	0,838	3	0,21
	25	0,385	3	.	0,75	3	0
	30	0,359	3	.	0,811	3	0,141
	35	0,398	4	.	0,719	4	0,019
	40	0,385	3	.	0,75	3	0
	45	0,408	4	.	0,692	4	0,009
	50	0,266	5	,200*	0,936	5	0,638
	55	0,381	5	0,017	0,786	5	0,063
	60	0,275	4	.	0,835	4	0,181
	65	0,412	4	.	0,673	4	0,005
	70	0,236	3	.	0,977	3	0,712
	75	0,195	5	,200*	0,971	5	0,879
Tratamiento 1 (BAL)	15	0,338	5	0,063	0,767	5	0,043
	20	0,372	3	.	0,782	3	0,071
	25	0,259	3	.	0,959	3	0,612
	30	0,316	3	.	0,889	3	0,351
	35	0,212	4	.	0,975	4	0,871
	40	0,19	3	.	0,998	3	0,905
	45	0,245	4	.	0,899	4	0,424
	50	0,157	5	,200*	0,968	5	0,864
	55	0,164	5	,200*	0,976	5	0,91
	60	0,167	4	.	0,987	4	0,942
	65	0,287	4	.	0,872	4	0,307
	70	0,367	3	.	0,792	3	0,097
	75	0,221	5	,200*	0,906	5	0,443
Tratamiento 1 (BAP)	15	0,249	5	,200*	0,885	5	0,333
	20	0,366	3	.	0,795	3	0,103
	25	0,27	3	.	0,949	3	0,565
	30	0,235	3	.	0,977	3	0,712
	35	0,398	4	.	0,757	4	0,045
	40	0,207	3	.	0,992	3	0,833
	45	0,3	4	.	0,842	4	0,202
	50	0,296	5	0,173	0,844	5	0,176
	55	0,251	5	,200*	0,888	5	0,348
	60	0,28	4	.	0,861	4	0,263
	65	0,328	4	.	0,882	4	0,347
	70	0,256	3	.	0,962	3	0,623
	75	0,246	5	,200*	0,925	5	0,562
Tratamiento 2 (S.aureus)	15	0,225	5	,200*	0,906	5	0,446
	20	0,185	3	.	0,998	3	0,926
	25	0,385	3	.	0,75	3	0
Tratamiento 2 (BAL)	15	0,244	5	,200*	0,943	5	0,69
	20	0,304	3	.	0,907	3	0,408
	25	0,385	3	.	0,75	3	0
	30	0,291	3	.	0,924	3	0,468
	35	0,156	4	.	0,993	4	0,971
	40	0,34	3	.	0,848	3	0,236

	45	0,298	4	.	0,766	4	0,054
	50	0,279	5	,200*	0,861	5	0,231
	55	0,192	5	,200*	0,974	5	0,901
	60	0,288	4	.	0,864	4	0,275
	65	0,26	4	.	0,91	4	0,481
	70	0,322	3	.	0,88	3	0,325
	75	0,205	5	,200*	0,934	5	0,625
Tratamiento 2 (BAP)	15	0,213	5	,200*	0,927	5	0,579
	20	0,344	3	.	0,841	3	0,217
	25	0,38	3	.	0,763	3	0,029
	30	0,361	3	.	0,807	3	0,13
	35	0,327	4	.	0,86	4	0,262
	40	0,256	3	.	0,962	3	0,623
	45	0,298	4	.	0,798	4	0,099
	50	0,306	5	0,142	0,895	5	0,383
	55	0,334	5	0,071	0,785	5	0,061
	60	0,3	4	.	0,837	4	0,188
	65	0,439	4	.	0,64	4	0,002
	70	0,183	3	.	0,999	3	0,933
75	0,347	5	0,049	0,801	5	0,082	
Tratamiento 3 (Listeria)	15	0,337	5	0,065	0,862	5	0,236
	20	0,377	3	.	0,771	3	0,046
	25	0,175	3	.	1	3	0,997
	30	0,326	3	.	0,873	3	0,305
Tratamiento 3 (BAL)	15	0,259	5	,200*	0,892	5	0,37
	20	0,276	3	.	0,943	3	0,538
	25	0,385	3	.	0,75	3	0
	30	0,282	3	.	0,936	3	0,51
	35	0,181	4	.	0,983	4	0,919
	40	0,361	3	.	0,807	3	0,132
	45	0,142	4	.	0,998	4	0,993
	50	0,167	5	,200*	0,984	5	0,956
	55	0,265	5	,200*	0,923	5	0,549
	60	0,38	4	.	0,713	4	0,016
	65	0,186	4	.	0,967	4	0,822
	70	0,176	3	.	1	3	0,987
75	0,223	5	,200*	0,9	5	0,411	
Tratamiento 3 (BAP)	15	0,19	5	,200*	0,976	5	0,913
	20	0,236	3	.	0,977	3	0,711
	25	0,349	3	.	0,831	3	0,19
	30	0,27	3	.	0,948	3	0,561
	35	0,225	4	.	0,946	4	0,689
	40	0,176	3	.	1	3	0,979
	45	0,393	4	.	0,727	4	0,023
	50	0,236	5	,200*	0,875	5	0,288
	55	0,279	5	,200*	0,825	5	0,127
	60	0,264	4	.	0,873	4	0,31
	65	0,348	4	.	0,867	4	0,284
	70	0,351	3	.	0,828	3	0,183
75	0,346	5	0,05	0,669	5	0,004	
Tratamiento 4	15	0,206	5	,200*	0,91	5	0,466

(Mezcla)	20	0,281	3	.	0,937	3	0,514
	25	0,339	3	.	0,85	3	0,24
	30	0,263	3	.	0,956	3	0,594
	35	0,299	4	.	0,823	4	0,149
	40	0,307	3	.	0,903	3	0,395
	45	0,265	4	.	0,929	4	0,588
	50	0,232	5	,200*	0,903	5	0,426
	55	0,272	5	,200*	0,935	5	0,633
	60	0,298	4	.	0,765	4	0,053
	65	0,215	4	.	0,934	4	0,62
	70	0,375	3	.	0,774	3	0,053
	75	0,212	5	,200*	0,89	5	0,356
Tratamiento 4 (BAL)	15	0,306	5	0,143	0,88	5	0,308
	20	0,196	3	.	0,996	3	0,878
	25	0,3	3	.	0,913	3	0,43
	30	0,266	3	.	0,953	3	0,582
	35	0,259	4	.	0,85	4	0,225
	40	0,245	3	.	0,97	3	0,669
	45	0,353	4	.	0,858	4	0,254
	50	0,443	5	0,002	0,637	5	0,002
	55	0,233	5	,200*	0,843	5	0,172
	60	0,293	4	.	0,928	4	0,585
	65	0,246	4	.	0,948	4	0,703
	70	0,203	3	.	0,994	3	0,849
75	0,351	5	0,043	0,842	5	0,17	
Tratamiento 4 (BAP)	15	0,309	5	0,134	0,734	5	0,021
	20	0,273	3	.	0,946	3	0,552
	25	0,236	3	.	0,977	3	0,712
	30	0,231	3	.	0,98	3	0,731
	35	0,214	4	.	0,979	4	0,897
	40	0,316	3	.	0,89	3	0,355
	45	0,345	4	.	0,785	4	0,077
	50	0,208	5	,200*	0,963	5	0,83
	55	0,288	5	,200*	0,828	5	0,135
	60	0,268	4	.	0,876	4	0,322
	65	0,223	4	.	0,955	4	0,746
	70	0,331	3	.	0,864	3	0,279
	75	0,305	5	0,144	0,77	5	0,045
	35	0,177	4	.	0,979	4	0,898
	40	0,208	3	.	0,992	3	0,826
	45	0,251	4	.	0,927	4	0,574
	50	0,254	5	,200*	0,914	5	0,492
	55	0,297	5	0,17	0,844	5	0,176
	60	0,281	4	.	0,812	4	0,126
	65	0,292	4	.	0,799	4	0,1
70	0,385	3	.	0,75	3	0	
75	0,281	5	,200*	0,899	5	0,403	
Recuento en Placa	Etapas en Planta	Kolmogorov-Smirnov^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig. p	Estadístico	gl	Sig. p
<i>E.coli</i>	4	0,252	4	.	0,885	4	0,36
<i>S.aureus</i>	1	0,203	6	,200*	0,853	6	0,166

	4	0,263	4	.	0,833	4	0,175
	5	0,198	10	,200*	0,898	10	0,209
BAL	3	0,407	6	0,002	0,64	6	0,001
	4	0,395	4	.	0,769	4	0,058
	5	0,288	10	0,018	0,764	10	0,005
BAP	2	0,407	6	0,002	0,64	6	0,001
	3	0,256	6	,200*	0,827	6	0,101
	4	0,307	4	.	0,748	4	0,037
	5	0,191	10	,200*	0,899	10	0,216

Etapas en planta: 1. Leche Cruda / 2. Leche termizada / 3.Coagulación final / 4. Prensado inicial/ 5. Inicio de maduración