



# EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL QUESO DE HOJA TRADICIONAL DE ECUADOR ELABORADO ARTESANAL E INDUSTRIALMENTE

## EVALUATION OF THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF TRADITIONAL LEAF CHEESE IN ECUADOR BOTH HANDCRAFTED AND INDUSTRIALLY PRODUCED

Ana Karina Albuja Landi<sup>1,4\*</sup>; Janneth Gallegos<sup>1,2</sup>; Paola Vargas Vargas<sup>2</sup>; Paola Arguello Hernández<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Seguridad Alimentaria Grupo de Investigación y Desarrollo "SAGID". Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Pecuarias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

<sup>4</sup>Facultad de Salud Pública. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

\*corresponding author: aalbuja@epoch.edu.ec

### ORIGINAL

#### RESUMEN

Uno de los quesos frescos tradicionales típicos del Ecuador es el queso de hoja, un queso de pasta hilada, que se elabora de manera artesanal envuelto en hoja de achira (*Canna indica*), mientras en la industria es empaquetado al vacío en bolsas de polietileno. En el presente estudio se comparó la calidad microbiológica de estos quesos, evaluando los indicadores de la calidad higiénico-sanitaria, además se cuantificaron y caracterizaron fenotípicamente bacterias ácido lácticas (BAL). Las muestras se recolectaron en queseras artesanales y plantas industriales de la ciudad de Latacunga. Se determinaron recuentos de aerobios mesófilos aplicando la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529 5, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se analizaron utilizando placas Petrifilm (AOAC 991.14 - AOAC 2003.07). El recuento de bacterias ácido lácticas empleó el método PRT-712.02-047. Los resultados de los indicadores de la calidad higiénico-sanitaria: coliformes, *E. coli* y *S. aureus* examinados en los quesos de hoja artesanales y de elaboración industrial, en todos los casos superaron los límites de aceptabilidad establecidos por la normativa ecuatoriana, sugiriendo deficiente calidad higiénica de los procesos o incorrecta manipulación de la leche empleada como materia prima. Los recuentos de *Lactobacillus* y *Lactococcus* en los quesos industriales presentaron una reducción estadísticamente significativa comparados con los recuentos de estos microorganismos en los quesos artesanales, esto corresponde a una diferencia en porcentaje de 18,15 % y 14,27 % respectivamente. Se aisló un total de 32 cepas de bacterias de ácido láctico, estas mostraron características fenotípicas similares, pero tuvieron una respuesta diferente a la tolerancia a niveles de pH (4.4; 9.4) y NaCl (6.5 %). Es importante complementar la evaluación microbiológica con un análisis sensorial para evaluar el efecto de las BAL sobre las características organolépticas de los quesos de hoja de procedencia artesanal e industrial.

#### ABSTRACT

One of the traditional fresh cheeses in Ecuador is the artisanal leaf cheese, a kind of stretched-curd cheese. The artisanal product is wrapped in achira leaves (*Canna indica*), while the industrial leaf cheese is packed at vacuum in high density polyethylene bags. In this study the microbiological quality of both products was compared. The hygienic-sanitary microbial indicators and lactic acid bacteria (LAB) were quantified. The LAB isolated were characterized phenotypically. The samples were obtained from artisanal cheese-making and industrial located in Latacunga city province Cotopaxi.

The total aerobic mesophilic count was made based on national regulations (NTE INEN 1529 5); total coliforms, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was evaluated using petrifilm methods (AOAC 991.14 - AOAC 2003.07) and to LAB was used PRT-712.02-047. The results show high quantities of total coliforms, *E. coli* and *S. aureus* in both products, these data exceed the limits of acceptability established in Ecuadorian regulations, this evidence poor hygienic quality of the processes or incorrect controls of milk as raw material. The lactic acid bacteria count showed statistically significant differences, the industrial cheeses had a reduction of 18,15% of *Lactobacillus* and 14,27% of *Lactococcus* compared with artisanal cheeses. A total of 32 strains of lactic acid bacteria were isolated, these showed similar phenotypic characteristics, but these had a different response at the level of pH (4,4;9,4) and NaCl (6,5%). The sensory evaluation will be an important complement in this type of study.

#### Palabras Clave:

Bacterias ácido lácticas  
Calidad higiénico-sanitaria  
Quesos de hoja artesanal  
Queso de hoja industrial

#### Keywords:

Lactic acid bacteria  
Sanitary quality  
Artisan leaf cheese  
Industrial leaf cheese

## 1. INTRODUCCIÓN

El queso es un alimento, que aporta a la dieta de la población, a la vez que constituye un bien cultural alimentario, y sustenta una cadena de valor local de importancia económica, que puede contribuir al desarrollo local y regional (1).

Entre los quesos elaborados en el mundo están los quesos de pasta hilada que incluyen variedades de quesos como el Mozzarella, Provolone, Scamorza, Caciocavallo originados en el norte del mediterráneo (Italia, Grecia, los Balcanes, y Turquía), su principal característica es el tratamiento térmico aplicado una vez obtenida la cuajada, la cual es sumergida en agua, suero o salmuera calientes y se manipula mecánica o manualmente hasta obtener una consistencia plástica seguida de moldeo según la forma y tamaño deseado (2). Uno de los ingredientes de estos quesos es un cultivo iniciador empleado para incrementar la acidez de la leche y subsecuentemente de la cuajada lo que permitirá su plastificación y estimamiento por efecto del calentamiento (3).

Uno de los quesos tradicionales elaborados en Ecuador y que se encuentra en la categoría de pasta hilada, es el queso de hoja, la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 1528, lo define como un producto no madurado obtenido a partir de queso criollo acidificado de forma natural en presencia de bacterias mesófilas nativas de Ecuador no patógenas; sometido a calentamiento previo al hilado, su característica es la envoltura en hoja de achira (*Canna indica*) (4).

Este producto está catalogado como patrimonio culinario de la región Sierra (5). Las ciudades en las que se elaboran y comercializan con su particular envoltura son Cayambe y Latacunga (6), sin embargo, estos quesos no cuentan con notificación sanitaria, en contraste, las plantas procesadoras de lácteos los comercializan envasados al vacío en bolsas de polietileno de alta densidad y con la respectiva notificación sanitaria.

Las queseras artesanales generalmente elaboran su producto con leche no pasteurizada, esto genera su acidificación por la actividad metabólica de las bacterias nativas, debiendo aplicarse las prácticas correctas de higiene en su elaboración para prevenir la contaminación cruzada, y evitar la presencia de microorganismos potencialmente patógenos. En el caso de los quesos de hoja procedentes de plantas industriales, al recibir la leche un tratamiento térmico, que disminuye las bacterias patógenas, también disminuye la microbiota nativa. En este marco, el objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad microbiológica de los quesos de hoja en términos de microorganismos indicadores de la calidad higiénico – sanitaria, adicionalmente se evaluaron niveles de las bacterias ácido lácticas y se caracterizaron fenotípicamente 32 aislados.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Localización geográfica del estudio

El estudio se realizó con muestras seleccionadas de queso de hoja artesanal e industrial elaborado en la ciudad de Latacunga ( $0^{\circ}56'6.8''$  S  $78^{\circ}36'55.9''$  O), provincia de Cotopaxi - Ecuador.

### 2.2 Toma de muestras

Las muestras se tomaron de tres queseras artesanales (QHA1, QHA2, QHA3), que empaican sus productos en hojas de achira (*Canna indica*) y de una industria local (QHI1, QHI2), que los comercializa en bolsas de plástico de polietileno de alta densidad Figura 1.

De cada quesera se tomaron aleatoriamente 2 muestras por un periodo de tres semanas consecutivas, examinando un total de 30 muestras de acuerdo a lo especificado por la Norma NTE. INEN 1529-2-2013 (7). Las muestras fueron tomadas de los lugares de comercialización.



Figura 1. Queso de Hoja A: industrial empacado en bolsas de plástico de polietileno de alta densidad; B: artesanal empacado en hojas de achira

### 2.3 Material y método

Para la preparación de las diluciones de las muestras de queso de hoja se trabajó, con diluciones sucesivas de orden diez según lo especificado por la norma NTE INEN 1529-2-2013 (7) utilizando como diluyente agua de peptona al 0,1.%.

#### 2.3.a Recuento de microorganismos aerobios mesófilos

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se realizó de acuerdo a la norma NTE INEN 1529-5 (8), por el método de inoculación con vertido en placa, utilizando 1 mL de la dilución requerida en PCA (DIFCO 770572), incubando a  $30.0^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  de 48 a 75 h.



### 2.3.b Recuento de bacterias coliformes, *E. coli* y *S. aureus*

Para este ensayo se emplearon los métodos oficiales para recuentos mediante la técnica de Petrifilm, AOAC 991.14 para *E. coli*/coliformes (9) y AOAC 2003.07 para *S. aureus* (7).

### 2.3.c Recuento de bacterias ácido lácticas (BAL)

Para el recuento de BAL se consideró como referencia la Norma PRT-712.02-047 (10) del Instituto de Salud Pública de Chile y la Norma ISO 16068 (11), empleando el método de vertido en placa. Los recuentos de lactobacilos se realizaron en el medio MRS (Man Rogosa Sharpe, OXOID CM0361), acidificado a pH 4.5 y los recuentos de *Lactococcus* en el medio M17 Agar (OXOID CM0785). Se mezcló 1 mL de la dilución requerida con agar fundido, incubando las placas a 37 °C por 72 h en condiciones aeróbicas para el medio MRS (10). Mientras que para el agar M17, las placas se incubaron a 32 °C por 48h en condiciones microaerófilas utilizando el sistema de jarras Gas-Pack (10).

Para conocer la reducción del crecimiento de *Lactobacillus* y *Lactococcus* en quesos industriales respecto a BAL de quesos artesanales, se aplicó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ reducción} = (\text{No} - \text{Nf}) / \text{No} \times 100.$$

Donde:

No = Población de *Lactobacillus* o *Lactococcus* (valor promedio) en quesos artesanales.

Nf = Población de *Lactobacillus* o *Lactococcus* (valor promedio) en quesos industriales.

### 2.3.d. Caracterización fenotípica de aislados de BAL

Los cultivos de BAL provenientes de queseras artesanales e industriales se examinaron macroscópicamente previa la selección de colonias de morfología más representativa, cada colonia se purificó mediante 3 transferencias sucesivas en un nuevo medio de cultivo hasta la obtención de cultivos puros, después cada colonia se examinó para la respuesta al Gram y los ensayos: catalasa, oxidasa, movilidad, crecimiento a 10 °C y 45 °C, en medio salino con concentración de NaCl 6.5 % y NaCl 18 %, a pH 4.4 y pH 9.6 además la producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa.

### Análisis estadístico

Los resultados de los ensayos de enumeración de los indicadores de higiene y de BAL, se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía, seguido por el test de Tukey ( $P < 0.05$ ) empleando el software INFOSTAT 2017 para determinar las diferencias significativas.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Recuento de microorganismos indicadores de calidad higiénico-sanitaria

En la Tabla 1 se aprecia la diferencia en los niveles poblacionales de algunos indicadores de calidad higiénico-sanitaria (*Coliformes*, *E. coli*, *S. aureus*) en los quesos de hoja de elaboración artesanal e industrial.

**Tabla 1. Recuentos de microorganismos indicadores de la calidad higiénico-sanitaria**

Muestras	Aerobios Mesófilos	Coliformes	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
QHA1	9,18 <sup>a</sup> ± 0,04	5,67 <sup>a</sup> ± 0,08	1,80 <sup>a</sup> ± 0,06	3,46 <sup>a</sup> ± 0,04
QHA2	8,59 <sup>a</sup> ± 0,10	6,56 <sup>a</sup> ± 0,17	0	3,38 <sup>a</sup> ± 0,07
QHA3	9,35 <sup>a</sup> ± 0,08	6,35 <sup>a</sup> ± 0,10	1,67 <sup>a</sup> ± 0,00	3,41 <sup>a</sup> ± 0,11
QHI1	7,81 <sup>b</sup> ± 0,06	3,64 <sup>b</sup> ± 0,07	0	0
QHI2	7,36 <sup>b</sup> ± 0,03	3,65 <sup>b</sup> ± 0,07	0	0

<sup>a-b</sup> Valores de grupos microbianos en quesos, dentro de una misma columna, que no comparten el mismo superíndice son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores expresados en Log UFC/g se presentan como las medias ± la desviación estándar de 3 réplicas procedentes de 2 muestras de queso de hoja artesanal (QHA) o industrial (QHI), que representan a un total de 30 muestras

### 3.2 Recuento de Bacterias ácido lácticas

En la Tabla 2 se muestran los niveles poblacionales de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* y *Lactococcus*) expresados en Log 10 UFC/g en los quesos de hoja de elaboración artesanal e industrial.

**Tabla 2. Niveles de *Lactobacillus* y *Lactococcus***

Muestras	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>
QHA1	9,16 <sup>ax</sup> ± 0,27	9,39 <sup>ax</sup> ± 0,26
QHA2	8,76 <sup>ax</sup> ± 0,09	9,15 <sup>ax</sup> ± 0,34
QHA3	9,35 <sup>ax</sup> ± 0,22	9,41 <sup>ax</sup> ± 0,15
QHI1	7,82 <sup>bx</sup> ± 0,04	8,27 <sup>by</sup> ± 0,04
QHI2	7,06 <sup>bx</sup> ± 0,08	7,70 <sup>by</sup> ± 0,06

<sup>a-b</sup> Valores de grupos microbianos en quesos, dentro de una misma columna, que no comparten el mismo superíndice son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

<sup>x-y</sup> Valores de grupos microbianos en quesos, dentro de una misma fila, que no comparten el mismo superíndice son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores expresados en Log UFC/g se presentan como las medias ± la desviación estándar de 3 réplicas procedentes de 2 muestras de queso de hoja artesanal (QHA) o industrial (QHI), que representan a un total de 30 muestras

### 3.3 Caracterización metabólica de cepas BAL

Se examinaron 18 aislados en el medio MRS y 14 en el medio M17 incubado en condiciones anaerobias, de los cuales 21 provinieron del queso de hoja artesanal y 11 del industrial. Los aislados de presuntas BAL purificadas, cuyos ensayos de identificación fenotípica les presenta como colonias lenticulares de color blanco, que agrupan bacilos o cocos Gram (+), catalasa (-), oxidasa (-), no móviles, condujeron a la caracterización de los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus* como parte de la microbiota responsable de la formación del queso de hoja y de sus atributos sensoriales: olor, sabor, flavor y textura.

En la figura 2 se muestran los seis grupos del BAL caracterizados en función de su morfología y su respuesta metabólica frente al crecimiento bacteriano a diferentes temperaturas, concentración salina, variación de pH y producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa.

Grupo A: *Lactobacillus* s.p Crecimiento a 10 °C y 45 °C (+); NaCl 6.5 % (+); NaCl 18% (-); pH 4.4 (+); pH 9.6 (+); CO<sub>2</sub> de la glucosa (-).

Grupo B: *Lactobacillus* s.p Crecimiento a 10 °C y 45 °C (+); NaCl 6.5% (+); NaCl 18% (-); pH 4.4 (+); pH 9.6 (-); CO<sub>2</sub> de la glucosa (-).

Grupo C: *Lactobacillus* s.p Crecimiento a 10 °C y 45 °C (+); NaCl 6.5 % (-); NaCl 18 % (-); pH 4.4 (-); pH 9.6 (+); CO<sub>2</sub> de la glucosa (-).

Grupo D: *Lactobacillus* s.p Crecimiento a 10 °C y 45 °C (+); NaCl 6.5 % (-); NaCl 18% (-); pH 4.4 (-); pH 9.6 (+); CO<sub>2</sub> de la glucosa (-).

Grupo E: *Lactobacillus* s.p Crecimiento a 10 °C y 45 °C (+); NaCl 6.5% (+); NaCl 18% (-); pH 4.4 (-); pH 9.6 (-); CO<sub>2</sub> de la glucosa (-).

Grupo F: *Lactococcus* s.p Crecimiento a 10°C y 45°C (+); NaCl 6.5% (+); NaCl 18% (-); pH 4.4 (-); pH 9.6 (+); CO<sub>2</sub> de la glucosa (-).

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Recuento de microorganismos indicadores de la calidad higiénico-sanitaria

De manera global, los recuentos de coliformes, *E. coli* y *S. aureus* examinados en los quesos de hoja de elaboración artesanal e industrial superan los límites de aceptabilidad establecidos en la normativa ecuatoriana, sugiriendo pobre calidad higiénica del proceso y/o incorrecta manipulación de la leche como materia prima. Para reducir estos niveles es necesario mejorar la aplicación de las correctas prácticas de higiene tal como lo establecen los programas de HACCP (13).

Por otra parte, se aprecia diferencias estadísticamente significativas en los niveles de estos microorganismos dependiendo de su origen, los elaborados artesanalmente presentaron los niveles más altos de indicadores, en contraste en los quesos de elaboración industrial hubo ausencia de *S. aureus* y *E. coli* y una reducción de 70 % en coliformes y 19 % en aerobios mesófilos.

La reducción de la microbiota se puede atribuir a que en la elaboración industrial por lo general el control de calidad de la materia prima es riguroso, se aplica tratamiento térmico a la leche cruda, se controla las condiciones higiénico sanitarias del proceso,

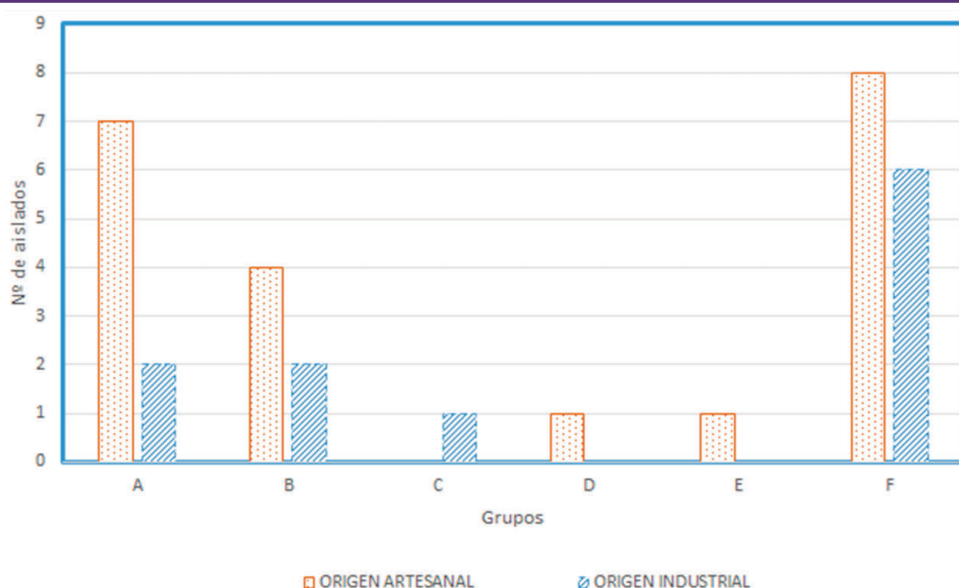


Figura 2. Número de BAL aisladas de quesos artesanales e industriales clasificadas en seis grupos según su morfología y respuesta metabólica.





el grado de manipulación de los operarios es menor, además se debe considerar que el material de empaque usado, bolsas de polietileno de alta densidad, representa un envase aséptico sumado al empackado al vacío, versus hojas de vegetales, un producto natural sin cierre hermético que puede propiciar el ingreso de contaminantes.

El grupo de *aerobios* mesófilos comprende microorganismos aerobios y anaerobios facultativos que se desarrollan a temperaturas medias, estos representan la totalidad de la carga microbiana cultivable. Su determinación es importante para la calidad y seguridad del queso debido a que existe el riesgo de la presencia de patógenos y microorganismos causantes de la descomposición del producto que sobreviven al calentamiento de la leche o al tratamiento térmico (14).

Su recuento alto en los quesos de hoja artesanales o industriales no necesariamente indican alteración inminente debido a que el queso es un alimento vivo, una matriz que está constantemente en evolución, sin embargo, en el caso de quesos de hoja, dada su naturaleza perecible este indicador si puede asociarse a calidad higiénico-sanitaria y sugerir problemas de higiene o abuso de temperaturas durante el transporte o conservación del producto.

Los coliformes agrupan a especies no categorizadas taxonómicamente, aunque están ampliamente distribuidas en el ambiente, sin embargo, existe un subgrupo cuyo origen es intestinal, siendo *E. coli* la especie más relevante, por la existencia de serotipos patogénicos. En realidad, el grupo coliforme se ha empleado históricamente como indicador de higiene asociado a contaminación fecal, sin embargo, varios estudios han demostrado que la mayoría de coliformes provienen de fuentes ambientales por consiguiente los niveles de coliformes en el queso raramente indicarían contaminación fecal (15), por lo tanto, la presencia de *E. coli* en el queso de hoja depende exclusivamente de las condiciones higiénicas deficitarias durante la producción, por contaminación de la materia prima, superficies inertes (equipos, accesorios, utensilios, pisos, paredes), del aire de la sala de elaboración y a través de los operarios, es decir este grupo puede establecerse en los quesos por contaminación cruzada.

*S. aureus*, es el indicador específico de contaminación a través de los manipuladores y puede transferirse al queso de hoja a partir de la leche contaminada intrínsecamente o de superficies vivas tales como la ubre de la vaca, piel, manos, uñas y cabello de los operadores, con el peligro de que su multiplicación en el queso resulte favorable para la producción de una enterotoxina termorresistente, agente de intoxicación estafilocócica (16). Las superficies inertes también son foco de contaminación y parece que no basta controlar sus niveles con limpieza y desinfección, dada su capacidad de formar biopelículas y resistir a ambientes hostiles (17).

Cabe recalcar que el queso de hoja de cualquier sistema de elaboración es susceptible de adquirir otros microorganismos secundarios mientras se combina con los componentes ambientales, en su recorrido del campo a la mesa, de modo que los indicadores pueden sobrepasar los criterios microbiológicos de aceptación.

En quesería, el paso de la elaboración casera a la producción masiva y tecnificada sin duda resulta en mayores volúmenes de producción, un mejor control en las características físicas, físico-químicas y microbiológicas, involucra además una estandarización de actividades, procesos y productos que puede reflejarse en una mejor calidad higiénica.

Además, es innegable que los quesos tradicionales de hoja, comercializados a pequeña escala pueden ser alimentos muy importantes por su contribución al desarrollo de zonas rurales del país y de su población.

## 4.2. Recuento de bacterias ácido lácticas

En este estudio, la mayoría de *Lactobacillus* son fisiológicamente similares y comparten los mismos requerimientos nutricionales, forman colonias de igual morfología al crecer en el medio de cultivo MRS a pH 5.4, el uso de este medio de cultivo acidificado, promueve el crecimiento únicamente de lactobacilos que toleran niveles de pH más bajos (pH 5.0 – 6.5) que los *Lactococcus* (18).

Los recuentos de *Lactobacillus* y *Lactococcus* en los quesos de hoja artesanales y de elaboración industrial variaron entre  $7,06 \pm 0,08$  UFC/g y  $9,41 \pm 0,15$  UFC/g, en las muestras examinadas (Tabla 2), estos valores se muestran próximos a los determinados en quesos similares de pasta hilada producidos en otras latitudes, como el queso Oaxaca muy popular en México elaborado artesanalmente con leche cruda, el cual reveló  $9,8 \pm 0,8$  log UFC/g de *Lactobacillus* (19), mientras en el queso artesanal hondureño, se encontraron niveles de BAL entre 1,00 a  $8,95$  log UFC/g, con un promedio general de  $4,76 \pm 1,99$  UFC/g (20).

Los niveles poblaciones de *Lactococcus* y *Lactobacillus* fueron similares en los quesos de hoja artesanal, en el caso de los quesos industriales existe mayor cantidad de *Lactococcus* respecto a *Lactobacillus* (Tabla 2). Este resultado es similar al reportado en el queso fresco de pasta hilada *Fior di latte* elaborado en las regiones del sur de Italia que presentaron un nivel más elevado de cocos frente a bacilos (21).

Adicionalmente, los productos industriales se distinguen de los artesanales por la reducción poblacional de *Lactobacillus* en 18,15 % y *Lactococcus* en 14,27 %. Estas reducciones se atribuyen al efecto de un tratamiento térmico más intenso empleado durante el procesado industrial. En este caso, la tecnificación del proceso de elaboración del queso, aunque significa mejoras en la higiene y conservación del producto, reduce los niveles de BAL, que son las bac-



terias más importantes implicadas en el sabor, aroma y textura del queso. Se sabe que el aroma está dado principalmente por compuestos orgánicos volátiles derivados del metabolismo de la BAL y depende de aspectos tecnológicos específicos de los distintos tipos de queso (22).

### 4.3. Caracterización metabólica de cepas BAL

Las características organolépticas, así como la vida útil y la seguridad del queso, dependen en gran medida de la composición y la evolución de su microbiota (23). En este sentido, algunos estudios centrados en la biodiversidad bacteriana de los quesos de hoja artesanales pueden conducir al desarrollo de cultivos iniciadores y cultivos adjuntos de importancia tecnológica (24), que permitan obtener quesos de hoja industriales con mejores características sensoriales, de ahí que en el presente estudio a partir de un tamizaje rápido y económico se caracterizaron 32 cepas de BAL en función de los atributos de crecimiento y su morfología.

Dichas características permitieron la discriminación en 6 grupos (Figura 2) con base en la similitud de respuestas a los diferentes ensayos. Esta primera clasificación sirve de aproximación a la selección de BAL con características de interés para la industria quesera.

Todos los aislados de los grupos A, B, C, D, E, F, crecieron a temperaturas de 10 °C y 45 °C, algunas especies como *Lactobacillus plantarum* pueden desarrollarse simultáneamente en estos dos valores, sin embargo, en la práctica es poco común encontrar este comportamiento. Los resultados obtenidos en esta investigación contrastan con lo anterior, ya que el 100 % de los aislados crecieron en dichas temperaturas, esto puede atribuirse a que las BAL para responder al estrés por los cambios bruscos de temperatura disponen de un mecanismo adaptativo mediante la activación de proteínas de choque térmico (HSPs) o de proteínas inducidas por el frío (CIP) cuando hay ambientes muy fríos, garantizando así su supervivencia (25).

En cuanto al crecimiento en medio MRS con NaCl, ninguno de los aislados se desarrolló en una concentración salina al 18%, coincidiendo con la mayoría de las BAL que no crecen en este ambiente, excepto *Tetragenococcus* (26). En cambio, los aislados de los grupos A, B, E, F, crecen en NaCl al 6.5 % a diferencia de los aislados en C y D, que no crecen bajo esta condición. En un estudio con varios quesos europeos se detectaron BAL con tolerancia al 7.0 % de NaCl, dato consistente con lo ocurrido en este estudio (27). Sin embargo, las respuestas distintas de halotolerancia pueden explicarse por la biodiversidad (28). De otro lado, la halotolerancia de las cepas analizadas, indica que estas podrían exhibir propiedades tecnológicas y enzimas de interés, no solo para la industria láctea sino para el sector biotecnológico (29). En general, se sabe que la regulación de

los genes inducidos por la presión osmótica afecta al estado fisiológico y a las propiedades de las BAL, también afecta indirectamente a la formación de metabolitos (30).

En relación al pH, varias cepas mostraron variabilidad de crecimiento, según (31) el crecimiento de *Lactobacillus* a pH 4.4 es variable, en este sentido otro estudio (27) caracterizó cepas de BAL de quesos utilizando medios alcalinos pH 9.5; esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio Figura 2.

Ningún grupo presentó producción de CO<sub>2</sub> por fermentación de la glucosa, cumpliendo la característica de las cepas aisladas del queso de hoja que no deberían ser formadoras de gas, rasgo que es característico de algunos quesos madurados como el Gouda (32). La no producción de gas es típica de los bacilos homofermentativos, cuyo principal producto metabólico es el ácido láctico, en cambio las BAL heterofermentativas, además de ácido láctico generan otros compuestos entre los que se encuentran el dióxido de carbono. Sin embargo, de acuerdo al esquema de clasificación general propuesto por (33) solamente el grupo B (6 cepas) se caracteriza como *Lactobacillus*. Los aislados restantes *Lactobacillus* (A, C, D, E) presentan características diferentes pese a que son BAL, por lo que las respuestas a estos ensayos no son concluyentes para la identificación de especie sin embargo se debe destacar la diversidad de bacterias lácticas presentes en el queso de hoja ecuatoriano.

En cuanto a los *Lactococcus* (Grupo F) de acuerdo a (34) presentan las características propias de este género, pudiendo pertenecer a *Enterococcus*. Dentro de las BAL también los géneros *Tetragenococcus* y *Aerococcus*, se desarrollan a pH 9.6.

Aparte de las características descritas para *Enterococcus*: crecimiento a 10 °C y 45 °C, en 6.5 % de NaCl y a pH 9.6, su sobrevivencia después de calentamiento a 60 °C durante 30 minutos asegura la correspondencia a este género, en esta ocasión no se realizó dicho ensayo *in vitro*, sin embargo, se evidencia la tolerancia de aislados de BAL a dicha temperatura ya que durante el procesamiento se realiza el estiramiento de la pasta a 70 °C.

## 5. CONCLUSIONES

La evaluación microbiológica comparativa de los quesos de hoja artesanales e industriales, mediante niveles de indicadores de higiene, superan los límites de aceptabilidad descritos en la normativa ecuatoriana, sugiriendo pobre calidad higiénica de los procesos, del entorno o incorrecta manipulación de la leche; para reducir estos niveles es necesario mejorar la aplicación de las correctas prácticas de higiene tal como lo establecen los programas del sistema HACCP. Adicionalmente la intensidad del tratamiento térmico aplicado afecta a los niveles poblacionales de BAL en los dos tipos de quesos examinados.



El queso de hoja artesanal es potencial fuente de BAL indígenas, a partir de las cuales se pueden preparar cultivos iniciadores y no iniciadores que diversifiquen el flavour y aroma de los quesos elaborados industrialmente.

Sin duda, el queso de hoja elaborado artesanalmente requiere mejoras en el aspecto higiénico e innovación a fin de garantizar su calidad e inocuidad, sin pérdida de sus características sensoriales típicas que lo identifican como un elemento representante de la gastronomía ecuatoriana-española y un atractivo turístico de Latacunga, Ecuador.

## 6. REFERENCIAS

- Villegas A, Cervantes FE. La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estud Soc.* 2011; 38:146–64.
- Méndez C. Fundamentos químicos y microbiológicos en la fabricación de quesos. In: Editor EC, editor. *Fabricación de quesos en el mundo*. 2018. p. 47–62. Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/espochsp/detail.action?docID=5426368&query=el+aboración+de+quesos+en+el+mundo#>
- Mcmahon DJ, Oberg CJ. *Pasta-Filata Cheeses*. Fourth Edi. Cheese. Elsevier Ltd; 2017. 1041-1068 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4/00040-5>
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1528:2012 Primera revisión. Norma General para quesos frescos no madurados. Requisitos. Disponible en: <https://archive.org/details/ec.nte.1528.2012/page/n1/mode/2up>.
- Ministerio de Cultura y Patrimonio. Queso de hoja - Patrimonio Alimentario. 2016. Disponible en: [http://patrimonioalimentario.culturaypatrimonio.gob.ec/wiki/index.php/Queso\\_de\\_hoja](http://patrimonioalimentario.culturaypatrimonio.gob.ec/wiki/index.php/Queso_de_hoja)
- Vizcarra R, Lasso R, Tapia D. La Leche del Ecuador. CILEC (Centro La Industria Láctea Del Ecuador) 2015;183. Disponible en: [http://www.pichincha.gob.ec/phocadownload/publicaciones/la\\_leche\\_del\\_ecuador.pdf](http://www.pichincha.gob.ec/phocadownload/publicaciones/la_leche_del_ecuador.pdf)
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-2: 2013 Control Microbiológico de los Alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Disponible en: <https://archive.org/details/ec.nte.1529.2.1999/page/n1/mode/2up>
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-5:2006. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. Disponible en: <https://archive.org/stream/ec.nte.1529.5.2006#page/n1/mode/2up>. AOAC Official Method 991.14: Coliform and Escherichia coli Counts in Foods. Disponible en: <http://www.longrunbio.com/uploads/soft/130814/1-130Q4144244.pdf>.
- NORMA (PRT-712.02-047): 2010. Recuento de Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus en yogurt. Procedimiento. Disponible en: <https://studylib.es/doc/4809786/prt-712.02-047-v2-lactobac-y-strept-yogurt>
- NORMA ISO 16068 :2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - colony-count technique at 30 degrees. Disponible en: [https://infostore.saiglobal.com/en-us/Standards/BIS-IS-16068-2013-188443\\_SAIG\\_BIS\\_BIS\\_452132/](https://infostore.saiglobal.com/en-us/Standards/BIS-IS-16068-2013-188443_SAIG_BIS_BIS_452132/).
- Marotta S, Giarratana F, Raffaele G, et al. Industrial and artisanal fresh filled pasta: Quality evaluation. *Journal of Food Processing and Preservation*. J Food Process Preserv 2018; 42:13340 Disponible en : <https://doi.org/10.1111/jfpp.13340>.
- Arguello P, Lucero O, Castillo G, et al. Calidad microbiológica de los quesos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba (Ecuador). *Perspectiva* 2015; 16:65-74.
- Murphy N, Barbano M, Wiedmann M. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *J. Dairy Sci.* 2016; 99:10128–10149.
- Martin N, Trmčić T, Hsieh K, et al. Evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. *Front. Microbiol.* 2016; 7:1549.
- Kümmel J, Stessl B, Gonano M, et al. Staphylococcus aureus entrance into the dairy chain: Tracking S. aureus from dairy cow to cheese. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7:1-11.
- Gutierrez D, Delgado S, Vazquez-Sanchez D, et al. Incidence of Staphylococcus aureus and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78:8547-8554.
- Corry J, Curtis G, Baird R, *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology*. Tercera. The Royal Society Of Chemistry, 2012. ISBN 9781847559166.
- Castro G, Martínez F, Martínez A, et al. Caracterización de la microbiota nativa del queso Oaxaca tradicional en tres fases de elaboración. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*; 2013; 105–109.
- Enríquez L, Díaz JJ, Pinto A, et al. Characterization of Microbiota Isolated from Traditional Honduran Cheese. *Journal of Food & Industrial Microbiology* 2016; 2:1-7. DOI 10.4172/2572-4134.1000117. Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/characterization-of-microbiota-isolated-from-traditional-honduran-cheese.php?aid=83273>.
- Coppola S, Fusco V, Andolfi R, et al. Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area. *Journal of dairy Research* 2006; 73: 264-272.
- Bergamaschi M, Bittante G. From milk to cheese: Evolution of flavor



## DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA

Los autores de este manuscrito declaran no tener ningún tipo de conflicto de intereses.

- fingerprint of milk, cream, curd, whey, ricotta, scotta, and ripened cheese obtained during summer Alpine pasture *J. Dairy Sci.* 2018; 101:3918–3934.
22. Riquelme C, Camara S, De Lurdes M, et al. Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). *Int. J. Food Microbiol.* 2015; 192: 86–94. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.03116.
  23. Irlinger F, Mounier J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* 2009; 20:142-148.
  24. Doyle, Michael P. *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. Springer, 2011. ISBN 9780387927701.
  25. Bergey. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second. 2009. ISBN 9780387950419.
  26. Melgar G, Morales F, Rivera Y, et al. Importance of halophilic and halotolerant lactic acid bacteria in Cheeses. In *Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems*. Springer, NY 2015; 279-287.
  27. Morales, Fredy, et al. "Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses." *Applied biochemistry and biotechnology* 2011; 164:889-905. DOI 10.1007/s12010-011-91826.
  28. Haastrup, Martin Kragelund, et al. "Cheese brines from Danish dairies reveal a complex microbiota comprising several halotolerant bacteria and yeasts." *International journal of food microbiology* 2018; 285:173-187.
  29. Wu, W and Zhao N. *Metabolomics of Lactic Acid Bacteria in: Chem W. Lactic acid Bacteria Omics and Functional Evaluation*. Springer Nature Singapore Pte Ltd and Science Press 2019; 167-182. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978\\_981\\_13\\_7822\\_4\\_6](https://doi.org/10.1007/978_981_13_7822_4_6)
  30. Salminen M, Tynkkynen S, Rautelin H, et al. "Lactobacillus bacteremia during a rapid increase in probiotic use of Lactobacillus rhamnosus GG in Finland." *Clinical infectious diseases* 2002; 35.10: 1155-1160.
  31. McSweeney P, Fox P, Cotter P, Everett D. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fourth. Elsevier Academic Press 2017. ISBN 9780124170124.
  32. Lahtinen S, Ouwehand A, Salminen S; Wright. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 2012. ISBN 9781439836781.
  33. Moreno M, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, et al. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiology* 2006; 106.1:1–24.

Si desea citar nuestro artículo:  
Ana Karina Albuja Landi; Janneth Gallegos, et al/  
**Evaluación de la calidad microbiológica del queso de hoja tradicional de Ecuador elaborado artesanal e industrialmente**  
An Real Acad Farm [Internet].  
An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 2 (2020) · pp. 117 -124  
DOI: <http://>