Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riiit.com.mx

Proceso de manufactura del Queso como método de conservación de la leche
Cheese manufacture process as a milk preservation method

Chacón-Flores, N.A.[a], Olivas, G.I.[a], Acosta-Muñiz, C.H.[a], Gutiérrez-Méndez, N.[b], Sepúlveda, D.R.[a]*

[a] Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo; C.P. 31570; Cuauhtémoc, Chihuahua.
[b] Universidad Autónoma de Chihuahua; CP 31000; Chihuahua, Chihuahua.
nidia.chacon@estudiantes.ciad.mx; golivas@ciad.mx; cacosta@ciad.mx; ngutierrez@uach.mx; dsepulveda@ciad.mx*

Innovación tecnológica: Conocer y aplicar los procedimientos adecuados en la fabricación de queso para conseguir un producto final inocuo.

Área de aplicación industrial: Ciencia de alimentos.

Recibido: 04 julio 2022
Aceptado: 08 mayo 2023

Abstract

Cheese is a product with various benefits such as high nutritional quality, excellent flavor, pleasant texture, versatility of use, and extended shelf life. However, when produced under poor manufacturing practices, it is also susceptible to contamination with disease-causing microorganisms. There are reasons to presume that the conditions used in the process can reduce or eliminate the population of undesirable microorganisms in the final product, therefore the objective of this document is to analyze how the cheese-making process can inhibit the growth of pathogenic microorganisms. In most manufacturing processes, growth of pathogens is observed in the initial stages and then it begins to decrease as the process progresses. There are several factors that contribute to the reduction of pathogens such as the addition of lactic cultures, antimicrobials, temperatures, pH, water activity reduction, storage conditions and the variety of manufactured cheese. Of the treatments and factors considered in this article, it was found that the stretching temperature (80 °C for 5 minutes) in mozzarella cheese is a defining factor on the inhibition of pathogens inoculated at an initial concentration of 100,000 cfu/ml. Low-moisture hard cheeses are safe to consume within a week of their manufacture, thanks to the conditions found in their processes, as well as the characteristics of the finished product.

Keywords: Cheese, Escherichia coli, Cheese manufacture, Staphylococcus aureus, Food safety.

Resumen

El queso es un producto con diversos beneficios como su alta calidad nutrimental, excelente sabor, textura agradable, versatilidad de uso y extendida vida de anaquel. Sin embargo, cuando se elabora bajo malas prácticas de manufactura también es susceptible a la contaminación con microrganismos causantes de enfermedades. Existen motivos para suponer que las condiciones empleadas en el proceso pueden disminuir o eliminar las poblaciones de microorganismos indeseables en el producto final, por ello el objetivo de este documento es analizar cómo el proceso de elaboración de queso, puede inhibir el crecimiento de microrganismos patógenos. En la mayoría de los procesos de elaboración se observa un crecimiento de patógenos en etapas iniciales y después comienza a disminuir mientras avanza el proceso. Existen varios factores que contribuyen a la disminución de patógenos como la adición de cultivos lácticos, antimicrobianos, temperaturas, pH, reducción de la actividad de agua, condiciones de almacenamiento y la variedad de queso fabricado. De los tratamientos y factores que se consideran en este artículo se encontró que la temperatura de estiramiento (80 °C por 5 minutos) en el queso mozzarella es un factor clave en la inhibición total de patógenos inoculados a una concentración inicial de 100 000 ufc/ml. Los quesos duros de baja humedad son seguros para consumirse a una semana de su manufactura, gracias a las condiciones encontradas en sus procesos, así como a las características del producto terminado.

***Palabras clave*:** Queso, *Escherichia coli*, Proceso de manufactura de queso, Inocuidad de alimentos.

I. Introducción

La leche es una peculiar solución acuosa de proteínas, carbohidratos y sales minerales que además contiene grasa emulsionada en la forma de glóbulos, y proteínas altamente especializadas (caseínas) formando micelas ricas en minerales en suspensión coloidal [1]. Este alimento es una rica fuente de nutrientes para el ser humano, lo cual también lo vuelve un excelente medio para el desarrollo de las bacterias que se encuentran en el medio ambiente, las cuales pueden contaminar la leche y proliferar en ella. Algunos de estos microorganismos son indeseables, ya que pueden provocar enfermedades al ser humano o deteriorar la calidad de la leche. Los principales microorganismos patógenos generadores de alertas alimentarias son: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococus aureus*, *Salmonella spp*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Brucella abortus* y *Streptococus agalactiae* [2]. Por otra parte, se pueden encontrar otros microorganismos conocidos como bacterias acido lácticas que son capaces de consumir la lactosa como fuente de energía y producir ácido láctico como subproducto, lo cual, a través de la historia ha dado lugar al surgimiento de los productos lácteos fermentados [3]. Los géneros de bacterias ácido lácticas más representativas son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* [4].

Durante el proceso de manufactura de los productos lácteos, la leche es sometida a diferentes operaciones que la transforman en alimentos radicalmente diferentes en sus características organolépticas, los cuales sin embargo conservan su calidad nutrimental, como sucede en el caso de la manufactura de queso [5]. Las ventajas derivadas de transformar la leche en queso son evidentes en lo referente a su vida de anaquel y estabilidad durante el almacenamiento [6].

Así mismo, al disminuir el contenido de agua se reduce el peso de los productos, lo que facilita su transporte [7]. Finalmente, la transformación de la leche en queso provee de un medio muy efectivo para diversificar la dieta humana desde un punto de vista sensorial [8].

La fabricación y la maduración de queso representan una serie de eventos bioquímicos consecutivos que, si están bien sincronizados y equilibrados, conducen a la generación de productos inocuos, con aromas y sabores altamente deseables. Condiciones de manufactura inapropiadas, sin embargo, pueden resultar en productos dañinos a la salud, y/o con sabores y olores desagradables [9]. La calidad y composición del queso está también fuertemente influenciada por las características de la leche empleada en su manufactura, especialmente su calidad microbiológica, su contenido de grasa, proteína, calcio y pH [10].

Las diversas técnicas para la fabricación del queso se han venido desarrollando desde hace siglos como un medio para conservar la leche cruda a través de su fermentación [11]. La selección natural de la flora necesaria para la fermentación de la leche, o la adición directa de estos organismos como cultivos iniciadores, ayuda a conservar los productos y permite la competencia de la flora benéfica con contaminantes microbianos, incluidos los patógenos humanos. Otros factores que contribuyen a asegurar la inocuidad del queso son el uso de tratamientos térmicos como la cocción de la cuajada, la adición de sal, y el control de las condiciones de temperatura y humedad ambiental durante la maduración [12].

En la actualidad, la manufactura de queso es una actividad que se beneficia del conocimiento desarrollado por una amplia gama de disciplinas científicas. Entre ellas destacan la microbiología, química, bioquímica, enzimología, y biología molecular, entre otras [1]. El objetivo del presente artículo es documentar la efectividad del proceso de elaboración de queso, como método de conservación de la leche. Se presenta un compendio de información científica a partir de la cual se puede determinar la participación de cada una de las diferentes operaciones unitarias empleadas en la manufactura de quesos como elementos clave en asegurar la inocuidad microbiológica de los productos elaborados. Aunque son diversos los microrganismos patógenos que pueden estar presentes en la leche [2], este artículo se enfoca en evaluar la sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* durante el proceso de manufactura del queso. Estos microorganismos son considerados como representativos del resto de microorganismos patógenos ya que *Escherichia coli* es un importante indicador de contaminación fecal que advierte la presencia de otros patógenos [13], mientras que *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos no formadores de esporas más resistentes a principios bactericidas, pudiendo sobrevivir durante largos periodos de tiempo en ambientes hostiles.

II. Queso

2.1 Proceso de elaboración de queso

La fabricación de queso puede definirse como el conjunto de operaciones realizadas a la leche durante un periodo de alrededor de 24 horas para convertirla en una sustancia sólida o semisólida [14]. Es importante considerar, sin embargo, que la deshidratación controlada o maduración, en algunas ocasiones puede requerir periodos más prolongados. Aunque el protocolo de fabricación para variedades individuales difiere en detalle, los pasos básicos más comunes a la mayoría de las variedades son: acidificación, coagulación, deshidratación (corte del coágulo, cocción, agitación, prensado, salado y otras operaciones que promueven la sinéresis en

gel), conformación (moldeado y prensado) y salado (cuando no se ha realizado previamente) [15]. La fabricación de queso es esencialmente un proceso de deshidratación en el que la grasa y la caseína en la leche se concentran entre 6 y 12 veces, dependiendo de la variedad de queso de la que se trate [16]. Los niveles de humedad, contenido de sal, pH y la microflora del queso regulan y controlan los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración y determinan, la inocuidad microbiológica, el sabor, el aroma y la textura del producto final [17].

El queso proviene en primera instancia de la fermentación microbiana de la leche, en donde el descenso en el pH causado por los microorganismos modifica las características organolépticas del producto y le confiere estabilidad durante su almacenamiento [18]. Aunque típicamente esta fermentación es realizada por bacterias ácido lácticas (BAL) seleccionadas, en algunos casos los microorganismos empleados para este fin implican complejos ecosistemas microbianos, compuestos por bacterias, levaduras y hongos [19]. Adicionalmente, posteriores adecuaciones del proceso de manufactura de quesos han introducido el uso de enzimas coagulantes y otros adjuntos, que permiten obtener características particulares en cada variedad de queso [20]. Los métodos de fabricación y maduración, el tipo de leche empleada, y la composición química bruta de los quesos resultantes definen la flora microbiana remanente en los quesos, incluyendo a los microorganismos intencionalmente añadidos (BAL), así como a microorganismos contaminantes indeseables (patógenos o de deterioro) [21].

Los factores que controlan el crecimiento de microorganismos indeseables en el queso incluyen además del pH, a la actividad de agua (modificada a través de la deshidratación y la adición de sal) [22], la temperatura de proceso y de almacenamiento, la inhibición competitiva causada por la presencia de BAL viables, y a la presencia de sustancias inhibidoras, intencionalmente añadidas, como los nitratos, o sintetizadas *in situ* por las mismas BAL, como las bacteriocinas. Desde un punto de vista de conservación de alimentos, todos estos factores son conocidos como “obstáculos”. El efecto de cada uno de los obstáculos sobre la viabilidad de microorganismos indeseables puede no ser significativo por sí solo. Sin embargo, una vez que todos los obstáculos se presentan de manera simultánea, se obtiene un efecto sinérgico que produce un control considerable, lo cual es conocido en su conjunto como “tecnología de obstáculos” [23].

III. Estudios de supervivencia de microrganismos indeseables en la elaboración de queso

Existen infinidad de microrganismos indeseables que pueden contaminar la leche y proliferar rápidamente en ella debido a la alta disponibilidad de nutrientes y a las temperaturas empleadas en la elaboración de productos lácteos [24]. Entre estos microorganismos indeseables se distinguen dos grandes grupos: los microorganismos de deterioro, que son capaces de modificar negativamente las características organolépticas del queso durante su almacenamiento, limitando su vida de anaquel, y los microorganismos patógenos, causantes de enfermedades en el ser humano, que convierten a los productos contaminados en vectores de enfermedad [25, 26].

Como ya se mencionó previamente, algunos obstáculos microbianos (actividad de agua, concentración de sal, pH y ácido láctico) presentes en el queso tienen el potencial para inhibir el desarrollo de los microorganismos indeseables [27], por lo que diversos grupos de investigación alrededor del mundo han dedicado sus esfuerzos a estudiar y

cuantificar la capacidad de los diversos parámetros de proceso y operaciones unitarias empleadas en la manufactura de quesos para inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables, asegurando una larga vida de anaquel y sobre todo la inocuidad microbiológica del producto terminado. En particular el uso de cultivos iniciadores, adición de antimicrobianos, temperatura de proceso, así como la temperatura y tiempo de almacenamiento han sido señalados como los factores más relevantes en el aseguramiento de la calidad microbiológica de quesos [28-30].

3.1 Cultivo iniciador

Los cultivos iniciadores empleados en la manufactura de quesos se seleccionan generalmente con base en su capacidad para producir ácido láctico a una velocidad apropiada, en su capacidad para resistir el ataque de bacteriófagos, y en su capacidad para producir aromas, sabores y texturas deseables [31]. Los microorganismos que se emplean para este fin con más frecuencia en la industria láctea son las bacterias ácido lácticas. Algunos de estos microorganismos, además de las propiedades previamente descritas, tienen la capacidad de generar productos finales de la fermentación como el ácido acético, el peróxido de hidrogeno, el diacetilo, y algunas bacteriocinas, sustancias capaces de ejercer un efecto inhibitorio sobre los microorganismos indeseables en la leche [4]. La acidez desarrollada por las bacterias lácticas (independientemente del efecto conservador de los ácidos orgánicos) contribuye a la conservación de los productos lácteos, ya que el pH encontrados en los productos fermentados (que pueden llegar a valores de pH de 4 - 5) la flora banal y los microorganismos patógenos pueden ser inhibidos en cierta medida, extendiendo la vida de anaquel, y contribuyendo a la inocuidad microbiológica del producto [32].

Considerando este interesante potencial que tiene la presencia de cultivos lácticos viables en la preservación de productos lácteos se han conducido diversas investigaciones referentes al tema. De entre éstas, resulta relevante resaltar la comparación que se realizó entre el uso de cultivos lácticos termófilos (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*) y mesófilos (*Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. Cremoris*) para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157: H7 en queso feta y en queso telemes, en donde se encontró que a pesar de que se observa un incremento en la población de *E. coli* durante la fabricación de ambos tipos de queso, su presencia disminuye durante la maduración a 4 °C. En este respecto, los cultivos lácticos termófilos fueron capaces de reducir la población de *E. coli* a niveles de no-detectable después de 44 y 40 días en queso feta y telemes, respectivamente. Por otro lado, niveles de no-detectable fueron encontrados con el uso de cultivos lácticos mesófilos después de 36 y 30 días, en queso feta y telemes, respectivamente [33].

Govaris et al. (2002) nos muestran que la supervivencia de *E. coli* O157: H7 es mayor en quesos fermentados con iniciadores termófilos que con cultivos mesófilos, aunque en ambos casos queda también demostrado que un periodo de maduración de alrededor de un mes, o mes y medio a 4 °C son suficientes para erradicar la presencia de este patógeno en quesos feta y telemes [33].

Una palabra de precaución es requerida tras considerar estos razonablemente exitosos resultados ya que también existen estudios en donde el uso de cultivos lácticos, incluso de aquellos conteniendo bacterias productoras de bacteriocinas, rinde resultados menos favorables. Como ejemplo, un estudio realizado en queso feta y camembert en donde se estudió la capacidad de cultivos lácticos

mesófilos en combinación con *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 11454, una cepa productora de nisina, para inhibir el desarrollo de *E. coli* O157: H7. En este caso, la población de *E. coli* O157: H7 en queso feta se incrementó en 4 ciclos logarítmicos durante los primeros diez días de almacenamiento a 2 °C, alcanzando niveles de alrededor de 8 ciclos logarítmicos (UFC/g), lo cual indudablemente implica un grave riesgo a la salud de los consumidores. Un posterior descenso en los números de *E. coli* O157: H7 observado a partir del día 20 de almacenamiento fue insuficiente para reducir la población a niveles aceptables, terminando tras 75 días de almacenamiento en niveles 1.5 ciclos logarítmicos superiores a los presentes al principio del proceso. En el caso del queso camembert los resultados fueron similares, observándose un pico (3 ciclos logarítmicos) en el incremento de la población de *E. coli* O157: H7 a las 24 horas, seguido por un descenso que terminó en niveles 1.5 ciclos logarítmicos superiores a los iniciales tras 65 días de almacenamiento a 2 °C [34].

Las discrepancias entre los resultados de este estudio y el descrito previamente son evidentes y alarmantes, ilustrando que el uso de cultivos lácticos como única herramienta para asegurar la inocuidad de los quesos es insuficiente, ya que su efectividad puede variar ampliamente dependiendo del tipo de cultivos lácticos empleados, así como de otras condiciones ambientales relevantes, como el pH del producto y la temperatura de almacenamiento.

Para demostrar la gran variabilidad de resultados que se pueden obtener con diferentes tipos de cultivos lácticos podemos citar un estudio en donde se evaluó la efectividad de varios *lactobacilos* y *lactococcos* de manera individual y en combinación, para inhibir el desarrollo de *E. coli* enteropatogénica en queso camembert. En este estudio el uso de cepas individuales de cultivos lácticos probó ser insuficiente para controlar el desarrollo de *E. coli* mostrando un incremento de alrededor de 4 ciclos logarítmicos en su población a las 24 horas (de manera similar al estudio previamente descrito), seguido de un descenso después de 63 días de almacenamiento que terminó en todos los casos con poblaciones de *E. coli* superiores a los niveles de contaminación iniciales. Las diferencias de inhibición encontradas entre cepas individuales permiten categorizarlas en función de su capacidad inhibitoria en orden de mayor a menor: *S. cremoris> L. helveticus> S. lactis> L. casei> L. bulgaricus*. Sin embargo, cuando se emplearon combinaciones de cultivos lácticos se consiguieron mejores resultados, obteniendo niveles de contaminación de *E. coli* al final del almacenamiento menores que los presentes al inicio del proceso de manufactura. Los cultivos iniciadores combinados reprimieron *E. coli* en el siguiente orden, de mayor a menor: *S. cremoris + L. helveticus> S. cremoris + L. bulgaricus> S. cremoris, + L. helveticus + S. diacetylactis> S. cremoris + S. diacetylactis*. En particular la combinación *S. cremoris + L. helveticus* se distinguió por causar un decremento en la población de *E. coli* por debajo de los niveles iniciales a los 7 días de almacenamiento, seguido por un descenso sostenido en la población a través de todo el tiempo de almacenamiento. Como conclusión de este estudio se puede derivar que la combinación de cultivos iniciadores es más efectiva en el control de microrganismos patógenos en comparación con el uso de cultivos individuales y que la selección adecuada de las combinaciones de cultivos lácticos es crítica [35].

Como último asunto pendiente queda determinar si la concentración inicial de patógenos contaminando la leche juega algún papel en la eficiencia del uso de cultivos

lácticos como inhibidores del desarrollo de patógenos. En este sentido se puede mencionar un estudio conducido en queso feta en donde se evaluó la capacidad de un cultivo láctico (*Streptococcus cremoris*) para inhibir el desarrollo del patógeno *S. aureus* en función de la concentración inicial de contaminación del patógeno (1, 5 y 10%). En este caso el estudio demuestra un incremento en la concentración del patógeno a las 7 horas de iniciado el proceso de manufactura, seguido de un descenso a través de 75 días de maduración (similar a los estudios previamente descritos). Los quesos con cultivos lácticos fueron capaces de reducir la concentración final del patógeno de mejor manera que los quesos sin iniciador, resultando en quesos con dos ciclos logarítmicos menos patógenos al final del periodo de maduración. De manera interesante, este estudio demuestra que la concentración inicial del patógeno no tiene ningún efecto sobre la capacidad del cultivo láctico para producir la inhibición, siendo exitoso en cualquier circunstancia. Ciertamente, cabe hacer la aclaración de que la concentración final, en cualquier caso resulta ser un porcentaje de la concentración inicial, motivo por el cual resulta de suma importancia reducir lo más posible la concentración inicial de patógenos a través del uso de buenas prácticas de producción de la leche, y buenas prácticas de manufactura del queso [36].

3.2 Adición de antimicrobianos

El término antimicrobiano hace referencia a aquellas sustancias con capacidad para reducir o inhibir el crecimiento de microorganismos en los alimentos [37]. El uso de estas sustancias tiene por objetivo el aumentar la seguridad de los alimentos y su vida útil. El tipo de sustancias antimicrobianas que pueden ser empleadas en quesos, así como su concentración se encuentran regulados por ley, de tal manera que no pueden ser usados de manera indiscriminada [38]. Es por este motivo que resulta de gran interés el evaluar principios naturales, que puedan cumplir con esta función sin ser considerados como sustancias sintéticas sujetas a regulación de uso [39].

Un ejemplo del uso de antimicrobianos "naturales" lo podemos encontrar en el uso de aceites esenciales provenientes de diversos vegetales. Un estudio conducido en queso blanco iraní adicionado con 2500 - 3500 μg / ml de aceite esencial de estragón (*Artemisia dracunculus*) determinó su capacidad para inhibir el desarrollo de *Staphylococcus aureus y Escherichia coli.* Este estudio demostró la capacidad del aceite esencial para reducir la población de *E. coli* y *S. aureus* en dos ciclos logarítmicos después de 72 h, en comparación con el queso control sin adición del aceite esencial. En todos los casos, el uso de aceite esencial demostró causar un efecto dosis-dependiente, en donde se observa mayor inhibición conforme se incrementa la cantidad del aceite adicionado [40].

Otro ejemplo del uso de antimicrobianos "naturales" se puede encontrar en la adición de metabolitos antimicrobianos sintetizados por bacterias ácido-lácticas, como es el caso de la reuterina, poderoso antimicrobiano sintetizado por *Lactobacillus reuteri*. Un estudio realizado en queso cottage contaminado con *E. coli* O157: H7 demostró que la adición de reuterina en concentraciones de 50, 100, y 150 unidades/g resulta en la reducción de la población de *E. coli* O157: H7 en 2, 3, y 6 ciclos logarítmicos después de un almacenamiento por 7 días a 7 °C. Como puede observarse, la capacidad bactericida de la reuterina es ampliamente superior a la del aceite esencial mencionado en el estudio previo, mostrando de manera semejante una capacidad bactericida dosis-dependiente [41].

Finalmente, haciendo referencia al uso de conservadores químicos convencionales

como punto de comparación, se puede mencionar el estudio conducido en queso blando hispánico, en donde se añadió sorbato de potasio (0.3%), o benzoato de sodio (0.3%), en quesos contaminados con *E. coli* O157: H7. Este estudio demostró la capacidad del sorbato y el benzoato para inhibir el desarrollo del patógeno. El queso adicionado con benzoato de sodio o con sorbato de potasio mostró ausencia de crecimiento de *E. coli* O157: H7 durante cuatro meses de almacenamiento a 12 °C, extendiendo así de manera efectiva la vida de anaquel de este producto típicamente considerado como de corta vida de anaquel debido a su alta humedad, alto pH y ausencia de cultivos lácticos [41].

3.3 Temperatura

La temperatura es uno de los principales factores que afectan el crecimiento y supervivencia de los microrganismos viables en leche y productos lácteos [42]. De manera general se pueden identificar tres rangos de temperatura para cada tipo de microorganismo, en donde se observa a) una temperatura de crecimiento óptimo b) una temperatura baja, debajo de la cual ya no se observa crecimiento, aunque la viabilidad de los microorganismos ya presentes no se pierde entrando en vida latente, y c) una temperatura alta, a partir de la cual los microorganismos presentes pierden viabilidad y mueren [43].

Con esta base, las diferentes temperaturas empleadas en cada una de las etapas del proceso de manufactura de quesos ejercen cierta influencia en el desarrollo o inhibición de las poblaciones microbianas, primero en la leche, luego en la cuajada, y finalmente en el queso.

Aunque en teoría, cualquier proceso de manufactura de queso debe iniciarse con la pasteurización de la leche, proceso térmico aplicado con la intención exclusiva de inactivar microorganismos indeseables en la leche [44], en muchos casos, sobre todo en el caso de los quesos artesanales o con "Denominación de Origen Protegida" los quesos son elaborados a partir de leche "cruda", motivo por el cual resulta de especial relevancia el identificar la capacidad de otras operaciones unitarias empleadas en la manufactura de quesos para inhibir o reducir el desarrollo de microorganismos indeseables [45].

3.3.1 Cocción de la cuajada

Una vez que la leche es coagulada, como paso inicial en el proceso de manufactura de quesos, la cuajada resultante es cortada y sometida a un proceso de cocimiento, con el propósito principal de reducir la humedad y promover el desarrollo de acidez y textura. Este proceso de cocimiento se aplica a la cuajada suspendida en suero en tanques agitados con calentamiento indirecto, en los cuales se incrementa la temperatura de manera paulatina. La duración e intensidad del tratamiento térmico aplicado determina las características fisicoquímicas de la cuajada cocida y de igual manera determina el potencial efecto bactericida que esta etapa del proceso de manufactura pueda causar sobre los microorganismos presentes. Con relación a esto, Peng y colaboradores realizaron un estudio en donde evaluaron el efecto de cocer la cuajada a 40 o 46 °C sobre la viabilidad de *E. coli* productor de toxinas Shiga, en un proceso de elaboración de queso semiduro. En este estudio no se encontró diferencia significativa entre las dos temperaturas de cocimiento empleadas, encontrando *E. coli* viable en todos los quesos, aun después de 16 semanas de almacenamiento refrigerado a 13 °C [46]. De manera semejante, en otro trabajo publicado se evaluó el efecto de emplear cuatro diferentes temperaturas de cocimiento (30, 36, 38 y 40 °C) sobre el desarrollo y

supervivencia de *Staphylococcus aureus* en queso manchego. En este estudio *S. aureus* alcanzó su número máximo en queso después de 24 h de manufactura, con un recuento de alrededor de 800,000 ufc/g. De igual manera que en el estudio anterior, en este estudio se demuestra que este intervalo de temperaturas de cocimiento es insuficiente para causar un efecto bactericida relevante. Inclusive, resulta relevante mencionar que los quesos elaborados con cuajada cocida a 40 °C resultaron con una población de *S. aureus* al final del proceso de manufactura superior a la observada en quesos cocidos a temperaturas más bajas, con lo que se demuestra que temperaturas de cocimiento moderadas pueden resultar en un efecto de incubación, más que de inhibición del desarrollo de microorganismos indeseables [47].

Finalmente, en otro estudio en donde se emplearon temperaturas extremas de 20 y 45 °C durante el cocimiento de la cuajada y se observó su efecto sobre el crecimiento y supervivencia de *E. coli* O157: H7 durante el proceso de elaboración de queso blanco. En este caso, sí se observó una disminución en la población de *E. coli* O157: H7 durante un periodo extendido de 50 horas al emplear temperaturas de 45 °C, lo cual no se observó en el caso de las cuajadas cocidas a 20 °C. De cualquier manera en ambos casos el patógeno sobrevivió el proceso de manufactura y mantuvo su viabilidad en los quesos durante el almacenamiento refrigerado por 4 semanas [48].

Como conclusión se puede plantear que las temperaturas de cocimiento de la cuajada en general no son suficientes para causar una reducción significativa en la población de microorganismos indeseables en la cuajada, sino que al contrario típicamente resultan en un incremento en la población. Este efecto resulta razonable, ya que en general las temperaturas de cocimiento se limitan para evitar inactivar los cultivos lácticos adicionados, ya que se busca que estos mantengan su viabilidad y continúen acidificando la cuajada en etapas posteriores. El uso de cultivos lácticos termófilos, capaces de soportar temperaturas superiores a los 55 °C, podría representar una opción viable para emplear temperaturas de cocimiento superiores que potencialmente pudieran inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables.

3.3.2 Estiramiento de la cuajada.

Otra etapa en el proceso de manufactura de queso en donde el uso de temperaturas elevadas puede potencialmente reducir la población de microorganismos indeseables es la etapa de malaxado o “estiramiento” de la cuajada. En esta etapa, la cuajada cocida es sometida a un tratamiento térmico por inmersión en agua o por contacto con una superficie caliente y masajeada con la intención de inducir la reorientación de las hebras de caseína para producir una masa elástica, característica de los quesos de “pasta hilada” como el mozarela, asadero y Oaxaca. Con respecto a la eficacia de esta operación unitaria para inhibir el desarrollo de microorganismos, se puede citar el estudio realizado por Spano y colaboradores quienes evaluaron el uso de dos temperaturas de estiramiento típicamente empleadas en la manufactura de queso mozarela (70 y 80 °C) sobre la viabilidad de *Escherichia coli* O157:H7. La aplicación de 80 °C por 5 minutos eliminó por completo la población de *E. coli* inoculada en los quesos (100,000 ufc/g). Confirmación de la total inactivación del patógeno se obtuvo empleando un proceso de enriquecimiento tras 7 días de almacenamiento a 4 °C. Estirar la cuajada a 70 °C por otra parte, no produjo un efecto tan marcado, reduciendo la población del patógeno solamente entre uno y dos ciclos logarítmicos. Este estudio demuestra la importancia de emplear temperaturas altas durante el proceso de estiramiento para

inhibir en mayor medida el desarrollo de microorganismos indeseables [49]. La temperatura de pasteurización alta (72 °C) puede ser empleada como un criterio que permita definir el poder de inhibición de diversos tratamientos térmicos, siempre teniendo en cuenta que los procesos de transferencia de calor en quesos (conducción) se llevan a cabo de manera más lenta que los observados en leche líquida (convección).

3.3.3 Temperatura de almacenamiento

Una vez formados y prensados los quesos, estos son sometidos a un proceso de maduración. Este proceso de maduración se lleva a cabo en condiciones de humedad y temperatura controlada, lo cual permite manipular la velocidad a la que suceden procesos bioquímicos y microbiológicos responsables de la calidad organoléptica final del queso. Durante esta etapa se presenta potencialmente otra oportunidad dentro del proceso de manufactura de los quesos para inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables. Con respecto al efecto que ejerce la temperatura de almacenamiento sobre la supervivencia de microorganismos indeseables se puede citar un estudio en donde se evaluó el efecto de 3 temperaturas de almacenamiento (4, 8 y 28 °C) sobre la viabilidad de *Escherichia coli* O157:H7 en queso Panner almacenado por 48 horas. Bajo estas condiciones de almacenamiento, *E. coli* fue capaz de proliferar con notables aumentos en la tasa de crecimiento conforme la temperatura de almacenamiento se fue elevando. Inclusive a temperaturas de refrigeración *E. coli* fue capaz de incrementar notablemente su población al final del periodo estudiado, demostrando la incompetencia de las condiciones de almacenamiento empleadas para reducir riesgos microbiológicos en queso Panner, especialmente en periodos tan breves de tiempo [50].

Estudios semejantes, conducidos por periodos más largos de tiempo, han permitido apreciar de mejor manera el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad de microorganismos patógenos.

Como ejemplo se puede mencionar un estudio realizado en quesos Monterey y Cheddar inoculados con 6.6 log ufc/g de *E. coli* O157:H7 empacados al vacío y almacenados a 4.4, 10, o 21.1 °C por 365 días. En este caso, el almacenamiento prolongado sí fue capaz de reducir la población de *E. coli* produciendo descensos de más de 6 ciclos logarítmicos en su población a los 120 días de almacenamiento a temperatura de 21.1 °C. Los quesos tipo Cheddar presentaron menos desarrollo de *E. coli* en comparación con los quesos Monterey, que requirieron de más tiempo de almacenamiento para lograr reducciones comparables. Después de 60 días de almacenamiento a 4.4 °C, se observaron reducciones de 0.8 y 1.0 log ufc/g en queso tipo Monterrey y Cheddar respectivamente. Cuando la temperatura de almacenamiento se aumentó a 10 °C las reducciones fueron de 0.5 y 2 log ufc/g, respectivamente. Finalmente, el aumento adicional de la temperatura de almacenamiento a 21.1 °C causó una reducción de 1.5 y 5.2 log ufc/g de *E. coli* a los 60 días de almacenamiento en queso estilo Monterey, y Cheddar respectivamente [51].

De manera semejante, la temperatura de maduración ha mostrado efectos altamente significativos sobre la sobrevivencia de *S. aureus* en queso. Un estudio realizado en queso Manchego contaminado con *S. aureus* en concentraciones iniciales de alrededor de 6 log ufc/g, elaborado con leche cruda de oveja y almacenado a 5, 10, 15 o 20 °C por 60 días demostró la capacidad de temperaturas de 20 °C de causar un descenso en la población de *S. aureus* de alrededor de 6 ciclos logarítmicos después de 60 días de almacenamiento. Por otro lado, las

temperaturas de almacenamiento de 10 °C y 15 °C causaron una reducción de 4 ciclos logarítmicos en el mismo tiempo, mientras que la temperatura de almacenamiento de 5 °C resulto en una reducción de solo 3 ciclos.

En este estudio se concluye que durante el almacenamiento prolongado de quesos, las bajas temperaturas de maduración generalmente permiten una mayor supervivencia de las bacterias patógenas en comparación con temperaturas más cercanas a la ambiente [47].

Finalmente, resulta interesante mencionar que el queso cheddar elaborado a partir de leche sin pasteurizar requiere por ley ser sometido a un periodo de maduración mínimo de 60 días, con el propósito de brindar seguridad al consumidor (Estándar de la Administración de Alimentos y Drogas de EE. UU). Para evaluar la efectividad de esta medida, se realizó un estudio en queso cheddar elaborado a partir de leche sin pasteurizar que fue inoculada experimentalmente con un coctel de 5 cepas de *E. coli* y monitoreada para determinar su viabilidad por 360 días de almacenamiento a 7 °C. Durante el almacenamiento se observó una disminución en la población de *E. coli*. Sin embargo, su presencia fue detectada aún después de 240 días de almacenamiento (7 °C), confirmando que el uso de más altas temperaturas de almacenamiento es requerido para asegurar que un periodo extendido de maduración inhiba la presencia de patógenos [52].

3.4 Tiempo de almacenamiento

Como ya se ha vuelto evidente desde la sección anterior, el efecto de la temperatura de almacenamiento no puede ser considerado sin tomar en cuenta la duración del almacenamiento. Típicamente, el almacenamiento del queso bajo condiciones controladas puede durar desde solo un par de días hasta meses o años, dependiendo de la variedad de queso de que se trate.

Se han realizado diversas investigaciones enfocadas a evaluar la supervivencia de microrganismos indeseables durante la etapa de almacenamiento en función del tiempo empleado. Uno de ellos se llevó a cabo en queso Cheddar elaborado con leche pasteurizada contaminada con *E. coli*. En este estudio *E. coli* mostró una fuerte disminución en su población durante el período de almacenamiento a 7 °C, alcanzando una reducción de la población a menos de 1 ufc/g al día 60, aunque niveles indetectables se alcanzaron solo después de 158 días de almacenamiento [53]. Por otra parte, otro estudio que describe el comportamiento de *E. coli* durante el almacenamiento de queso Cheddar y Gouda elaborado a partir de leche sin pasteurizar estableció una concentración aproximada de 145 ufc/g en el primer día de almacenamiento. A partir de este punto, los recuentos bacterianos disminuyeron significativamente alcanzando niveles medios de 25 y 5 ufc/g en Cheddar y Gouda, respectivamente a los 60 días de almacenamiento. Sin embargo, a pesar de que *E. coli* mostró un descenso continuado en su población, vale la pena mencionar que en este estudio, el uso del método de enriquecimiento selectivo, permitió detectar presencia de *E. coli* durante más de 270 días en ambos tipos de queso [54]. Resultados semejantes se han encontrado también en queso de cabra, en donde la concentración de *E. coli* disminuye de manera continua durante la etapa de maduración por 42 días a 4 °C, alcanzando niveles 2 log ufc/ml menores que los encontrados al principio del almacenamiento, reducción suficiente para suponer su ausencia total. Sin embargo, en este estudio se pudo conseguir también la detección de *E. coli* después del enriquecimiento, incluso posteriormente a los 42 días de maduración, lo cual indica la sobrevivencia de un número limitado de células bacterianas lesionadas o

con capacidad limitada para reproducirse en condiciones normales [55].

Estudios realizados en queso Camembert inoculado con *Escherichia coli* productora de toxina Shiga han demostrado la disminución de la población durante las primeras etapas de maduración alcanzando concentraciones de 10^2 ufc/g después de un periodo de almacenamiento de 20 días a 4 °C [56].

Con respecto a *Staphylococcus aureus*, también se ha estudiado su supervivencia durante el almacenamiento en queso Domiati egipcio, utilizando leche sin pasteurizar con una concentración inicial de 10^4 ufc/g de *S. aureus*, y evaluando el efecto del almacenamiento a 30 °C. Aunque en este estudio la población de *S. aureus* aumentó rápidamente durante la fabricación del queso, se observó una disminución durante el almacenamiento hasta encontrar menos de 10 ufc/g después de 4 semanas [36]. Estudios semejantes en queso Manchego almacenado por 60 días encontraron recuentos de *S. aureus* que disminuyeron notablemente después de 35 días de almacenamiento a 15 °C, alcanzando niveles debajo del límite de detección al final del periodo de maduración [57].

Finalmente, resulta relevante mencionar experiencias obtenidas de estudios en quesos duros y semiduros con respecto a la sobrevivencia y proliferación de *E. coli* durante la maduración y almacenamiento. Los resultados muestran que los quesos duros son higiénicamente seguros una semana después de la fabricación. En general, la tecnología de fabricación de quesos duros suizos no permite el crecimiento de bacterias patógenas y conduce a una tasa de mortalidad muy rápida.

Ninguna de las bacterias patógenas inoculadas, excepto por un bajo número de *S. aureus*, se pudo encontrar en los quesos duros experimentales un día después de la fabricación. En los quesos semiduros experimentales, *E. coli* y *S. aureus* sobrevivieron más tiempo que en los quesos duros, pero después de 90 días, cuando se completó el periodo de maduración a 5 °C, las bacterias cayeron por debajo del límite de detección [58].

IV. Conclusiones

El proceso de manufactura de quesos comprende una serie de operaciones unitarias que poseen el potencial de actuar como métodos de conservación, contribuyendo a asegurar la inocuidad de los quesos. Cada variedad de queso en particular requiere de condiciones específicas de proceso que permitan alcanzar las características organolépticas deseadas, con lo que la efectividad del proceso para inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables es variable. En la medida en que las condiciones de proceso impliquen el uso de temperaturas superiores a las de pasteurización, tiendan a reducir la actividad de agua y el pH, así como a promover el desarrollo de bacterias benéficas, se podrá esperar un impacto positivo en la inocuidad del producto.

La adición de bacterias ácido-lácticas en general, o en particular de aquellas capaces de sintetizar metabolitos antimicrobianos, en la leche al inicio de los procesos de manufactura de quesos ha demostrado ser una efectiva estrategia para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos. De igual manera, el uso de sustancias naturales con capacidad antimicrobiana, como los aceites esenciales vegetales, o algunos metabolitos microbianos representa una extraordinaria oportunidad para inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables desde el principio del proceso de manufactura, ya que se ha observado que es en las primeras etapas de producción de quesos en donde se

presentan los mayores incrementos en las poblaciones de microorganismos patógenos.

Ya durante el proceso de manufactura, la temperatura empleada durante el cuajado, cocción, desuerado, molido, y moldeado representa una oportunidad para inhibir bacterias indeseables si se emplean temperaturas altas, o de incubar las bacterias presentes si se emplean temperaturas cercanas a la temperatura ambiente. Altas concentraciones iniciales de bacterias indeseables conducen a concentraciones altas al final de estas etapas de proceso, mientras que altas concentraciones de BAL al inicio del proceso conduce a reducción en la población de bacterias indeseables debido al consecuente descenso del pH y a la inhibición competitiva.

Etapas de proceso adicionales empleadas en algunas variedades de queso como la cheddarización o el estiramiento de la pasta reducen adicionalmente las poblaciones de bacterias indeseables de manera exitosa. Especialmente la etapa de estirado empleada en la manufactura de quesos de pasta hilada ha probado ser capaz de reducir las poblaciones de microorganismos indeseables por debajo de los límites de detección cuando se emplean apropiadas prácticas de producción.

Finalmente, el almacenamiento extendido o maduración de los quesos ha demostrado capacidad de reducir las poblaciones de microorganismos indeseables, especialmente al emplear temperaturas cercanas a la temperatura ambiente por periodos de varios meses, y en combinación con pH y actividad de agua reducidos.

V. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada para cursar el doctorado en ciencias dentro del programa del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo unidad Cuauhtémoc.

VI. Referencias

1. Badui D.S., 2016, *Química de los alimentos*, México, Pearson Educación.

2. Aguilera-Becerra, A.M., Urbano-Cáceres E.X, and C.P. Jaimes-Bernal, 2014, “Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria”, *Ciencia y Agricultura*, vol. 11, núm. 2, julio-diciembre, pp. 83-93.

3. Parra Huertas, R.A., 2010, “Bactérias ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos”, *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, vol. 8, n.1, pp. 93-105, Nacional Agraría Medellín 62, 4967–4982.

4. Ramirez Ramirez, J.C., et al., 2011, “Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud”, *Revista fuente*, Año 2, no. 7, abril-junio, ISSN 2007-0713.

5. Law, B.A. and A.Y. Tamime, 2011, *Technology of cheesemaking*, Victoria Australia, John Wiley & Sons.

6. De Cangas Morán, R., et al., Desarrollo de un queso fresco con cultivos probióticos e ingredientes vegetales, *Tecnología Química*, vol. 39, no.1, ene-abr 2019, pp. 49-64.

7. Marchant, I.M.S. and A.I. sede Arica, *Manual conservacion de alimentos.* Obtenido http://www.inacap.cl/web/materialpoyocedem/profesor/Gastronomia/Man

uales/Manual_Conservacion_de_Alimentos. pdf, 2019.

8. Majem, L.S., 2004, *Leche, lácteos y salud*, Buenos Aires-Bogota-Caracas Madrid-Mexico-Sao Paulo, Ed. Médica Panamericana.

9. Fox, P.F., McSweeney, P. L.H., Cogan, T. M. and Guinee T. P., 2004, *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition ed. Volume 2, Major Cheese Groups.

10. Fox, P.F., et al., 2017, *Fundamentals of cheese science*, Boston MA, Springer.

11. Donnelly, C., 2004, *Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese*, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology,. vol 1, pp. 541-559.

12. Bernal S.B., Gallegos C.D., Ibarra I.E, *Introducción a la tecnologia de alimentos*, 2da ed. 2004, Mexico-España-Venezuela-Colombia, Limusa.

13. Donnenberg, M., 2013, *Escherichia coli: pathotypes and principles of pathogenesis*, Baltimore Maryland USA, Academic Press.

14. Fox, P.F., et al., 2004, *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3er edn, Vol 1, General Aspects, London, Elsevier Academic Press.

15. Scott, R., et al., *Fabricación de queso/Cheesemaking practice*, 2010, Springer.

16. O'Connor, C., 1993, *Traditional cheesemaking manual*, Addis Ababa Ethiopia, ILRI (aka ILCA and ILRAD).

17. Romero del Castillo, R.S., and J. Mestres Lagarriga, 2004, *Productos lácteos Tecnologia*, 225, Barcelona, Ediciones UPC.

18. Walstra, P., Wouters, T.M, Geurts, T.M, 2006, *Dairy Science and Technology*, second ed, Boca Raton, FL CRC/Taylor & Francis.

19. Hayaloglu, A.A., 2016, *Cheese: Microbiology of Cheese*, Amsterdam, The Netherlands, Elsevier.

20. Díaz, M.d., "Proceso básico de la leche y el queso", *Revista Digital Universitaria*, vol 6, no. 9, 10 septiembre 2005.

21. Barreras, F.L., 2007, *Preelaboración y conservación de alimentos*. Buenos Aires, Libros en Red.

22. Hayaloglu, A., 2016, *Cheese: Microbiology of Cheese*, Malatya Turkey, Inonu University.

23. Barreiro, J.A. and A.J. Sandoval, 2006, *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas*, Caracas, Equinoccio.

24. Ríos, K.C., 2011, *Tecnología de alimentos*, Bogota Colombia, Ediciones de la U.

25. Dubey, K.K., T. Raj, and P. Kumar, "Pathogenic microorganisms in milk: their source, hazardous role and identification", *Advances in Dairy Microbial Products*, 2022. p. 145-161, DOI: 10.1016/B978-0-323-85793-2.00005-9.

26. Bastam, M.M., et al., "Pathogenic bacteria in cheese, raw and pasteurised milk", *Veterinary Medicine and Science*, 2021, 7(6), pp. 2445-2449, DOI: 10.1002/vms3.604.

27. D'Amico, D.J. and C.W. Donnelly, "Growth and survival of microbial pathogens in cheese", *Cheese*, 2017, pp. 573-594, DOI: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00022-3

28. Keba, A., et al., "Review of the prevalence of foodborne pathogens in milk and dairy products in Ethiopia", *International Dairy Journal*, 2020, vol. 109, pp. 104762, DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104762.

29. Farrokh, C., et al., "Review of Shiga-toxin-producing Escherichia coli (STEC) and their significance in dairy production", *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 162(2), pp. 190-212, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008.

30. Paswan, R. and Y.W. Park, "Survivability of Salmonella and Escherichia coli O157: H7 pathogens and food safety concerns on commercial powder milk products", *Dairy*, 2020, 1(3), pp. 189-201, DOI: 10.3390/dairy1030014.

31. Helen, C., et al., 2003, *Tecnología de alimentos*, primera edicion, Limusa.

32. Villegas de Gante, A., 2004, *Tecnologia Quesera*. Primera ed. 2004: Editorial trillas.

33. Govaris, A., Papageorgiou D.K., and K. Papatheodorou K., "Behavior of Escherichia coli O157: H7 during the manufacture and ripening of feta and telemes cheeses", *Journal of Food Protection*, Abril 2002, 65(4): p. 609-615, DOI: 10.4315/0362-028x-65.4.609

34. Ramsaran, H., et al., "Survivial of bioluminescent Listeria monocytogenes and Escherichia coli 0157: H7 in soft cheeses",*Journal of Dairy Science*, 1998, 81(7), pp. 1810-1817.

35. Rash, K. and F. Kosikowski, "Influence of lactic acid starter bacteria on enteropathogenic Escherichia coli in ultrafiltration prepared Camembert cheese", *Journal of Dairy Science*, Abril 1982, 65(4), pp. 537-543, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(82)82231-5.

36. Kornacki, J.L. and Marth E.H., "Fate of nonpathogenic and enteropathogenic Escherichia coli during the manufacture of Colby-like cheese", *Journal of Food Protection*, marzo 1982, 45(4), pp. 310-316, DOI: 10.4315/0362-028X-45.4.310.

37. De la Fuente-Salcido, et al., "Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana", *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 2015, 46(2), pp. 7-16.

38. Miranda, M.I.R., *Inocuidad en la elaboración de quesos con respecto a la nueva NOM-243-SSA1-2010.*

39. Santamarina G.G., et al., "La microbiota del queso y su importancia funcional",*Rev Esp Nutr Comunitaria*, 2020, 26(4), pp. 248-256.

40. Raeisi, M., et al., "Essential oil of tarragon (Artemisia dracunculus) antibacterial activity on Staphylococcus aureus and Escherichia coli in culture media and Iranian white cheese", *Iranian Journal of Microbiology*, 2012, 4(1), pp. 30.

41. Kasrazadeh, M. and C. Genigeorgis, "Potential growth and control of Escherichia coli O157: H7 in soft

hispanic type cheese", *International Journal of Food Microbiology*, mayo 1995, 25(3), pp. 289-300, DOI10.1016/0168-1605(94)00089-o.

42. Matos, A.R., et al., *Peligros biológicos e inocuidad de alimentos.* Revista Electrónica de Veterinaria, septiembre 2005, 6(9), p. 1-5.

43. Varela, G. and G. Grotiuz, *Fisiología y metabolismo bacteriano.* Uruguay, Editorial Cefa, agosto 2008: p. 43-58.

44. Molina, M.A.B., *Derivados lacteos*, 2016, Miraflores Lima Peru, Editorial Macro EIRL.

45. Batro, P., *Quesos artesanales. Historia, descripción y elaboración*, 2010, Buenos Aires, Albatros.

46. Peng, S., et al., "Fate of Shiga toxin-producing and generic Escherichia coli during production and ripening of semihard raw milk cheese", *Journal of Dairy Science*, febrero 2013, 96(2), pp. 815-823, DOI: 10.3168/jds.2012-5865.

47. Gaya, P., et al., "Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on Staphylococcus aureus behaviour in Manchego cheese", *International Journal of Food Microbiology*, mayo 1988, 6(3), pp. 249-257, DOI: 10.1016/0168-1605(88)90017-7.

48. Leuschner, R.G. and M.P. Boughtflower, "Laboratory-scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, and Salmonella enterica serovars Typhimurium, Enteritidis, and Dublin", *Journal of Food Protection*, marzo 2002, 65(3), pp. 508-514, DOI: 10.4315/0362-028x-65.3.508.

49. Spano, G., et al., "Fate of Escherichia coli O157: H7 during the manufacture of Mozzarella cheese", *Letters in Applied Microbiology*, Enero 2003, 36(2), pp. 73-76, DOI: 10.1046/j.1472-765x.2003.01252.x.

50. Wahi, S., et al., "Growth and survival of Escherichia coli O157: H7 during manufacture and storage of Indian cheese (paneer)", *Foodbourne Pathogens & Disease*, junio 2006, 3(2), pp. 184-189, DOI: 10.1089/fpd.2006.3.184.

51. Adhikari, A., et al., "Effect of storage time and temperature on the viability of E. coli O157: H7, Salmonella spp., Listeria innocua, Staphylococcus aureus, and Clostridium sporogenes vegetative cells and spores in vacuum-packed canned pasteurized milk cheese", *International journal of food microbiology*, diciembre 2018, 286, pp. 148-154, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.027.

52. Schlesser, J., et al., "Survival of a five-strain cocktail of Escherichia coli O157: H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurized milk", *Journal of Food Protection*, mayo 2006, 69(5), pp. 990-998, DOI: 10.4315/0362-028x-69.5.990.

53. Reitsma, C.J.H., D.R., "Survival of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 During the Manufacture and Curing of Cheddar Cheese", *Journal of Food Protection*, mayo 1996, 59(5), pp. 460-464, DOI: 10.4315/0362-028X-59.5.460.

54. D'amico, D.J., M.J. Druart, and C.W. Donnelly, "Behavior of Escherichia coli O157: H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk", *Journal of Food Protection*, diciembre 2010, 73(12), pp. 2217-2224, DOI: 10.4315/0362-028x-73.12.2217.

55. Vernozy-Rozand, C., et al., "Growth and survival of Escherichia coli O157: H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses", *International journal of food microbiology*, Agosto 2005, 105(1), pp. 83-88, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.005.

56. Montet, M., et al., "Growth and survival of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga-toxin-producing Escherichia coli strains during the manufacture and ripening of Camembert cheese", *International journal of microbiology*, noviembre 2009, DOI: 10.1155/2009/653481.

57. Gómez-Lucía, E., et al., "Growth of Staphylococcus aureus and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese", *Journal of dairy science*, enero 1992, 75(1), pp. 19-26, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(92)77733-9

58. Johler, S., K. Zurfluh, and R. Stephan, "Tracing and inhibiting growth of Staphylococcus aureus in barbecue cheese production after product recall", *Journal of dairy science*, mayo 2016, 99(5), pp. 3345-3350, DOI: 10.3168/jds.2015-10689.