

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EMPLEO DE UNA CEPA DE *Brevibacterium linens* EN LA FABRICACIÓN DE QUESO

Isolation, Identification and Use of a *Brevibacterium linens* Strain, to Prepare Cheese

Miguel Molero Pulgar¹, Zarack Chacón Rueda² y Guillermo López Corcuera²

¹Programa de Ingeniería de la Producción Agropecuaria, División Académica, Universidad Sur del Lago "Jesús María Semprum". Santa Bárbara del Zulia, estado Zulia.

²Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

RESUMEN

A partir de una muestra de queso artesanal tipo Gruyere, se aislaron 254 colonias de microorganismos, de estas colonias en una primera selección se escogieron 4 colonias que correspondían a microorganismos gram positivos y con morfología de coco-bacilos. Se realizaron pruebas bioquímicas y fisiológicas, lográndose determinar que una de ellas, identificada como Ap, correspondió a una cepa de *Brevibacterium linens*. Con esta cepa como fermento secundario se fabricaron quesos tipo pasta suave y concha lavada. Por comparación también se empleó una cepa comercial de *B. linens*. La presencia de la cepa Ap, permitió obtener quesos de muy buena aceptación y de calidad equivalente a los obtenidos con la cepa comercial. Ambos quesos fueron superiores a los quesos control (elaborados sin inóculos).

Palabras clave: *Brevibacterium linens*, quesos, fermento secundario.

ABSTRACT

In a sample of farm produced Gruyere cheese 254 colonies of microorganisms were isolated. We chose four gram positive colonies morphologically conforming to cocobacilli. Using biochemical and physiological test, we determined that one of these colonies belonged to a *Brevibacterium linens* strain that we named Ap. Using this strain as a secondary ferment, we prepared smear-ripened cheeses. For comparison, we prepared cheese with a commercial strain of *B. linens*. Cheese obtained with the Ap strain was highly acceptable, and of the same quality as that obtained with the commercial strain. Both

kinds of cheese were superior to control cheese prepared without *B. linens*.

Key words: *Brevibacterium linens*, cheese, secondary ferment.

INTRODUCCIÓN

En la Industria Láctea es práctica habitual la pasteurización de la leche. Con este proceso se logra obtener una materia prima con mínima actividad microbiana, muriendo la mayor parte de la flora ácido láctica autóctona y la patógena. Al utilizar leche pasteurizada en los procesos de fabricación de quesos, y para que se lleve a cabo una fermentación controlada es necesario emplear cultivos lácticos iniciadores o "Starters", asegurándose así una consistencia en los procesos diarios y una calidad adecuada en los productos [6, 18].

En la manufactura de quesos madurados, aparte de los cultivos iniciadores es práctica corriente la utilización de lo que se denomina cultivos o fermentos secundarios con la finalidad de obtener productos con apariencia y características organolépticas diferentes a aquellas que se obtienen con solo la utilización de los cultivos iniciadores primarios. Muchos microorganismos han sido utilizados como fermentos secundarios en la elaboración de quesos madurados, entre ellos se encuentran bacterias como *Brevibacterium linens* [24, 28, 31, 40].

Brevibacterium ha sido aislado de hábitats tales como leche, derivados lácteos y en peces de mar [11, 29]. También ha sido aislada de la superficie de quesos madurados, tales como Limburger, Brick, Camembert, Roqueforti y otros donde contribuye a la maduración en superficie de los mismos [14, 29, 38]. En la maduración de los quesos se acepta que este organismo contribuye en el color superficial, proteólisis, sabor e incremento del aroma por la producción de metanotioles debido al cata-

bolismo de la metionina por acción de la metionina-lias, un importante constituyente de este tipo de quesos conocidos a modo general como quesos de Pasta Suave y Concha Lavada [7, 13, 34, 35, 36].

En el presente trabajo se plantea el aislamiento e identificación de una cepa de *Brevibacterium linens* y su influencia como fermento secundario, en la elaboración de un queso de Pasta Suave y Concha Lavada. La cepa en cuestión fue aislada de un queso artesanal tipo Gruyere, elaborado en la Planta Piloto Lácteos Santa Rosa, de la Universidad de los Andes en Mérida Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos iniciadores

Como cepas iniciadoras en la fabricación de los quesos se utilizó el cultivo comercial LD-CH-N 11 de CHR. HANSEN'S Dairy Cultures. Este cultivo está integrado por las siguientes cepas: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. El cultivo se activó creciéndolo durante 12 h en leche UHT a 30°C, al momento de la fabricación de los quesos se utilizó un inóculo a una concentración del 0,5% (v/v) del volumen de leche. También en la fabricación de los quesos se empleó la cepa comercial de *Geotrichum candidum* Geo 13 de LACTO-LABO que constituye un fermento de aromatización. El porcentaje de inóculo fue 0,1% (v/v) del volumen total de leche. La siembra en la leche de fabricación, se hizo directamente desde la preparación comercial sin previa activación. Aparte de los microorganismos ya señalados también se utilizaron cepas de: *Streptomyces somaliensis*, *Nocardia otitidiscaviarium* y *Mycobacterium tuberculosis*, los dos primeros se cultivaron en caldo nutritivo durante una semana a 35°C con agitación. La biomasa de *M. tuberculosis* fue una donación del Dr. Michael Goodfellow, de la Universidad de New Castle Upon Tyne en Inglaterra. *S. somaliensis* y *N. otitidiscaviarium* provienen de la Colección de Cepas del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Los Andes.

Aislamiento de *Brevibacterium linens*

Diez gramos de la concha de un queso artesanal tipo Gruyere elaborado sin la adición expresa de fermentos comerciales de *Brevibacterium*, se homogenizaron en una licuadora con 90 ml de agua peptonada estéril durante 2 min. Luego, el homogenizado se transfirió a un erlenmeyer estéril y se conservó a 4°C hasta su utilización.

El medio de cultivo que se utilizó para aislar y cultivar a *B. linens* proveniente de la muestra de queso, fue caldo o agar de soya tripticaseína [22]. En todos los casos con muestras del homogenizado se inoculó el medio arriba indicado y se incubó a 25°C durante 2-3 días.

Identificación morfológica fisiológica y bioquímica de las cepas aisladas

Las cepas aisladas se identificaron morfológica fisiológica y bioquímicamente según las características reportadas en la bibliografía [12, 17, 22, 40, 41]. Las pruebas realizadas fueron: coloración de Gram, crecimiento en presencia de NaCl a diferentes concentraciones: 2, 4 y 6,5%, crecimiento a diferentes temperaturas: 5, 20 y 37°C, producción de ácido a partir de glucosa, utilización de diferentes fuentes de carbono y licuación de la gelatina.

Además se realizaron los ensayos secundarios tales como: determinación de pigmentos [17], determinación de ácidos micólicos, de ácido meso-diaminopimélico y de azúcares en la pared celular de las cepas en estudio 32.

Fabricación de un queso tipo pasta suave y concha lavada

Para elaborar el queso se siguió la metodología descrita por Miettton [28], utilizando en todos los casos leche pasteurizada que se calentó a 35°C, y se adicionó 0,05 g/L de CaCl₂ (Merck), 0,5% del cultivo láctico iniciador y 0,1% de *G. candidum*, en estas condiciones se incubó hasta obtener un pH de 6,5. En ese momento se coaguló con renina de origen microbiano (Giber de Venezuela), se utilizó la cantidad necesaria para obtener un tiempo de coagulación de 40 min. Una vez cuajada la leche se procedió al corte, luego de un primer corte con lira vertical y de un repaso de 15 min se realizó un braceo durante unos 30 min hasta obtener un tamaño de grano entre 1 y 2 cm de lado. Luego del corte se retiró un 40% de suero y se procedió a moldear en recipientes de 6 pulgadas de diámetro, se hicieron volteos a los 15 min, a 1 h y a 5 h después del moldeo. Los quesos se dejaron en los moldes hasta la mañana siguiente cuando fueron desmoldeados e introducidos en salmuera saturada durante 4 h para su salado. Luego permanecieron en la sala de trabajo hasta el día siguiente, y se pasaron a cavas de maduración con un 85% de humedad y 14-15°C de temperatura. Los quesos se maduraron durante 3-4 semanas y durante ese tiempo se cepillaron cada 2 días con agua ligeramente salada (un puñado de sal por cada 10 L). En aquellos casos en que a la leche de fabricación se adicionó *B. linens*, este se incorporó al 2% (v/v) y el cultivo provenía de un crecimiento en leche a 25°C durante 2-3 días.

Análisis sensorial de los quesos

El análisis sensorial se efectuó en todos los quesos elaborados y los aspectos y puntuación asignados por nosotros de una forma arbitraria fueron los siguientes: forma (2), aspecto (3), textura de la pasta (5), gusto (8) y aroma (2). Se utilizó un panel constituido por tres personas, conocedoras de este tipo de queso.

Análisis estadístico

Después de la degustación, el puntaje para cada queso se tabuló y se realizó una prueba de puntos [25].

Posteriormente el análisis de varianza se usó para determinar la existencia o no de diferencias significativas entre las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de las cepas

Del total se aislaron 254 colonias se encontraron levaduras, bacterias gram positivas y bacterias gram negativas. En una primera etapa, se hizo una preselección descartando las colonias que morfológicamente correspondían a levaduras y las bacterias que no presentaron características morfológicas similares a las de *B. linens*, sólo se conservaron colonias gram positivas con morfología de bacilos cortos y cocos [22]. De esta primera selección sólo fueron conservadas 4 cepas que se ajustaban a las características deseadas y que se codificaron como Ap, Ar, Bp y Np. Estas fueron mantenidas a 4°C en cuñas de agar de soya tripticaseína para su análisis posterior.

Temperatura de crecimiento

Las cuatro cepas fueron crecidas a diferentes temperaturas en caldo de soya tripticaseína. Los resultados obtenidos para este ensayo se muestran en la TABLA I.

Como se puede observar todas las cepas mostraron igual comportamiento cuando se crecieron a 5, 20 ó 37°C. Ninguna de las cepas aisladas mostró crecimiento visible a 37°C lo cual no nos sorprendió ya que se considera que el rango de temperaturas óptimas de crecimiento se encuentra entre 20 y 35°C [2]. En nuestro caso en particular un buen crecimiento se observó a 20°C.

Crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio

Se pudo detectar que a las concentraciones de 2, 4 y 6,5% de NaCl el crecimiento para todas las cepas fue rápido. Diferentes autores han reportado resultados similares para *B. linens* [9, 12, 14, 29, 35], y es conocido que todas las *Brevibacterium* son tolerantes o en ocasiones estimuladas por la adición de NaCl. Muchas cepas de *B. linens* tienen crecimiento normal hasta 8% de sal e incluso hay algunas que pueden crecer en concentraciones de NaCl hasta de 12-15% [2]. Se supone que desde que el microorganismo es tolerante a la sal, la reducción de NaCl podría afectar la membrana, especialmente el mecanismo de liberación de enzimas de la célula al medio.

Producción de ácido a partir de glucosa

De las cepas en estudio sólo la cepa Np produjo ácido a partir de la degradación de la glucosa. Según la literatura [2, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 20, 34, 35, 36, 37, 40, 41] *B. linens* no produce ácido a partir de la fermentación de la glucosa. Sin embargo, en un caso se reportó apenas una débil producción de ácido [34].

Determinación de pigmentos

B. linens puede distinguirse de otras especies del género por la producción de colonias que varían entre el amarillo y el naranja. Se ha reportado que el pigmento de *B. linens* responsable del color de las colonias puede reconocerse por la reacción de color con una base o ácido fuerte [21]. Los resultados del presente estudio revelaron que todas las cepas aisladas presentaron, aunque con diferente intensidad, una reacción al tratarse con NaOH, 5M, la TABLA II nos muestra estos resultados.

Todas las cepas aisladas produjeron colonias pigmentadas aún al crecer en ausencia de luz artificial; estos resultados contradicen los reportados por Crombach [11] y Bikash y col. [2] donde se indican que la producción de pigmentos en la mayoría de las cepas de *B. linens* es dependiente de la luz. Sin embargo, reportes más antiguos basados en pruebas de homología ADN-ADN indican la existencia de al menos dos grupos dentro de las especies de *B. linens*, y entre las diferencias que presentan está que muchas cepas entre ellas la cepa tipo ATCC 9175 del grupo 2 produce pigmentos independientemente de la luz [29]. Probablemente ese sea el caso para nuestra cepa lo que al momento de fabricar quesos, podría ser una ventaja ya que se produciría la pigmentación de sus cortezas aun en el ambiente oscuro de las cavas de maduración.

Determinación de ácidos micólicos

En los cromatogramas realizados para detectar ácidos micólicos, ninguna de las células correspondientes a las cepas aisladas, mostró la existencia de los mismos. Se conoce que ninguna de las especies del género *Brevibacterium* contienen ácidos micólicos [8, 19], característica que permite separar a las especies de *Brevibacterium* de bacterias corineformes con ácido meso-diaminopimélico.

Determinación de ácido meso-diaminopimélico (DAP) en la pared celular

La mayoría de las cepas resultaron positivas a la presencia de este compuesto en la pared celular. En la TABLA III pueden apreciarse los resultados obtenidos, incluyendo las determinaciones que se hicieron en: *S. somaliensis*, *N. otitidiscaeviarium*, *M. tuberculosis* utilizados como controles. Son numerosos los autores que coinciden en que el peptidoglicano de la pared celular de las especies del género *Brevibacterium*, contienen meso-DAP como ácido diamino [1, 16, 17, 23, 30, 33, 34, 35, 36, 40].

Determinación de arabinosa y galactosa

En la TABLA IV podemos observar que ninguna de las cepas en estudio contenía arabinosa en su pared celular y dos de ellas tenían galactosa. Los trabajos publicados así lo revelan para la especie *B. linens* [17]. También en otras especies de *Brevibacterium* (*B. casei* y *B. epidermidis*) se demostró la existencia de galactosa en la pared celular [35,36].

TABLA I
CRECIMIENTO OBSERVADO A DIFERENTES
TEMPERATURAS EN CADA UNA DE LAS CEPAS
AISLADAS

Crecimiento a: (°C)	Cepas			
	Ap	Ar	Bp	Np
5	L	L	L	L
20	+	+	+	+
37	-	-	-	-

L: Crecimiento lento. +: Crecimiento rápido. -: No hubo crecimiento.

TABLA II
DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS CON NaOH 5M

Redacción de Coloración	Cepas			
	Ap	Ar	Bp	Np
	L	L	+	+

L: Reacción leve. +: Reacción evidente.

Ensayo de licuación de gelatina

Numerosos autores han reportado la presencia de actividad proteolítica en todas sus cepas de *Brevibacterium* [4, 10, 11, 12, 34, 35, 36, 40, 41]. También encontraron que la mayoría de las cepas hidrolizaban la gelatina y la caseína. La mayoría de nuestras cepas en estudio hidrolizan la gelatina, TABLA V.

Uso de diferentes fuentes de carbono

Los resultados obtenidos en este ensayo se describen en la TABLA VI. La asimilación del compuesto fue detectada por el cambio de color del indicador después de 7 días de incubación.

Bousfield [4] y Crombach [12] han reportado la utilización de acetato, glicerol, lactato y glucosa por la mayoría de las cepas de *B. linens* estudiadas; otros autores encontraron que la sacarosa y la lactosa no resultaron ser buenos sustratos para la mayoría de las cepas de *B. linens* [29]. Estudios realizados por Sharpe y col. [34, 36] confirmaron esta aseveración, sin embargo, aunque ninguna fue capaz de degradar la lactosa algunas cepas de *B. casei* utilizaron sacarosa.

La mayoría de las cepas aisladas utilizaron la glucosa, lactosa, sacarosa, glicerina, lactato y acetato. Sólo la cepa Bp fue capaz de degradar el citrato, mientras que la cepa Ap sólo fue capaz de asimilar la glucosa, glicerina, lactato y acetato como fuentes de carbono.

De los resultados obtenidos en las pruebas arriba descritas y tomando en cuenta los reportes de otros investigadores, podemos suponer que la cepa Ap es *Brevibacterium linens*. Un resumen sobre las características utilizadas para la identificación de esta cepa como *B. linens* se muestran en la TABLA VII.

Las cepas restantes no pudieron ser identificadas con precisión. Sería necesario realizar pruebas más finas como las aportadas por la taxonomía molecular para lograr este propósito. No descartamos que alguna de estas otras cepas podría ser interesante para fabricar quesos madurados.

Fabricación de un queso tipo pasta suave y concha lavada

A fin de probar en la elaboración de quesos la factibilidad de usar la cepa Ap aislada en este trabajo, se fabricaron quesos tipo Pasta Suave y Concha Lavada. En todos los casos a la leche utilizada para la fabricación de los quesos se le añadió los inóculos correspondientes al cultivo iniciador LD. CH-N 11 y la cepa Geo 13 de *Geotrichum candidum* esta última empleada no solo como un fermento de aromatización, sino también gracias a su metabolismo para aumentar el pH de la superficie de los quesos, a fin de favorecer el crecimiento de *B. linens*. Este microorganismo no crece a pH inferior a 6,0 [2].

Las fabricaciones fueron identificadas como C: quesos elaborados sin la adición de ninguna de las cepas de *B. linens*, MH: quesos fabricados con la adición de la cepa Ap de *B. linens* aislada en este trabajo y LSR: quesos elaborados con la incorporación de la cepa comercial de *B. linens*. Los quesos fabricados con la adición de *B. linens* luego del periodo de maduración adquirieron coloraciones típicas. En el queso elaborado con la cepa de origen comercial este adquirió una coloración naranja intensa mientras que el obtenido con nuestra cepa fue más tenue con un color que oscilaba entre el naranja y el amarillo. El queso control sin *B. linens* permaneció con un color crema pálido. Este resultado favorecía la posibilidad de empleo de nuestra cepa en la fabricación de ese tipo de quesos, ya que una de las principales características que influyen en la aceptabilidad de este tipo de producto aparte del sabor

TABLA III
DETERMINACIÓN DE ÁCIDO MESO-DIAMINOPIMÉLICO (DAP) EN LA PARED CELULAR DE LAS CEPAS AISLADAS

Presencia del Acido meso-DAP	Cepas						
	<i>S. somaliensis</i>	<i>N. Otitidiscaviarum</i>	<i>M. tuberculosis</i>	Ap	Ar	Bp	Npp
	-	+	+	+	+	+	-

Presente: +. Ausente: -

TABLA IV
DETERMINACIÓN DE ARABINOSA Y GALACTOSA
EN LA PARED CELULAR DE LAS CEPAS AISLADAS

Presencia de	Cepas				
	<i>N. otitidiscaviarum</i>	Ap	Ar	Bp	Np
Arabinosa	+	-	-	-	-
Galactosa	+	+	-	-	-

Presente: +. Ausente: -.

TABLA V
ESTUDIO DE LA LICUACIÓN DE GELATINA
EN LAS CEPAS AISLADAS

Licuación de Gelatina	Cepas			
	Ap	Ar	Bp	Np
	+	+	-	+

Reacción positiva: +. reacción negativa: -.

TABLA VI
USO DE FUENTES DE CARBONO POR CADA UNA
DE LAS CEPAS AISLADAS

Fuentes de carbono:	Cepas			
	Ap	Ar	Bp	Np
Glucosa	+	+	+	+
Glicerina	+	+	+	+
Lactato	+	+	+	-
Acetato	+	+	+	+
Lactosa	-	+	+	+
Sacarosa	-	+	+	+
Citrato	-	-	+	nd

Reacción positiva: +. Reacción negativa: -. Nd: reacción no determinada.

es el color de la corteza. Este cambio de color se correlaciona con el cambio de una flora inicial dominante formada principalmente por hongos y levaduras, con la bacteriana presente en las etapas finales de la maduración [27].

Análisis sensorial del producto lácteo elaborado

Las muestras de queso fueron presentadas al panel evaluador identificadas con números aleatorios, se seleccionó un panel constituido por tres personas conocedoras de este tipo de queso y un total de 3 muestras, una de cada fabricación. Los resultados obtenidos en la evaluación se presentan en la TABLA VIII.

Luego del análisis sensorial, los datos obtenidos se analizaron estadísticamente, encontrándose que las muestras MH y C, así como LSR y C son significativamente diferentes, mientras que MH y LSR son iguales entre sí. Estos resultados indican que la cepa aislada e identificada en nuestro laboratorio (MH), se comporta de forma similar a la cepa comercial (LSR). Los quesos elaborados con *B. linens* a diferencia del queso control, obtuvieron en textura gusto y aroma un alto puntaje, situación que no nos sorprendió puesto que es conocido que aparte de la actividad lipolítica, proteolítica y peptidásica presente en estas bacterias, que contribuyen a iniciar el proceso de maduración y entre otras cosas a proporcionar una textura particular a la pasta, también poseen enzimas que degradan los aminoácidos liberados de las proteínas por esas proteasas y peptidasas, entre estas enzimas se encuentran las liasas y en particular las demetilinas que degradan aminoácidos azufrados como la metionina originándose compuestos azufrados volátiles como el metanotiol [7, 13, 34, 35, 36] responsable del gusto y sobre todo del olor característico de los quesos madurados con *B. linens*. En relación a la baja puntuación obtenida para la muestra control, suponemos que aparte de la ausencia de los efectos favorables ocasionados por *B. linens* el hongo *G. candidum* ejerció un efecto desfavorable.

Es conocido que ese hongo posee una importante actividad proteolítica así como lipolítica, lo que explicaría el aspecto superficial del queso, que tenía lo que en el ámbito quesero se conoce como "piel de sapo" y que es consecuencia del crecimiento superficial excesivo de *G. candidum* ocasionando que las capas inmediatamente debajo de la superficie del queso tiendan a chorrear mientras que la corteza conserva cierta rigidez. Además en esa muestra se detectaron sabores rancios e incluso gusto a jabón, acompañados de olores amoniacales, lo que se explicaría por la alta actividad proteolítica y lipolítica del hongo. Suponemos que estos efectos no se presentaron tan marcadamente en los otros quesos ya que pudimos observar que en estos quesos el crecimiento de *G. candidum* era menos marcado, lo que podría indicar que *B. linens* impide un crecimiento exuberante del hongo. Existen reportes que indican que la cepa OC2 de *B. linens*, produce al menos una sustancia antimicrobiana conocida como Linenscina OC2, que inhibe el crecimiento de algunos patógenos gram positivos como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* pero no es activa contra gram negativos [3]. Esta sustancia fue purificada y caracterizada y resultó ser diferente a otras bacteriocinas producidas por *B. linens* tales como Linencina A y Linocina M18 [26]. También la cepa M18 es activa contra cepas de *Listeria* tales como *L. Ivanovii* y *L. monocytogenes* [15], es interesante esta actividad inhibitoria contra *Listeria* ya que sería una forma biológica de controlar este patógeno común en quesos de pasta suave y concha lavada. Nuestro Laboratorio estudia en estos momentos si nuestra cepa es productora de sustancias antimicrobianas y cual es su espectro de acción.

TABLA VII
CARACTERÍSTICAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *B. Linens*

	Cepas			
	Ap	Ar	Bp	Np
Crecimiento a:				
(°C)				
5	L	L	L	L
20	+	+	+	+
37	-	-	-	-
Crecimiento en NaCl				
(%)				
2,0	+	+	+	+
4,0	+	+	+	+
6,5	+	+	+	+
Producción de ácido a partir de glucosa	-	-	-	+
Ensayo de coloración con NaOH 5 M	L	L	+	+
Presencia de Ácidos Micólicos	-	-	-	-
Presencia de Ácido meso-diaminopimélico	+	+	+	-
Presencia de:				
Arabinosa	-	-	-	-
Galactosa	+	-	-	+
Licuación de Gelatina	+	+	-	+
Uso de fuentes de carbono:				
Glucosa	+	+	+	+
Glicerina	+	+	+	+
Lactato	+	+	+	-
Acetato	+	+	+	+
Lactosa	-	+	+	+
Sacarosa	-	+	+	+
Citrato	-	-	+	nd

+: Reacción positiva. -: Reacción negativa. L: Reacción leve o lenta. nd: Reacción no determinada.

TABLA VIII
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL DE LAS DISTINTAS MUESTRAS DE QUESO

Muestra	Forma	Aspecto	Textura de la pasta	Gusto	Aroma	Total para cada muestra
C	1,5; 1,5;	1,5; 1,5;	3,0; 3,0;	4,0; 4,0	1,5; 1,5;	12,0; 11,5
	1,5	1,5	3,0	4,0	1,5	11,5
MH	1,5; 1,5;	2,5; 2,5	5,0; 4,0;	8,0; 8,0;	2,0; 2,0	18,0; 18,0
	1,5	2,5	5,0	8,0	2,0	17,0
LSR	1,5; 1,5;	2,5; 2,5	5,0; 4,0;	8,0; 8,0;	2,0; 2,0	18,0; 18,0
	1,5	2,5	4,0	7,0	2,0	17,0

C: Muestra control sin *B. linens*. LSR: Muestra con *B. linens* comercial. MH: Muestra elaborada con *B. linens* aislada en este trabajo. En cada caso se presenta la evaluación de tres catadores diferentes.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En Venezuela se pueden desarrollar nuevos tipos de quesos, especialmente si se tienen a disposición cultivos puros autóctonos que pueden desarrollarse más activamente en una relación simbiótica con su hábitat natural, en comparación con microorganismos extraños a nuestro medio, dando como resultado final un queso con características propias.

Se logró aislar, identificar y caracterizar una cepa autóctona de *Brevibacterium linens*. De acuerdo a los resultados obtenidos, el empleo de la cepa autóctona de *B. linens* permitió obtener quesos con una mejor aceptación que aquellos elaborados sin la adición de este tipo de microorganismo y similares a los elaborados con una cepa de origen comercial. Es recomendable continuar la búsqueda de microorganismos autóctonos, con características adecuadas para su empleo en la fabricación de quesos y otros lácteos lo que en el futuro permitiría la elaboración de nuevos productos, e incluso disminuir la importación de ese tipo de microorganismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDERTON, W.J.; WILKINSON, S.G. Evidence for the presence of a new class of teichoic acid in the cell wall of *Bacterium* NCTC 9742. **J. Gen. Microbiol.** 118: 343-351. 1980.
- [2] BIKASH, C.; GHOSH, T.; SIENKIEWICZ, T.; KRENKEL, K. *Brevibacterium linens*-a useful enzyme producer for cheese: a review. **Milchwissenschaft.** 55: 628-632. 2000.
- [3] BOUCABEILLE; MENGIN-LECREULX, D.; HENCKES, G.; SIMONET, J.M.; HEIJENOORT, J. Antibacterial and hemolytic activities of linenscin OC2, a hydrophobic substance produced by *Brevibacterium linens* OC2. **FEMS Microbiol. Lett.** 153: 295-301. 1997.
- [4] BOUSFIELD, I.J. A taxonomic study of some coryneform bacteria. **J. Gen. Microbiol.** 71:441-455. 1972.
- [5] BOUSFIELD, I.J. The taxonomy of coryneform bacteria from the marine environment. en: **Coryneform Bacteria**, Academic Press, London: 217-233. 1978.
- [6] CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 50: 131-149. 1999.
- [7] COLLINS, M.D. The Genus *Brevibacterium*. En: **The Prokaryotes**, 2ª edición, Vol. 2, Springer-Verlag, Germany: 1351-1354. 1992.
- [8] COLLINS, M.D.; JONES, D.; KEDDIE, R.M.; SNEATH, P.H.A. Reclassification of *Chromobacterium iodinum* (Davis) in a redefined genus *Brevibacterius* as *Brevibacterium iodinum* nom. Rev. ; comb. nov. **J. Gen. Microbiol.** 120: 1-10. 1980.
- [9] COLLINS, M.D.; FARROW, J.A.E.; GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D.E. *Brevibacterium casei* sp. Nov. and *Brevibacterium epidermidis* sp. Nov. **Syst. Appl. Microbiol.** 4: 388-395. 1983.
- [10] COLWELL, R.R.; CITARELLA, R.V.; RYMAN, I.; CHAPMAN, G.B. Properties of *Pseudomonas iodinum*. **Can. J. Microbiol.** 15:851-857. 1969.
- [11] CROMBACH, W.H.J. Relationships among coryneform bacteria from soil, cheese and sea fish. **Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.** 40: 347-359. 1974a.
- [12] CROMBACH, W.H.J. Morphology and Physiology of coryneform bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.** 40: 361-376. 1974 b.
- [13] DIAS, B.; WEIMER, B. Conversion of methionine to thiols by *Lactococci*, *Lactobacilli*, and *Brevibacteria*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 3320-3326. 1998.
- [14] EL-ERIAN, A.F.M. **Bacteriological studies on Limburger cheese**. Thesis Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, Veenman and Zonen, Wageningen. 1969.
- [15] EPPERT, I.; VALDES-STAUER, N.; GOTZ, H.; BUSSE, M.; SCHERER, S. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4812-4817. 1997.
- [16] FIEDLER, F.; SHLEIFER, K.M.; CZIHARZ, B.; INSTER-SCHICK, E.; KANDLER, O. Murein types in *Arthrobacter*, *brevibacteria*, *corynebacteria* and *microbacteria*. **Publ. Fac. Sci. Univ. J.E. Purkyne, Brno** 47: 111-122. 1970.
- [17] FIEDLER, F.; SCHAFFLER, M.J.; STACKEBRANDT, E. Biochemical and nucleic acid hybridization studies on *Brevibacterium linens* and related strains. **Arch. Microbiol.** 129: 85-93. 1982.
- [18] GÓMEZ, R.; PELAEZ, C. Fermentos lácticos en la industria quesera. **Alimentación, equipos y tecnología.** Año VIII No. 1 Enero-Febrero: 193-202. 1989.
- [19] GOODFELLOW, M.; COLLINS, M.D.; MINNIKIN, D.E. Thinlayer chromatographic analysis of micolic acid and other long-chain components in whole-organism methanolsates of coryneform related taxa. **J. Gen. Microbiol.** 96: 351-358. 1976.
- [20] JONES, D. A numerical taxonomic study of coryneform and related bacteria. **J. Gen. Microbiol.** 87: 52-96. 1975.
- [21] JONES, D.; WATKINS, J.; ERICKSON, S.K. Taxonomically significant colour changes in *Brevibacterium linens* probably associated with a carotenoid-like pigment. **J. Gen. Microbiol.** 77: 145-150. 1973.

- [22] JONES, D.; KEDDIE, R.M. Irregular, Nonsporing Gram-Positive Rods en: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 7th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore: 1301-1313. 1986.
- [23] KEDDIE, R.M.; CURE, G.L. The cell wall composition and distribution of free mycolic acids in named strains of Coryneform bacteria and in isolates from various natural sources. **J. Appl. Bacteriol.** 42: 229-253. 1977.
- [24] LECLERCQ-PERLAT, M.N.; OUMER, A.; BUONO, F.; BERGERE, J.L.; SPINLER, H.E.; CORRIEU, G. Behaviour of *Brevibacterium linens* and *Debaromyces hansenii* as ripening flora in controlled production of soft smear cheese from reconstituted milk: protein degradation. **J. Dairy Sci.** 83: 1674-1683. 2000.
- [25] MACKEY, A.; FLORES DE M.I.; SOSA, M. **Evaluación sensorial de los alimentos**. 2da edición. Serie Manuales No. 2 Ediciones CIEPE San Felipe, Venezuela: 61-74. 1984.
- [26] MAISNIER-PATIN, S.; RICHARD, J. Activity and purification of Linenscin OC2, an antibacterial substance produced by *Brevibacterium linens* OC2, an orange cheese coryneform bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1847-1852. 1995.
- [27] MARCELLINO, N.; BENSON, D.R. Scanning electron and light microscopic study of microbial succession on Bethlehem St. Nectaire cheese. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 3448-3454. 1992.
- [28] MIETTON, B. Les Technologies Pates Molles et Dérivés en: **Laits et Produits Laitiers, Vol 2**, Technique et Documentation—Lavoisier: 129-154. 1985.
- [29] MULDER, E.G.; ADAMSE, A.D.; ANTHEUNISSE, J.; DEINEMA, M.H.; WOLDENDONP J.W.; ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. The relationship between *Brevibacterium linens* and bacteria of the genus *Arthrobacter*. **J. Appl. Bacteriol.** 29: 44-71. 1966.
- [30] PITCHER, D.G.; NOBLE, W.C. Aerobic diphtheroids of human skin. en **Coryneform Bacteria**, Academy Press, London: . 265-287. 1978.
- [31] RATTRAY, F.P.; FOX, P.F. Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review. **J. Dairy Sci.** 82: 891-909. 1999.
- [32] SANDOVAL, H.; SERRANO, J.A. **Identificación y diagnóstico de Actinomicetos Patógenos**. Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco. 201 pp 1996.
- [33] SCHLEIFER, K.H.; KANDLER, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. **Bacteriol. Rev.** 36: 407-477. 1972.
- [34] SHARPE, M.E.; LAW, B.A.; PHILLIPS, B.A. Coryneform bacteria producing methanethiol **J. Gen. Microbiol.** 94: 430-435. 1976.
- [35] SHARPE, M.E.; LAW, B.A.; PHILLIPS, B.A.; PITCHER, D.G. Methanethiol production by coryneform bacteria: Strains from dairy and human skin sources and *Brevibacterium linens*. **J. Gen. Microbiol.** 10: 345-349. 1977.
- [36] SHARPE, M.E.; LAW, B.A.; PHILLIPS, B.A.; PITCHER, D.G. Coryneform bacteria producing methanethiol. en **Coryneform Bacteria**, Academic Press, London: 289-300. 1978.
- [37] SNEATH, P.H.A. A study of the bacterial genus *Chromobacterium*. **J. Sci.** 34: 243-500. 1960.
- [38] VALDES-STAUER, N.; SCHERE, S.; SEILER, H. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. **Int. J. Food Microbiol.** 34: 115-129. 1997.
- 39 WEBER, F.; RAMET, J.P. Technologie comparée de l'affinage des différents types de fromage. En: **Le Fromage**. 2^{ème} édition, Technique et Documentation (Lavoisier). París: 291-307. 1987.
- [40] YAMADA, K.; KOMAGATA, K. Taxonomic studies on coryneform bacteria.IV: Morphological, cultural, biochemical and Physiological characteristics. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 18: 399-416. 1972 a.
- [41] YAMADA, D.; KOMAGATA, K. Taxonomic studies on coryneform bacteria.V. Clasification of coryneform bacteria. **J. Gen Appl. Microbiol.** 18: 417-431.1972 b.