

EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Lactococcus* COMO CULTIVOS INICIADORES EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS DE PASTA PRENSADA

Evaluation of *Lactococcus* Strains as Starters in the Elaboration of Pressed Cheese

Zarack Chacón Rueda y Guillermo López Corcuera

Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos. Dpto. de Biología. Facultad de Ciencias.
Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. E mail: chzarack@ciens.ula.ve

RESUMEN

Con el objetivo de obtener cepas autóctonas de bacterias ácido-lácticas a ser utilizadas como cepas iniciadoras en la fabricación de quesos, muestras de leche de vacas Holstein americana, Jersey, Pardo Suiza y mestizas, se incubaron a 30°C en presencia de azida de sodio y de Anfotericina B. La incubación se mantuvo hasta la coagulación de la leche. El proceso fue repetido por 6 veces consecutivas obteniéndose al final del mismo, tiempos de coagulación iguales o menores a 6 h. Luego de ese proceso, se aislaron varias colonias y fueron caracterizadas como cepas de *Lactococcus*: 7 cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2 de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y 1 de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. La capacidad acidificadora de todas estas cepas era semejante a la de cepas comerciales. Una mezcla de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* fue utilizada para fabricar quesos tipo pasta prensada, cuya calidad resultó equivalente a la de quesos comerciales tipo Gouda, concluyéndose que es posible obtener y utilizar cepas autóctonas para la fabricación de quesos de alta calidad.

Palabras clave: *Lactococcus*, cepas iniciadoras, quesos.

ABSTRACT

With the objective of obtain autochthonous strains of lactic acid bacteria to be used as starters in the elaboration of cheeses, samples of milk from American Holstein, Jersey, Brown-Swiss and hybrid type "criollas" cattle were incubated at 30°C, in the presence of sodium azide and Amphotericin B. Temperature incubation was maintained until milk coagulation was attained.

After 6 consecutive replica the coagulation tests times arose values of 6 h or less. After these assays were completed, several colonies were isolated and characterized as *Lactococcus* strains: 7 strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2 of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and 1 of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. All these strains presented an acidification capacity similar to commercial strains. A blend of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* was used to produce several pressed cheese which resulted with similar qualities when compared to Gouda commercial cheese. It is concluded that autochthonous strains can be obtained and used to produce quality cheese.

Key words: *Lactococcus*, starters, cheese.

INTRODUCCIÓN

La industria de procesamiento de productos lácteos utiliza grandes cantidades de bacterias lácticas, las cuales son empleadas en la preparación de alimentos fermentados tales como quesos, yogur, mantequilla, crema, etc. Las principales especies bacterianas pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*.

Las mismas poseen características adecuadas para su uso en esos procesos, entre ellas se encuentran: producción de ácido láctico, aromas y capacidad proteolítica [11]. Desafortunadamente tales propiedades a nivel genético, se encuentran codificadas en plásmidos [6], ocasionando una gran inestabilidad, perdiéndose con frecuencia las propiedades de interés industrial [3]; lo que determina que en los procesos de fermentación industrial, no sea posible utilizar por más de un año, una misma cepa bacteriana.

Dicha situación crea la necesidad, de buscar de manera permanente, nuevas cepas con características adecuadas con

el objeto de ser utilizadas en dichos procesos. El hábitat de las bacterias lácticas es variado: encontrándose sobre vegetales en descomposición, en leches fermentadas, en quesos, en el tracto vaginal, entre otros.

En el presente trabajo se reporta el aislamiento, a partir de muestras de leche de 10 cepas de bacterias ácido lácticas pertenecientes al género *Lactococcus*. Para las más acidificadoras también se presenta su caracterización a nivel tecnológico, en la fabricación de quesos de pasta prensada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y medios de cultivo

Se utilizó un cultivo comercial de la casa LABTO-LABO (Francia) formado por una mezcla de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* en proporciones de 10, 80 y 10%, respectivamente. Como control en las fabricaciones de quesos se utilizaron las cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 19257. Todas fueron cultivadas en medio Elliker Difco [2] a 30°C durante 12 h.

Se empleó la cepa 303 de *Escherichia coli* K-12 cultivada a 37°C en medio rico Difco y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 560, cultivada a 30°C en caldo dextrosa sabouraud Difco.

Los microorganismos aislados en este trabajo provenientes de las muestras de leche, fueron crecidos en leche estéril UHT de origen comercial con un contenido de grasa de 1%, durante 12 h a 30°C. Una vez aisladas e identificadas se conservaron por periodos cortos de tiempo a 4°C en cuñas de agar Elliker [2], para conservarlas por más tiempo, se congelaron a -20°C en medio Elliker con glicerol al 30%.

Leches

Se emplearon muestras de leche provenientes de 4 fincas ubicadas en la ciudad de Mérida, estado Mérida, Venezuela. Todas las fincas se encuentran aproximadamente a 2.000 m.s.n.m., la leche provenía de vacas tipo Holstein americana, Jersey, Pardo Suiza y mestizas. Fueron recolectados directamente de la ubre de las vacas 100 mL de leche y trasladadas refrigeradas al laboratorio donde se procesaron de inmediato. En todos los casos, salvo para las vacas mestizas, los ordeños eran realizados de manera mecánica.

Enriquecimiento y aislamiento de bacterias lácticas

A fin de eliminar las bacterias gram negativas que pudieran estar presentes en las muestras de leche, las mismas se incubaron en presencia de azida de sodio Merck, utilizándose concentraciones entre 40 µg/mL y 200 µg/mL. Para determinar la concentración que eliminara las bacterias gram negativas sin afectar considerablemente el crecimiento de las gram positivas, fueron realizadas pruebas de sensibilidad con el cultivo

comercial LABTO-LABO de gram positivas formado por la mezcla de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Como bacteria control gram negativa se empleó *E. coli* K-12 cepa 303.

En ocasiones se observó que las muestras de leche también tenían levaduras, por lo que fue necesario realizar las pruebas de enriquecimiento, en presencia de Anfotericina B de Laboratorios SQUIBB, un agente antifúngico que elimina hongos levaduriformes [13]. Para determinar la concentración a utilizar se realizaron pruebas con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y probaron concentraciones que variaron entre 5 µg/mL y 100 µg/mL.

Para las pruebas de enriquecimiento en bacterias ácido-lácticas se inoculó 1 mL de cada una de las diferentes leches en 9 mL de leche estéril (UHT) conteniendo azida de sodio y Anfotericina B. Las muestras se incubaron a 30°C hasta su coagulación y se procesaron por triplicado. Para cada una de las muestras, se repitió el proceso seis veces seguidas, hasta obtener tiempos de coagulación iguales o menores a las 6 h. En todos los casos el preinóculo de un día provenía del cultivo del día anterior.

Una vez enriquecidas las muestras de leche con bacterias super acidificadoras, se procedió a aislar las bacterias allí presentes, para ello hubo que realizar diluciones seriadas en caldo Elliker y sembrarlas en cajas de agar Elliker empleando la técnica de siembra en profundidad [8]. Luego de 24 h de incubación a 30°C fueron escogidas aquellas colonias que crecieron más rápido. Los clones escogidos fueron crecidos en caldo Elliker a 30°C durante 24 h y posteriormente, se conservaron a 4°C en cuñas de agar Elliker hasta su posterior utilización.

Identificación de las cepas aisladas

Una vez enriquecidas las muestras de leche con bacterias super acidificadoras, se procedió a aislar las bacterias allí presentes, para ello hubo que realizar diluciones seriadas en caldo Elliker y sembrarlas en cajas de agar Elliker. Luego de 24 h de incubación a 30°C fueron escogidas aquellas colonias que crecieron más rápido, los clones aislados se identificaron morfológica, fisiológica y bioquímicamente según las características reportadas en la bibliografía [1, 4, 7, 10]. Las pruebas realizadas fueron: coloración de Gram, crecimiento en medio salino a diferentes concentraciones: 2, 4, y 6,5% y, temperaturas (10, 40 y 45°C). Otras características estudiadas fueron, capacidad de fermentación de 50 carbohidratos por medio del kit API tipo 50 Ch (bioMerieux) la utilización del citrato e hidrólisis de la arginina.

Determinación del poder acidificante de las bacterias aisladas

Se inocularon 200 mL de leche descremada estéril (UHT) con un 1%, de un preinóculo de las cepas a probar pro-

veniente también de un cultivo de 12 horas a 30°C en leche descremada. Los cultivos fueron incubados a 30°C determinándoseles cada hora a muestras de 10 mL, el pH hasta alcanzar un valor cercano a 5,0 [14].

Elaboración de queso pasta prensada

Con las bacterias seleccionadas como mejores acidificadoras, se procedió a elaborar a nivel de laboratorio, queso tipo pasta prensada según la metodología de Pointurier [9], para ello se pasteurizó la leche a 65°C durante 30 min, adicionándole 0,01% de CaCl₂, y fue calentada a 32°C agregándose 0,5% de los cultivos de bacterias ácido lácticas a ensayar. Luego de incubar durante 20 min, se cuajó. El cuajo utilizado fue de origen microbiano marca Giber (Giber de Venezuela C.A.), la cantidad suministrada era la necesaria para obtener un tiempo de floculación de 10 min y uno de coagulación de 30 min. La cuajada se cortó hasta obtener un tamaño de grano como uno de maíz. Seguidamente se retiró un 40% de suero y se añadió un 20% de agua caliente a 50°C lo que elevó la temperatura a unos 39°C. La pasta fue braceada durante 35 min, luego de un pre-prensado, se colocó en moldes de 8 pulgadas de diámetro recubiertos internamente con lienzo. Se prensó durante 5 h usando pesas de tres kilos. A la mañana siguiente se saló, sumergiéndola en salmuera saturada durante 8 h. La maduración transcurrió a 12°C y 85% de humedad durante 14 semanas. Con las bacterias escogidas se prepararon cultivos iniciadores mixtos, donde *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se utilizó en una proporción de 10% y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* en un 90%, proporción ésta igual a la presente en cultivos de origen comercial y de uso corriente en la industria quesera. A modo de control fue preparado un queso acidificado con HCl grado alimenticio y otro acidificado con una mezcla de cepas de referencia de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 19257, la proporción entre ellas fue de 10 y 90%, respectivamente.

Análisis sensorial de los quesos

Se utilizó un panel de 20 personas conocedoras de las características del producto a evaluar. La calificación para cada uno de los renglones a considerar fue de 2 puntos para forma, 3 para aspecto, 5 correspondieron a textura de la pasta, 8 a gusto y 2 al aroma. De forma arbitraria se decidió que para que un queso se considerara aceptable, al menos debería tener una puntuación mínima de 13. Los productos de mayor aceptación fueron aquellos con mayor puntaje. Todas las fabricaciones fueron identificadas mediante un número aleatorio al azar. A modo de comparación, en el análisis sensorial sin el conocimiento del panel de catadores fueron incluidas dos muestras de quesos del mismo tipo, pero de procedencia comercial. Uno de ellos de fabricación extranjera y otro nacional, escogidos entre las mejores marcas disponibles en el mercado.

Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de varianza de dos factores y una comparación múltiple de medias de Tukey descrita por Sokal y Rohlf [12].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de las bacterias lácticas

En el proceso de aislamiento y selección de las bacterias ácido lácticas la concentración de azida de sodio escogida fue 80 µg/mL, concentración que permitió un crecimiento de más de un 50% para las bacterias lácticas, y produjo una inhibición en *E. coli*, cepa 303, de un 85%.

En el caso de Anfotericina B, la concentración empleada fue de 50 µg/mL, ya que provocó una inhibición de un 70% en la levadura utilizada, pero no afectaba el crecimiento de las bacterias lácticas.

Finalmente, con el objeto de realizar los enriquecimientos en las posibles bacterias lácticas presentes en las muestras de leche, las mismas fueron incubadas en presencia de 80 µg/mL de azida de sodio y 50 µg/mL de Anfotericina B. A lo largo de los sucesivos pasos de enriquecimiento, el tiempo de coagulación fue disminuyendo hasta alcanzar en el sexto pasaje, tiempos ligeramente menores a 6 h, indicativo de un número cada vez mayor de bacterias lácticas con un alto poder acidificante.

Identificación de las bacterias lácticas super acidificadoras

De las muestras de leche enriquecidas en bacterias lácticas super acidificadoras, se seleccionaron 14 colonias que presentaron crecimiento rápido. Se caracterizaron según se indicó en materiales y métodos, encontrándose en todos los casos cocos (en pares o cadenas), de los cuales 7 eran *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y 1 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Las 4 restantes no lograron identificarse satisfactoriamente. Las características más importantes encontradas para las distintas cepas, pueden apreciarse en la TABLA I.

Caracterización tecnológica de los lactococos

Con el objeto de caracterizar las cepas aisladas y utilizarlas como cultivos iniciadores, fue necesario determinar la capacidad acidificadora de las mismas, mediante una prueba rápida de acidificación donde quedaron registrados los cambios de pH en cultivos realizados en leche durante 7 h. Los resultados presentados en las FIGS. 1 y 2, indican que existe una misma tendencia entre las cepas aisladas, comportándose de manera similar a las cepas de referencia escogidas. Las cepas seleccionadas pueden ser consideradas como buenas acidificadoras, ya que en tiempos cortos, logran provocar un descenso del pH a valores similares obtenidos con cepas co-

TABLA I
CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS Y PERFIL FERMENTATIVO DE LAS CEPAS AISLADAS EN ESTE ESTUDIO

	Número de cepa													
	CL1	CL2	CL3	CL4	CL5	CL6	CL7	CL8	CL9	CL10	CL11	CL12	CL13	CL14
Crecimiento en °C a:														
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO ₂ a partir de glucosa														
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NH ₃ a partir de Arg														
	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Acetoina														
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Crecimiento en NaCl (%)														
2,0	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4,0	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
6,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentación de carbohidratos														
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	±	+	+	±	+	+	±	+	+	+	-
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-	-	+	-	+	±	-	-	-	-	-
Sacarosa	±	±	±	+	±	±	+	±	-	-	-	-	-	-
Salicina	+	+	+	±	±	+	±	±	±	±	±	+	+	+
Rafinosa	-	-	+	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	±	±	-	-	±	-	-	-	±	-	-	±	±	-
Manitol	-	±	±	±	+	±	±	+	±	±	-	-	±	-

+: Positiva; -: negativa; ±: parcialmente positiva.

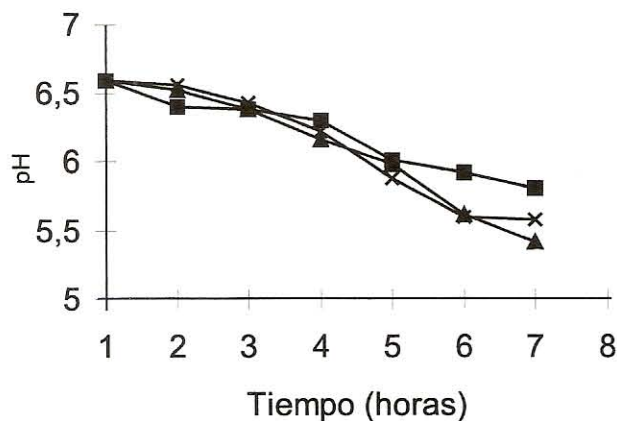


FIGURA 1. COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ACIDIFICANTE ENTRE LAS CEPAS: *Lc. lactis* subs. *lactis* ATCC 19257 (■), *Lc. lactis* subs. *lactis* CL3 (▲) Y *Lc. lactis* subs. *lactis* CL7 (X).

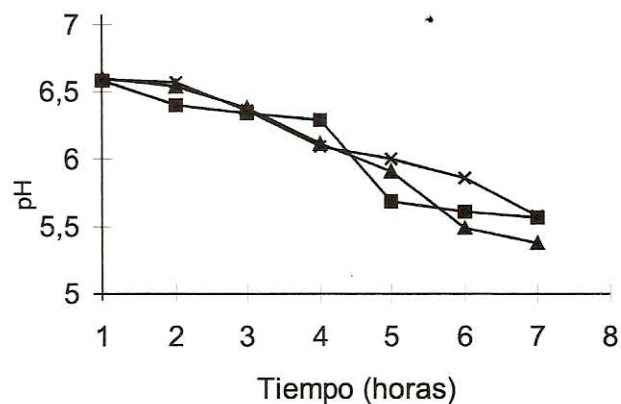


FIGURA 2. COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ACIDIFICANTE ENTRE LAS CEPAS: *Lc. lactis* subs. *cremoris* ATCC 19453 (■), *Lc. lactis* subs. *cremoris* CL4(▲) Y *Lc. lactis* subs. *cremoris* CL11 (X).

TABLA II
COMPARACIÓN DE MEDIAS DEL ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS DIFERENTES TIPOS DE QUESOS

Atributo	Queso						C1	C2
	F1	F2	F3	F4	F5	F6		
Forma	2,00	2,00	1,70	2,00	2,00	2,00	1,95	2,00
Aspecto	2,95	3,00	2,80	3,00	2,90	2,90	3,00	2,90
Aroma	1,38	1,78	1,92	1,98	1,24	1,30	1,82	1,80
Textura	3,40	4,54	4,98	4,39	4,75	3,49	4,40	4,57
Gusto	6,63	7,21	6,04	6,92	4,78	3,80	7,02	7,35
Total	16,36	18,53	17,44	18,29	15,67	13,49	18,19	18,62

TABLA III
COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS DE TUKEY

Muestra	C2	F2	F4	C1	F3	F1	F5	F6
Media	18,62	18,53	18,29	18,19	17,44	16,36	15,67	13,49

F1, F2, F3, F4, F5 y F6: fabricaciones indicadas en el texto. C1: queso comercial nacional; C2: queso comercial importado. Todo par de medias no subrayadas por la misma línea son significativamente diferentes ($P < 0,01$).

merciales [5]. Finalmente, con estas cepas se elaboraron quesos que fueron comparados con productos similares de calidad reconocida existentes en el mercado.

Elaboración de un queso pasta prensada

Fueron elaborados 6 quesos utilizando mezclas de 2 cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* (CL3, CL7) escogidas entre las mejores acidificadoras y las 2 de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (CL4, CL11). También se hicieron quesos control con las cepas de referencia ATCC y uno acidificado artificialmente. Las fabricaciones se enumeraron desde F1 hasta F6. Las mezclas utilizadas en las distintas fabricaciones fueron:

F1= CL3 - CL4 (*Lc. lactis* - *Lc. cremoris*)

F2= CL3 - CL11 (*Lc. lactis* - *Lc. cremoris*)

F3= CL7 - CL4 (*Lc. lactis* - *Lc. cremoris*)

F4= CL7 - CL11 (*Lc. lactis* - *Lc. cremoris*)

F5= Control ATCC 19435 - ATCC 19257 (*Lc. lactis* - *Lc. cremoris*)

F6= Control acidificado con HCl.

Luego de un período de maduración de 14 semanas a 12°C y 85% de humedad, los quesos fueron sometidos a pruebas degustativas. Los resultados de la evaluación sensorial son señalados en la TABLA II, nótese que aun cuando todos los quesos superaron la puntuación mínima requerida para considerarlos aceptables es decir 13 puntos, el mínimo valor correspondió a la fabricación F6 (13,49 puntos) es decir queso control acidificado artificialmente con HCl. Los quesos experimentales con más aceptación fueron F2 y F4 con 18,53 y 18,29 puntos respectivamente, equivalentes a los obtenidos por los quesos comerciales. Estas fabricaciones tuvieron en

común el empleo de la cepa de *Lc. cremoris* CL11 a diferencia de los otros casos donde se empleó la cepa CL4, probablemente la mejor calidad de esos quesos podría deberse a características especiales presentes en CL11. Es notorio que el queso (F5) elaborado con las cepas de referencia ATCC no obtuvo puntaje muy alto, probablemente no son cepas adecuadas para su empleo en la fabricación de quesos. El análisis de varianza de los resultados de la degustación no mostró diferencias significativas entre los catadores ($P > 0,01$), pero sí entre las muestras ($P < 0,01$). En la TABLA III puede observarse el resultado de la comparación múltiple de medias de Tukey utilizando un análisis de varianza de dos factores. Los quesos provenientes de las fabricaciones F2, F4 y F3 no presentaron diferencias con el tipo gouda nacional (C1) ni con el importado (C2). Las fabricaciones F3 y F1 son similares entre sí, al igual que F1 y F5. La fabricación F6 resultó diferente a todas las demás, siendo la de menor aceptación, lo que indica el papel importante que juegan las bacterias lácticas a nivel de producción de aroma y en menor grado, modificando con su débil maquinaria proteolítica la textura del producto. La cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* no fue utilizada en la fabricación de los quesos, por no ser la más idónea para el tipo de queso fabricado, ya que esta bacteria se utiliza preferiblemente en la acidificación y aromatización (son productoras de compuestos como diacetilo en cantidades que van de 0,4 a 0,8 ppm) de las cremas en la fabricación de mantecillas y de leches en la elaboración de quesos frescos y pastas suaves [11].

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La selección de las bacterias ácido-lácticas en presencia de 80 µg/mL de azida de sodio y de 50 µg/mL de Anfotericina

B, eliminó bacterias gram negativas y levaduras respectivamente, lo que permitió desde un inicio el enriquecimiento en bacterias gram positivas. Los sucesivos pasajes de coagulación a 30°C obteniéndose al final de los mismos tiempos de coagulación inferiores a 6h, seleccionaron las bacterias más acidificadoras siendo ésta una de las características más deseadas en las bacterias a ser empleadas como iniciadoras o "starters" en la industria láctea.

Las bacterias aisladas en este trabajo son adecuadas para la fabricación del queso escogido. Se puede afirmar que la metodología empleada, permite obtener cepas propias de la zona de procedencia de la leche, con propiedades industriales capaces de sustituir a las empleadas en la industria láctea nacional la cual para sus procesos importa la totalidad de las cepas. Probablemente, se trata de cepas únicas. Faltaría caracterizarlas más extensivamente, determinando resistencia a fagos, producción de bacteriocinas, capacidad lipolítica, etc. Estos microorganismos autóctonos permitirían junto con las leches de la zona, fabricar nuevos quesos típicos de la región, no sólo con olores y sabores propios, sino de buena calidad.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de La Universidad de Los Andes, por el financiamiento de este proyecto (C352-88).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DELLAGLIO, F.; DE ROISSART, H.; TORRIANI, S.; CURK, M.C.; JANSSENS, D. Taxonomie, métabolisme, croissance et génétique des bactéries lactiques, en: **Bactéries Lactiques** Vol II, Loriga: 73-74. 1994.
- [2] ELLIKER, P.R. ANDERSEN, A.W. HANNESSON, G. An agar medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. **J. Dairy Sci.** 39: 1611-1612. 1956.
- [3] GASSON, M. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. **J. Bacteriol.** 159: 1-9. 1983.
- [4] LEVEAU, J.Y. BOUIX, M. La Flore Lactique en: **Techniques D'analyse et de controle dans les industries Agro-Alimentaires**, V. 3. Technique et Documentation, Paris: 109-115. 1980.
- [5] LUCAS, S.; REYROLLE, J. Etude d'un lot de ferments lactiques mésophiles. Equilibre des flores au cours de la premiere étape de la fabrication de levain. **Lait** 69: 121-130. 1989.
- [6] LYNDON, D. GASSON, M. Genetics of lactic acid bacteria. **J. Dairy Res.** 48: 363-376. 1981.
- [7] ORVIN MUNDT, J. Lactic Acid Streptococci en: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, V.2. The Williams and Wilkins Co, Baltimore:1065-1066. 1986.
- [8] PETRANSXIENE, D. LAPIED, L. Dénombrement de la Flore Lactique en: **La qualité bactériologique du lait et des produits laitiers**. 10 ed. Technique & Documentation. Paris: 81-85. 1981.
- [9] POINTURIER, H. Les Fromages, en: **Laits et Produits Laitiers**. V.2, Technique et documentation - Lavoisier. Paris, 180-189. 1985.
- [10] SCHLEIFER, K.H. KRAUS, J. DVORACK, C. KILPERBALZ, R. COLLINS, M.D. FISCHER, W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related Streptococci to the genus *Lactococcus*. **System. Appl. Microbiol.** 6: 183-195. 1985.
- [11] SCHMIDT, J.L. TOURNEUR, C. LENOIR, J. Fonctions et choix des bactéries lactiques en technologies laitieres, en: **Bactéries Lactiques** Vol II. Loriga: 37-54. 1994.
- [12] SOKAL, R.R. ROHLF, F.J. **Biometría**. Ed. Blum. Barcelona. 832 pp. 1979.
- [13] SPILVA DE LEHR, A. **Guía de las Especialidades Farmacéuticas en Venezuela**, 24 edición, Distribuido por Alfa Omega Libros: pp. 55. 1996-1997.
- [14] ZANATTA, P.; BASSO, A. Une nouvelle approche pour la caracterisation de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* baséé sur la vitesse d'acidification. **Lait** 72: 285-295. 1992.