

SELECCIÓN Y ELABORACIÓN DE UN CULTIVO INICIADOR A PARTIR DE CEPAS DE *Enterococcus* AISLADAS DE UN QUESO VENEZOLANO AHUMADO ANDINO.

Selection and Manufacture of an Starter Using Strains of *Enterococcus* Isolated from a Venezuelan Andean Smoked Cheese.

María Elisa Rodríguez, Zarack Chacón Rueda, Balmore Guerrero Cárdenas, Julio Otoniel Rojas y Guillermo López Corcuera (†).

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

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue aislar bacterias del género *Enterococcus* presentes en una muestra de queso ahumado andino. Se aislaron 15 cepas pertenecientes al género *Enterococcus*. Se realizaron pruebas confirmatorias para el género, descartando 8 cepas que no reunían las características del género, conservándose 7 que cumplían con las características exigidas. De las cepas seleccionadas se escogieron cuatro cepas entre las que se encontraban las mejores acidificadoras de la leche, y además que fueran compatibles con cepas de *Lactococcus* y *Lactobacillus* aisladas en un estudio anterior también a partir de un queso ahumado andino. Con las cepas de *Enterococcus* así como con las de *Lactococcus* y *Lactobacillus*, se prepararon diferentes mezclas para su posterior uso como cultivos iniciadores en la elaboración de un queso ahumado elaborado con leche pasteurizada, para obtener un producto con características similares al queso artesanal, pero con los beneficios higiénicos de la leche pasteurizada y una flora bacteriana conocida.

Palabras clave: *Enterococcus*, queso ahumado andino, cultivo iniciador.

ABSTRACT

The objective of the present study was to isolate bacteria from the genus *Enterococcus* that were present in a sample of smoked Andean cheese. Fifteen strains belonging to the genus *Enterococcus* were isolated. Confirmatory tests were carried out

for this genus, ruling out eight strains that didn't fulfill the characteristics of the genus, and leaving seven that complied with the required characteristics. Of the strains selected, four were chosen as being amongst the best milk acidifiers, which also were compatible with strains of *Lactococcus* and *Lactobacillus*, isolated in a previous study, and again obtained from smoked Andean cheese. With the strains of *Enterococcus*, as well as with those of *Lactococcus* and *Lactobacillus*, different mixtures were prepared for use as starter in the manufacture of a smoked cheese produced with pasteurized milk, in order to obtain similar characteristics to the handmade cheese, but with the hygienic benefits of pasteurized milk and known bacterial flora.

Key words: *Enterococcus*, smoked andean cheese, starter.

INTRODUCCIÓN

El ahumado es una de las más antiguas técnicas de preservación de alimentos, habiéndose visto relegada a un segundo término por métodos de conservación más modernos. En la actualidad el proceso de ahumado de los alimentos tiene como principal objetivo proporcionar determinadas características organolépticas modificando parámetros como la textura, el color, olor y sabor.

El queso ahumado andino es elaborado artesanalmente en los páramos de los estados Mérida, Táchira y Trujillo de Los Andes Venezolanos. Este producto es fabricado siguiendo procedimientos tradicionales y surgió como una necesidad de conservar el queso por mayor período de tiempo.

El ahumado era una operación indirecta, como consecuencia del humo que se produce en el fuego que es usado para cocinar. De forma general, la cuajada una vez salada, es

colocada dentro de una malla de hojas de palma tejidas que funciona como molde, luego de 24 horas de desuerado se retira del molde y se coloca en una especie de repisas colgadas del techo por encima del lugar donde se cocina con leña. De esta forma los quesos están expuestos al humo entre 1 y 7 días, cada cierto tiempo se les da vuelta para lograr un ahumado uniforme.

Las características del queso ahumado andino son más o menos comunes entre todos y se pueden resaltar las siguientes: son de forma cilíndrica con caras planas, una altura de 6-8 centímetros y un diámetro de 15 a 20 centímetros. Su peso oscila entre 1 y 3 Kg. La corteza es dura, con marcas del molde, el color es homogéneo pardo oscuro y aroma a ahumado. La pasta homogénea, con un color variable que va desde el marfil hasta el amarillo pajizo. Puede presentar ojos (pequeños agujeros) de forma irregular en su mayoría. Posee un sabor marcado poca sal y con ligero retrogusto ahumado.

La alta demanda que presenta el queso ahumado andino a nivel nacional, la cual no es posible satisfacer con la elaboración artesanal, así como. el evitar los riesgos de consumir un producto elaborado con leche cruda y mínimas condiciones higiénicas hacen necesario identificar la flora autóctona de este tipo de queso para formular un cultivo iniciador que permita obtener un producto final con características organolépticas similares al producto artesanal pero seguro higiénicamente.

En lo referente al uso del humo líquido suprime los inconvenientes del ahumado tradicional, ya sean en el ámbito higiénico (benzopirenos, contaminación atmosférica), en el ámbito práctico (riesgos de incendio, equipos difíciles de limpiar debido a la presencia de alquitranes, volúmenes importantes de almacenamiento de aserrín o virutas) o en el ámbito económico (tiempos de ahumado muy importantes y costes de producción en ocasiones prohibitivos). Además, las irregularidades de coloración y las variaciones sensoriales han llevado a los industriales a buscar soluciones más fiables.

En un estudio anterior [1] se pudo determinar que en el queso ahumado andino estaban presentes cantidades importantes de enterobacteriaceas y de enterococos, sin embargo, el papel de estos últimos en las características organolépticas del queso no fue estudiado. Los *Enterococcus* son el grupo más controversial de las bacterias ácido lácticas (BAL). Pero como las especies más comunes de este género se pueden encontrar en el intestino de humanos y de animales domésticos, muchas veces su presencia en los alimentos se asocia con contaminación fecal [7, 11, 17], por tanto su presencia en los alimentos indica una pobre calidad bacteriológica y poca higiene durante la manufactura [13]. Su papel en el desarrollo del sabor en los quesos no es claro, mientras algunos investigadores creen que ellos son la causa del deterioro en el sabor [13, 19], otros consideran que contribuye con el mejoramiento organoléptico del producto final., debido a su capacidad proteolítica, lipolítica y de hidrolizar el citrato. [3, 16, 18, 20, 21].

La finalidad de la presente investigación fue aislar y caracterizar las bacterias del genero *Enterococcus presentes en un queso ahumado* andino para ser utilizadas conjuntamente con bacterias ácido lácticas como parte de un cultivo iniciador en la producción de un queso ahumado con leche pasteurizada y determinar si la presencia de estos microorganismos contribuyen a mejorar la calidad y características organolépticas del producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y conservación de cepas

Luego de analizar quesos de diversas zonas del estado Mérida, populares por su producción de queso ahumado artesanal, fue seleccionado el queso elaborado por un productor de la población de Pueblo Llano, por cumplir con la mayoría de las características establecidas para un queso de este tipo. De la parte central del queso se tomaron 10 g, se homogeneizaron en 99 ml de agua fisiológica estéril. Diluciones del homogeneizado se sembraron por duplicado en medios selectivos para bacterias ácido lácticas: agar MRS (Merck, Darmstadt, Alemania) para lactobacilos [9], agar Elliker (HiMedia Laboratories Munbay India) para lactococos [10], ambas muestras se incubaron por 48 h a 30°C. Los enterococos fueron aislados en agar *Streptococcus* KF [(HiMedia Laboratories Munbay India) [8], se incubó durante 48 horas a 37°C. Para el recuento de gérmenes viables mesófilos se utilizó agar PCA (HiMedia Laboratories Munbay India), incubándose por 72 h a 30°C.

Sólo las colonias provenientes del medio KF fueron sometidas a las pruebas fisiológicas confirmatorias del género, según el Manual Bergey [15]. Los enterococos se caracterizan por ser Gram-positivos, catalasa negativo, homofermentativos, crecen a 6,5% NaCl, a temperaturas de 10 a 45°C y a pH 9,6, igualmente hidrolizan esculina en presencia de 40% de bilis y sobreviven el calentamiento a 60°C por 30 min. Los aislados que cumplían estas características se cultivaron en caldo KF a 37°C durante 24 horas y luego se mantuvieron en refrigeración hasta su posterior uso.

Capacidad acidificadora

A las cepas aisladas se les determinó su capacidad acidificadora utilizando 100 ml de leche descremada y estéril UHT Mi vaca, los cuales fueron inoculados con 1,0 ml, de cada una de las cepas a evaluar, seguidamente se incubaron a 37°C y se siguió el descenso del pH cada hora.

Compatibilidad entre las cepas

Para elaborar un cultivo iniciador con las cepas de *Enterococcus* aisladas, estas se mezclaron con la cepa de *Lactococcus M6* y *Lactobacillus M2* pertenecientes a la colección de cepas del laboratorio de Biotecnología de Microorganismos de la Universidad de Los Andes, estado Mérida, Venezuela y provenientes de un queso ahumado andino [1]. Para determinar la

compatibilidad de las cepas escogidas se utilizó el método de difusión en agar [4], Partiendo de los aislados conservados en refrigeración, los cultivos fueron reactivados en caldo MRS para *Lactococcus* y caldo Elliker para *Lactobacillus* los *Enterococcus* fueron cultivados en caldo KF y todas fueron incubadas por 18 horas a 37°C, seguidamente se cultivaron durante 24 horas en las mismas condiciones y de seguida fueron sembradas en superficie en capsulas de Petri con agar MRS y agar KF respectivamente, luego de una preincubación de una hora a 37°C se perforaron pocillos en el agar de las placas con un perforador estéril y se llenaron con 50 µL del sobrenadante de las cepas a ensayar. Este sobrenadante provenía de un cultivo de la cepa a ensayar incubado a 37°C por 18 horas e inmediatamente centrifugado esterilmente a 5000 g por 10 minutos. Luego las cajas fueron incubadas por 24 horas a 37°C y se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición alrededor de los pocillos.

Preparación de los cultivos iniciadores

Para elaborar los cultivos iniciadores a ser empleados en la fabricación de los quesos, cada cepa se inoculó en leche estéril y se incubó durante 12 horas a 37°C y luego se prepararon las mezclas. Cada mezcla constaba de tres cepas distintas: una de *Enterococcus*, una de *Lactococcus* cepa M6 y otra de *Lactobacillus* cepa M2 mezcladas en un proporción 2:1:1 v/v, respectivamente. Se realizó otra mezcla con todas las cepas seleccionadas de *Enterococcus* y las cepas de *lactobacilo* y *lactococo*, para un total de cinco mezclas.

Elaboración de los quesos

En la elaboración del queso se siguió la metodología artesanal pero usando leche pasteurizada y añadiendo los cultivos iniciadores preparados como se describió en el punto anterior, haciendo uso de moldes plásticos y utilizando humo líquido para asegurar un ahumado homogéneo. Los pasos fueron los siguientes:

Pasteurización de la leche por calentamiento a 65°C durante 30 minutos seguida de enfriamiento rápido. Se añadió 20 g de CaCl₂ por cada 100 litros de leche. Cuando la leche alcanzó una temperatura de 35-37°C se añadió 2% v/v de cultivo iniciador (cada una de las mezclas de cepas). Se agregó la cantidad de cuajo Giber (Giber de Venezuela C.A) necesario para obtener la floculación en 20 minutos. Al transcurrir 40 minutos, la cuajada se cortó, se mezcló manualmente hasta obtener un tamaño de grano de 5 a 10 milímetros y se dejó reposar por 15 min. Luego la cuajada es retirada y colocada en un colador para drenar el suero. La cuajada fue amasada con sal en una proporción de 30 g/Kg. de cuajada. Finalmente se moldeó en recipientes cilíndricos de 6 pulgadas de diámetro, con volteos a los 15 min, 1 h y 3 h de haberse moldeado. El peso de cada uno de los quesos fue de 1kg. A las 18 horas se desmoldaron los quesos, se sumergieron en agua a 85°C durante un minuto. Se dejaron escurrir durante 12 h, luego de lo cual

fueron tratados con aroma natural de humo (Smokeze, 15171 IC, ADICON Industria y Comercio de Aditivos Ltda., Brasil) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente se conservaron a 4°C durante 10 días hasta la degustación.

Análisis sensorial

Se seleccionó un grupo de diez personas debidamente entrenadas para realizar el análisis sensorial, el panel de degustadores se escogió tomando en cuenta la capacidad de diferenciar sabores y determinando el umbral mínimo de sensibilidad ante gustos dulces, salados, ácidos y astringentes. El análisis sensorial se basó en una prueba de triángulo sencilla, a fin de poner en evidencia la existencia o no de diferencias entre los quesos experimentales y el artesanal [14]. Para realizar las pruebas, cada catador probó tres muestras de quesos, dos iguales y una distinta, que en este caso era el queso artesanal. El queso artesanal usado para la degustación fue el elaborado por el productor de donde se realizaron los aislamientos. De cada catador se obtiene la respuesta a la pregunta: ¿Cuál muestra es diferente a las otras dos? Posteriormente en una hoja adicional ofrecieron su percepción en cuanto a características organolépticas (sabor, textura, olor y color).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas

En este trabajo se aislaron aquellas bacterias consideradas como ácido lácticas por ser las de interés para crear cultivos iniciadores, el aislamiento se dirigió a detectar la presencia de *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* (TABLA I). El número de enterococos en el queso artesanal fue alto (TABLA I), en general, cuando en un producto lácteo se detectan enterococos se supone que las condiciones sanitarias empleadas en la fabricación del producto han sido inadecuadas [5]. Sin embargo, se ha demostrado que la presencia de *E. faecalis* en muchos productos alimenticios no siempre está relacionada con contaminación fecal [15].

Sin embargo, cada vez con más frecuencia y debido a sus propiedades, los enterococos se consideran apropiados para emplearse como co-cultivos iniciadores, incluso existen quesos en los que los enterococos son el único o el principal cultivo iniciador empleado en la fabricación [2, 8]. En muchos casos, el sabor propio y típico de algunos quesos se debe, no sólo a los cultivos tradicionales sino también a los *enterococos* introducidos accidentalmente en la fabricación.

En este estudio, como la población de colonias contadas en las placas de medios diferenciales para *lactobacilos*, *lactococos* y enterococos mostraron una proporción de 1:1:2 respectivamente, se resolvió que el co-cultivo del fermento iniciador a ser empleado en la elaboración de los quesos debería mantener esta proporción.

TABLA I
POBLACIÓN DE MICROORGANISMOS EN MUESTRA/ POPULATION OF MICROORGANISM IN CHEESE

Medio selectivo	Microorganismo a seleccionar	UFC/g muestra	Aspecto de la colonia
MRS	lactobacilos	$4,6 \times 10^5$	Lisa, cremosa, blanca (1-2 mm)
Elliker	lactococos	$4,0 \times 10^5$	Lisa, cremosa, blanca, (0,5-3 mm)
PCA	Gérmenes totales	10×10^6	Formas, colores y tamaños diversos
KF	enterococos	$7,0 \times 10^5$	Lisa, cremosa, color crema, (1-2 mm)

En el medio KF se aislaron 130 colonias, de las cuales se seleccionaron 15 al azar, ya que Chamba en 1994 [6] afirma que, tomando esta cantidad se garantiza el aislamiento del 95% de los microorganismos presentes en la muestra, y de esta forma, obtener una flora representativa de la población presente en la muestra inicial. Estas quince colonias se denominaron con la letra E y fueron numeradas desde el número 1 hasta el 15 de forma continua.

Al realizar las pruebas confirmatorias para identificarlas definitivamente como enterococos se descartaron 8 que no lograron crecer a 10°C o en presencia de 6,5% de Na Cl y se conservaron sólo 7 que fueron denominadas: E1, E2, E4, E5, E7, E11 y E14. Estos aislados resultaron positivos para las pruebas fisiológicas que caracterizan al género.

Caracterización de las cepas aisladas

Capacidad acidificadora

A las 7 cepas escogidas se les estudió la capacidad acidificadora en leche con el fin de observar alguna de sus cualidades como cultivo iniciador (FIG. 1). La cepa E11 acidificó la leche más rápido que las otras alcanzando un pH de 5,8 en ocho horas. Para esta cepa se observó coagulación de la leche en 24 horas, presentando un coagulo liso, homogéneo y con poco suero; en cuanto a E1, E2, E4, E5, E7 y E14, la acidificación fue más lenta. Estas cepas presentaron coagulación de la leche en 48 horas (resultados no mostrados), todas presentaron un coagulo liso, homogéneo y con poco suero, estos valores de tiempo de coagulación son parámetros útiles a nivel tecnológico.

La capacidad acidificadora de las cepas en leche, es la habilidad de producir ácido láctico a partir de la lactosa de la leche. Esta característica es una de las principales funciones de un cultivo iniciador, ya que participa en la coagulación, en las características organolépticas y también en la inhibición de microorganismos indeseables [12].

Las cepas de bacterias ácido lácticas pueden ser clasificadas en lentas o rápidas según su capacidad de crecer en leche a la temperatura de fabricación (21-30°C) [17]. Las cepas rápidas son capaces de coagular la leche en 24 horas y las cepas lentas en más de 48 horas. Otro criterio usado comercialmente indica que las cepas rápidas disminuyen el pH de la leche fresca a 5,8 durante un lapso menor a ocho horas. Obser-

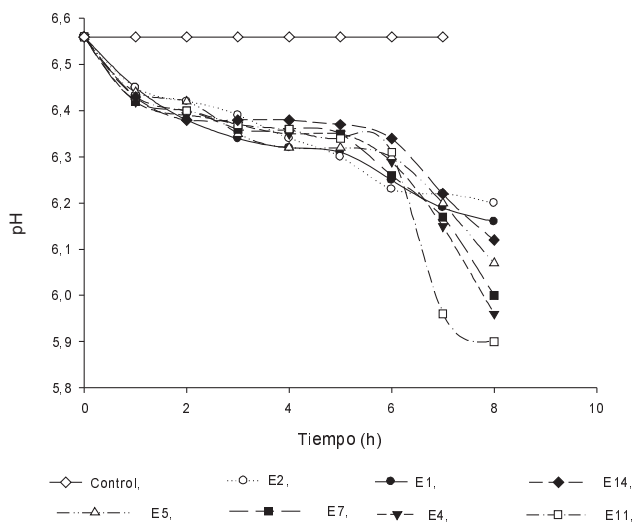


FIGURA 1. CURVA DE ACIDIFICACIÓN EN LECHE DE LAS CEPAS DE *Enterococcus*/ ACIDIFICATION CURVE IN MILK OF THE *Enterococcus* STRAINS.

vando el patrón de coagulación de las cepas probadas y los valores de acidez alcanzados se puede decir que son lentas excepto la cepa E11, que coaguló la leche en 24 horas.

Selección, compatibilidad y elaboración de mezclas de cepas

Las cepas E4, E5, E7 y E11, fueron seleccionadas por estar entre las mejores acidificadoras. Con ellas se realizaron pruebas de compatibilidad entre si y también con *Lactococcus* M6 y *Lactobacillus* M2 escogidas por ser buenas acidificadoras y por contribuir a producir un queso ahumado experimental equivalente al artesanal [1], todas las cepas fueron compatibles entre si. Con ellas se realizaron las mezclas para formar los cultivos iniciadores, se realizaron cinco mezclas distintas, cuatro formadas por cada una de las cepas de enterococo junto a las cepas M6 y M2 de lactococo y lactobacilo, en todos los casos cada mezcla posee un 50% de *Enterococcus* (E4, E5, E7, ó E11) y un 25% de *Lactococcus* (M6) y un 25% de *Lactobacillus* (M2). La quinta mezcla se realizó con el conjunto de las cuatro cepas de enterococos (12,5% de cada una de ellas para un total de 50%) y las de lactococo y lactobacilo en un 25% cada una (TABLA II).

TABLA II
MEZCLAS DE CEPAS UTILIZADAS EN LA ELABORACIÓN
DE LOS QUESOS EXPERIMENTALES/ MIXTURES
OF STRAINS USED IN THE ELABORATION
OF THE EXPERIMENTAL CHEESES

Mezcla	Cepas
1	EA+M6+M2
2	E5+M6+M2
3	E7+M6+M2
4	E11+M6+M2
5	E4+E5+E7+E11+M6+M2

Cepas: E4-E5-E7-E11= *Enterococcus*, M6= *Lactococcus*, M2= *Lactobacillus* Mezcla 5= 12,5% c/u de las cepas E4, E5, E7, E11 + 25% M6 + 25% M2.

Análisis sensorial

Con cada una de las mezclas se procedió a la fabricación de cinco tipos de quesos. Los quesos elaborados con las diversas mezclas y un queso artesanal del mismo origen del que se aislaron las muestras (control) fueron sometidos a degustación. Los catadores encontraron siete (7) aciertos en los quesos que se fabricaron con las cepas E4, E5 ó E7, en los fabricados con la cepa E11 encontraron nueve (9) y en los quesos fabricados con todas las cepas seleccionadas de *Enterococcus* también nueve (9) aciertos. Con el queso elaborado por el productor artesanal, todos los catadores detectaron la diferencia obteniendo diez (10) aciertos. Este resultado implica que los catadores identificaron correctamente los quesos elaborados con las cepas E4, E5 ó E7 con un nivel de confianza del 95% y con un 99% en los quesos en los que participa E11. Todos los catadores identificaron los quesos artesanales.

En los comentarios generales expresados por los panelistas en la hoja referente a características organolépticas, los quesos experimentales tuvieron una gran aceptación haciéndose allí comentarios sobre sus características tales como: textura, aroma y buen sabor. Entre las muestras que recibieron mejores comentarios se encontraban los realizados con la mezcla en la que participaba la cepa E11, desde ese punto de vista, esto los califica como muy buenos, incluso por encima del queso artesanal que no tuvo comentarios tan favorables.

En relación a la cepa E11 fue la más rápida acidificando la leche, y quizás esta característica hizo que los quesos elaborados con ella tuvieran una mejor aceptación, posiblemente por un contenido mayor de ácido láctico, lo que haría que tuviera un gusto y un aroma ligeramente diferente al resto. Evidentemente, el queso elaborado con la cepa E11 fue diferente y mejor al queso artesanal usado como fuente de las cepas y como patrón de comparación con los quesos experimentales. Es probable que los quesos experimentales hayan sido calificados como diferentes e incluso mejores al artesanal debido a que se fabricaron con leche pasteurizada, con la participa-

ción de cepas selectas y respetando una proporción en cuanto a las mezclas de los co-cultivos, no es de descartar que en la muestra control la proporción entre las cepas fuese diferente proporcionando características no del todo deseables, de igual manera los quesos artesanales debido a su forma de elaboración no presentan un producto similar para todas las manufacturas obteniéndose quesos diferentes de una fabricación a otra debido a las características de la materia prima y en particular de su calidad higiénica.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A partir de quesos artesanales Es posible obtener cepas apropiadas para su utilización como cultivos iniciadores. De las cuatro cepas seleccionadas, la cepa E11 fue la de mayor poder y velocidad de acidificación, lo que contribuyó a mejorar las características organolépticas del queso elaborado con leche pasteurizada.

Los quesos experimentales con cultivos iniciadores realizados en el laboratorio con las cepas aisladas a partir del queso artesanal, obtuvieron una gran aceptación en el grupo de degustación, demostrando que bajo condiciones higiénicas adecuadas se puede elaborar un queso utilizando enterococos como co-cultivo, logrando un producto con buen gusto y aceptación.

Se hace necesario establecer protocolos que permitan uniformizar todas las etapas del proceso de elaboración del queso ahumado andino, particularmente, en aquellas fases críticas como son el tratamiento de la leche, así como las etapas de elaboración que garanticen la seguridad del producto y su calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALVARADO, C. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso Ahumado Andino artesanal para su posterior uso como cultivo iniciador. Universidad de los Andes. Mérida Venezuela. Tesis de Licenciatura. 56 pp. 2000.
- [2] BOUBEKRI, K.; OTHA, Y. Identification of lactic acid bacteria from Algerian traditional cheese, El-Klila. *Sci. Food Agr.* 70: 501-505. 1996.
- [3] CENTENO, J. A.; MENÉNDEZ, S.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 307-313. 1996
- [4] COLLINS, C.; LYNE, P.; GRANZ, J. Antimicrobial susceptibility and assay test. En: *Microbial Methods*. 6th Ed. Butterworth-Heinemann, Oxford: 151-168 pp 1991.
- [5] CUESTA, E. Desarrollo de un cultivo iniciador para el queso artesanal "Afuega'l Pitu". Universidad de Oviedo, España. Tesis Doctoral. 84 pp. 1996.

- [6] CHAMBA, J. F.; DUONG, C.; FAZEL, A.; PROSA, F. Sélection des Souches de Bacterias Lactiques. En: **Bactéries Lactiques**, Vol. I. Loriga. 501-502 pp. 1994.
- [7] DELLAGLIO, F.; DE ROISSART, H.; TORRIANI, S.; CURK, M.C.; JANSSENS, D. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En: **Bactéries Lactiques**. Vol. I. Loriga. Chemin de Saint Georges. 62-63 pp. 1994.
- [8] DELLAGLIO, F.; DE ROISSART, H.; TORRIANI, S.; CURK, M.C.; JANSSENS, D. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En: **Bactéries Lactiques**. Vol. I. Loriga. Chemin de Saint Georges. 163 pp. 1994.
- [9] DE MAN, J.; SHARPE, M. A medium for the cultivation of Lactobacilli. **J. Appl. Bacteriol.** 23: 130-135. 1960.
- [10] ELLIKER, P.; ANDERSON, A.; HANNESSON, G. An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. **J. Dairy Sci.** 39: 1611-1612. 1956.
- [11] FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W.H.; STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of safety? **Int. J. Food Microbiol.** 71: 177-188. 1999.
- [12] KASHET, E. Bioenergetics of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS Microbiol. Rev.** 46: 223-244. 1987.
- [13] LÓPEZ-DÍAZ, T.M.; SANTOS, J.A.; GONZÁLES, C.J.; MORENO, B.; GARCÍA, M.L. Bacteriological quality of a traditional Spanish blue cheese. **Milchwiss.** 50: 503-504. 1995.
- [14] MACKEY, A.; FLORES, M.; SOSA, M. Evaluación sensorial de los alimentos. 2^{da} Ed.. Ediciones CIEPE. San Felipe. Venezuela. Serie Manuales. Nº 2. 44-53 pp.1984.
- [15] MUNDT, J.O. Enterococci. En: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore. 1063-1065 pp. 1986.
- [16] ORDOÑEZ, J.A.; BARNETO, R.; RAMOS, M. Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. **Milchwiss.** 33: 609-612. 1978.
- [17] REINHEIMER, J.A.; QUIBERONI, A.; TAILLEZ, P.; BINNETTI, A.G.; SUÁREZ, V.B. The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina for hard cheese production. **Int. Dairy J.** 6: 869-879. 1996.
- [18] GARQ, S.K.; MITAL, B.K. Enterococci. in milk products. **Crit Rev Microbiol** 18: 15-45. 1991.
- [19] THOMSON, T.L.; MARTH, E.H. Changes in parmesan cheese during ripening: microflora-coliforms, enterococci, anaerobes, propionibacteria and staphylococci. **Milchwiss.** 41: 201-205. 1986.
- [20] TROVATELLI, L.D.; SCHLIESSER, A. Identification and significance of enterococci in hard cheese made from raw cow and sheep milk. **Milchwiss.** 42: 717-719. 1987.
- [21] TSAKALIDOU, E.; MANOLOPOULOU, E.; TSILIBARI, V.; GEORGALAKI, M.; KALANTZOPOULOS, G. Esterolytic activities of *Enterococcus durans* and *Enterococcus faecium* strains from Greek cheese. **Neth. Milk Dairy J.** 47: 145-150. 1993.