

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL



**INTERFERENCIA DE LA PRESENCIA DE ERITROMICINA EN LA
LECHE DE CABRA SOBRE LA MICROBIOTA DEL QUESO DE
TRONCHÓN DURANTE LA MADURACIÓN**

TRABAJO FIN DE GRADO EN:

Grado en Ciencias y Tecnología de los Alimentos

ALUMNA: Lady Viviana Esteve Ambrosio

TUTORA: Dra. Salut Botella Grau

COTUTORA: Dra. M^a Pilar Molina Pons

Curso Académico: 2016-2017

Valencia, Junio de 2017



Este trabajo forma parte del proyecto “Trazabilidad de la presencia de antibióticos en leche, queso y lactosuero de cabra” (AGL2013-45147-R) financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad

INTERFERENCIA DE LA PRESENCIA DE ERITROMICINA EN LA LECHE DE CABRA SOBRE LA MICROBIOTA DEL QUESO DE TRONCHÓN DURANTE LA MADURACIÓN

RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto de la presencia de eritromicina en la leche de cabra sobre la microbiota, así como sobre los procesos de lipólisis y proteólisis que se desarrollan durante la maduración del queso Tronchón característico de la Comunidad Valenciana. Para realizar el estudio se efectuaron tres fabricaciones de queso siguiendo el proceso de elaboración tradicional, a partir de leche cruda de cabras Murciano-Granadinas sin antibiótico y con eritromicina, a una concentración equivalente al Límite Máximo de Residuos (LMR) de 40 µg/kg establecido por la legislación.

En el estudio se realizaron recuentos de microorganismos (aerobios mesófilos, estafilococos coagulasa positivos, lipolíticos y proteolíticos) en la leche y el queso de cabra, para ver el efecto del antibiótico sobre ellos. Al mismo tiempo, se verificó la ausencia de microorganismos patógenos (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*). También se determinaron los índices de lipólisis y proteólisis. Todas las determinaciones se efectuaron en tres momentos del periodo de maduración del queso (1, 30 y 60 días).

Las determinaciones microbiológicas mostraron que todas las muestras de leche de cabra y queso resultaron conformes con los requisitos establecidos por la normativa. Además, en general la eritromicina no influyó en la microbiota de la leche y del queso de cabra. De hecho, solo se presentó una disminución significativa en la población de aerobios mesófilos de la leche y en el índice de proteólisis del queso. Por el contrario sí se encontraron diferencias en todos los parámetros debidas al tiempo de maduración y también algunas variaciones entre las distintas fabricaciones, lo que indica la gran influencia del proceso artesanal de elaboración del queso de Tronchón a partir de leche cruda de cabra.

Finalmente, se debe señalar que la presencia de residuos de antibióticos, así como la presencia de determinados microorganismos en la leche, se puede evitar en gran medida mediante la aplicación de buenas prácticas ganaderas destinadas a asegurar que la leche proceda de animales sanos y se obtenga bajo condiciones adecuadas de higiene, lo que garantiza la seguridad de la leche de cabra y sus productos derivados.

Palabras clave: leche de cabra, eritromicina, queso, microbiota, proteólisis, lipólisis.

Alumna: Dña. Lady Viviana Esteve Ambrosio

Valencia, Junio de 2017

Tutora Académica: Dra. Salut Botella Grau

Cotutora: Dra. M^a Pilar Molina Pons

INTERFERENCE OF THE PRESENCE OF ERITROMYCIN IN GOAT MILK ON THE MICROBIOTE OF TRONCHÓN CHEESE DURING MATURATION

ABSTRACT

The objective of this study was to analyse the effect of the presence of erythromycin in goat's milk on the microbiota, as well as on the processes of lipolysis and proteolysis that develop during the ripening of Tronchón, cheese characteristic of Comunitat Valenciana. In order to carry out the study, cheese-making were carried out following the traditional process, in triplicate, using raw milk from Murciano-Grenadines without antibiotics and with erythromycin at a concentration equivalent to the Maximum Residue Limit (MRL) of 40 µg/kg established.

To do so, counts of microorganisms (aerobic mesophilic, staphylococci coagulase positive, lipolytic and proteolytic) were carried out on milk and goat cheese, to see the effect of the antibiotic on them. At the same time, the absence of pathogenic microorganisms (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) was verified. The rates of lipolysis and proteolysis were also determined. All determinations were made at three times during the cheese ripening period (1, 30 and 60 days).

Microbiological determinations showed that all samples of goat milk and cheese were in compliance with the requirements established by the regulations. In addition, erythromycin generally did not influence the microbiota in goat milk and cheese. In fact, there was only a significant decrease in the milk mesophilic aerobic population and in the cheese proteolysis index. On the other hand, differences were found in all the parameters due to ripening time and also some variations between different manufacturing, which indicate the great influence of the artisan process of elaboration of the Tronchón cheese from raw goat milk.

Finally, it should be noted that the presence of antibiotic residues, as well as the presence of certain microorganisms in milk, can be largely avoided by applying good animal husbandry practices to ensure that milk comes from healthy animals and is obtained under appropriate hygiene conditions, which guarantees the safety of goat's milk and its by-products.

Key words: goat's milk, erythromycin, cheese, microbiota, proteolysis, lipolysis.

Alumna: Dña. Lady Viviana Esteve Ambrosio

Valencia, Junio de 2017

Tutora Académica: Dra. Salut Botella Grau

Cotutora: Dra. M^a Pilar Molina Pons

INTERFERÈNCIA DE LA PRESENCIA DE ERITROMICINA A LA LLET DE CABRA SOBRE LA MICROBIOTA DEL FORMATGE DE TRONCHÓN DURANT LA MADURACIÓ

RESUM

L'objectiu d'este treball ha sigut estudiar l'efecte de la presència d'eritromicina en la llet de cabra sobre la microbiota, així com sobre els processos de lipólisis i proteólisis que es desenrotllen durant la maduració del formatge Tronchón característic de la Comunitat Valenciana. Per a realitzar l'estudi es van efectuar tres fabricacions de formatge seguint el procés d'elaboració tradicional, a partir de llet crua de cabres Murciano-Granadinas sense antibiòtic i amb eritromicina, a una concentració equivalent al Límit Máximo de Residus (LMR) de 40 µg/kg establert per la legislació.

En l'estudi es van realitzar recomptes de microorganismes (aerobis mesòfils, estafilococs coagulasa positius, lipolítics i proteolítics) en la llet i el formatge de cabra, per a veure l'efecte de l'antibiòtic sobre ells. Al mateix temps, es va verificar l'absència de microorganismes patògens (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*). També es van determinar els índexs de liplisis i protelisis. Totes les determinacions es van efectuar en tres moments del període de maduració del formatge (1, 30 i 60 dies).

Les determinacions microbiològiques van mostrar que totes les mostres de llet de cabra i formatge van resultar conformes amb els requisits establerts per la normativa. A més, en general l'eritromicina no influsc en la microbiota de la llet i del formatge de cabra. De fet, només es va presentar una disminució significativa en la població d'aerobis mesòfils de la llet i en l'índex de protelisis del formatge. Al contrari s es van trobar diferències en tots els paràmetres degudes al temps de maduració i també algunes variacions entre les distintes fabricacions, la qual cosa indica la gran influència del procés artesanal d'elaboració del formatge de Tronchón a partir de llet crua de cabra.

Finalment, s'ha d'assenyalar que la presència de residus d'antibiòtics, aix com la presència de determinats microorganismes en la llet, es pot evitar en gran manera per mitjà de l'aplicació de bones pràctiques ramaderes destinades a assegurar que la llet procedisca d'animals sans i s obtinguda baix condicions adequades d'higiene, la qual cosa garanteix la seguretat de la llet de cabra i els seus productes derivats.

Paraules clau: llet de cabra, eritromicina, formatge, microbiota, protelisis, liplisis.

Alumna: Da. Lady Viviana Esteve Ambrosio

Valencia, Junio de 2017

Tutora Acadmica: Dra. Salut Botella Grau

Cotutora: Dra. M Pilar Molina Pons

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer primeramente a Dios y a mi familia (FEA) por su apoyo incondicional, por aguantarme en mis mejores y peores momentos, por estar siempre a mi lado, animándome en este proceso y sobre todo por ser ellos los responsables de que hoy este aquí, realizando mi sueño.

También agradecerles a mis tutoras, Salut y Pilar, por darme la oportunidad de ser parte de este experimental, tenerme paciencia y ayudarme en mi aprendizaje, para ser una gran profesional. Por otra parte, también quisiera agradecerle la disposición y ayuda que me ha brindado Mari Carmen en gran parte de este proyecto.

Y finalmente quisiera agradecer a mis amigos Paloma y Roberto, que me han ayudado incondicionalmente en este trabajo y han hecho que mis días se hicieran más amenos.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. LOS QUESOS DE LECHE DE CABRA	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Calidad y características de los quesos de cabra	2
2. IMPORTANCIA DE LA MATERIA PRIMA SOBRE LA CALIDAD DEL QUESO	4
2.1. Calidad de la leche de cabra	4
2.2. Normas microbiológicas aplicables a la leche y los quesos de cabra	5
3. PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE Y LOS PRODUCTOS LÁCTEOS	7
3.1. Uso de antibióticos en cabras lecheras.....	7
3.2. Consecuencias de la presencia de antibióticos en la leche	9
II. OBJETIVOS	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	13
2. OBTENCIÓN DE LA LECHE Y ELABORACIÓN DE LOS QUESOS	13
2.1. Obtención y análisis de la leche de cabra	13
2.2. Elaboración queso curado de Tronchón	14
3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS DE LECHE Y QUESO DE CABRA	16
3.1. Determinación de microorganismos establecidos por la legislación	17
3.2. Detección de microorganismos no exigidos por la legislación como control de manipulación.....	18
3.3. Determinación de microorganismos lipolíticos y proteolíticos	19
4. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS DE LAS MUESTRAS DE QUESO DE CABRA	19
4.1. Índice de proteólisis.....	19
4.2. Índice de lipólisis	20
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS DE LECHE Y QUESO DE CABRA	22
1.1. Determinación de microorganismos establecidos por la legislación	22
1.2. Determinación de microorganismos lipolíticos y proteolíticos.....	27
2. ÍNDICES DE LIPÓLISIS Y PROTEÓLISIS DEL QUESO DE CABRA.....	31
V. CONCLUSIONES	33
IV. BIBLIOGRAFÍA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Queso de Tronchón con diferente periodo de maduración	2
Figura 2. Fórmula de la eritromicina	8
Figura 3. Diseño experimental del estudio sobre la interferencia de eritromicina en la leche de cabra sobre la microbiota del queso curado de Tronchón	13
Figura 4. Diagrama de flujo del proceso de elaboración del queso curado de Tronchón	15
Figura 5. Valoración de la acidez de la grasa	20
Figura 6. Recuento de aerobios mesófilos en leche cruda	22
Figura 7. Recuento de estafilococos coagulasa positivos en leche cruda.....	23
Figura 8. Recuento de aerobios mesófilos en queso.....	24
Figura 9. Recuento de estafilococos coagulasa positivos en queso	25
Figura 10. Recuento de estafilococos coagulasa positivos en el queso de cabra de las distintas fabricaciones según el tiempo de maduración.....	26
Figura 11. Recuento de microorganismos lipolíticos en leche cruda	27
Figura 12. Recuento de microorganismos proteolíticos en leche cruda	27
Figura 13. Recuento de microorganismos proteolíticos en la leche cruda de cabra con eritromicina y sin antibióticos según las fabricaciones	28
Figura 14. Recuento de microorganismos lipolíticos en queso	29
Figura 15. Recuento de microorganismos proteolíticos en queso	29
Figura 16. Recuento de microorganismos proteolíticos en el queso de cabra de las diferentes fabricaciones según el tiempo de maduración.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición físico-química (%) de diferentes quesos de cabra	3
Tabla 2. Composición de la leche de cabra según diferentes autores.....	4
Tabla 3. Normas microbiológicas aplicables a la leche y al queso de cabra	6
Tabla 4. Recuento de aerobios mesófilos en las muestras de leche de cabra.....	23
Tabla 5. Recuento de estafilococos coagulasa positivos en las muestras de leche de cabra	24
Tabla 6. Recuento de aerobios mesófilos en queso de cabra	24
Tabla 7. Recuento de estafilococos coagulasa positiva en queso de cabra.....	25
Tabla 8. Recuento de lipolíticos y proteolíticos en la leche de cabra	28
Tabla 9. Resultados de los recuentos de lipolíticos y proteolíticos en queso de cabra	29
Tabla 10. Resultados de los índices de lipólisis y proteólisis en queso de cabra	31

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

1. LOS QUESOS DE LECHE DE CABRA

1.1. Generalidades

En la actualidad, la tecnología aplicada para la fabricación de queso es extensa y muy variada, de hecho, existen catalogados en el mundo 1.200 tipos de quesos, pero se calcula que existen más de 3.000 quesos diferentes fabricados con leche de vaca, cabra, oveja, búfala y sus mezclas.

La legislación española (RD 1113/2006), define el queso como un producto fresco o maduro, sólido o semisólido, obtenido por la separación del suero después de la coagulación de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche.

En el caso de la leche de cabra según la FAO (FAOSTAT, 2017), en Europa en 2014, se localiza el 14,2 % de la producción (2,61 millones toneladas), especialmente en países como Francia (23 %), España (18 %) y Grecia (14 %). En España, la producción de leche de cabra ascendió a 418.098 toneladas en el año 2015 (MAGRAMA, 2015) siendo Andalucía la región con la mayor producción (42,5 %), seguida de Castilla la Mancha (19,4 %) y Murcia (13,7 %).

Por lo general, una parte importante de la leche de cabra (>90 %) se destina principalmente a su transformación en productos derivados, especialmente queso. A nivel mundial la fabricación de queso de cabra fue de 523.040 toneladas en el año 2014 (FAOSTAT, 2017). Europa, con el 35 %, representa una parte importante de la producción de queso de cabra del mundo, siendo Francia (44,2 %), Grecia (21,8 %) y España (18,3 %) los principales países europeos productores de este queso.

A lo largo de toda la geografía nacional se encuentran multitud de quesos elaborados a base de leche de vaca, cabra, oveja y sus mezclas. La elaboración de queso de cabra en España (33.625 toneladas en el año 2014) se localiza fundamentalmente en Andalucía, Murcia, Extremadura y en las Islas Canarias. Algunos de estos quesos se encuentran amparados por marcas de calidad: Denominaciones de Origen Protegidas (DOP), Indicaciones Geográficas protegidas (IGP), etc. Actualmente, en España, se elaboran 26 quesos con DOP, de los cuales 6 de ellos son únicamente de leche de cabra (Camerano, Murcia, Murcia al vino, Ibores,

Majorero y Palmero) y otros 5 de leche de mezcla entre la que se encuentra la leche de cabra (Guía, Gamoneu, Cabrales, Liébana y Picón Bejes-Tresviso).

En la Comunidad Valenciana se elaboran diferentes tipos de queso con leche de cabra (puro o de mezcla), entre los que destacan: Blanquet, Cassoleta, La Nucia, Servilleta y Tronchón. Estos cinco quesos se encuentran reglamentados para su distinción con la Marca de Calidad CV de acuerdo con la Orden 23 de diciembre de 2008, de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación.

El queso Tronchón es uno de los quesos más conocidos, es originario de la localidad aragonesa de Tronchón y se elabora fundamentalmente en la zona del Maestrazgo (Maestrat), que forma parte de tres Comunidades Autónomas (Aragón, Cataluña y la Comunidad Valenciana), más concretamente, en las provincias de Teruel, Tarragona y Castellón. Es un queso cilíndrico elaborado con leche de cabra y/u oveja, con las caras en forma de volcán donde tienen grabado un dibujo en forma de flor (Figura 1). La corteza es semidura, cerrada y su color oscila entre el blanco marfil y el marrón claro.



Figura 1. Queso de Tronchón con diferente periodo de maduración

1.2. Calidad y características de los quesos de cabra

La composición físico-química del queso está directamente relacionada con la de la leche de partida. Esto no significa que ambos tengan exactamente la misma composición. De hecho, en la cuajada recién formada algunos componentes ya han sufrido una transformación, como las proteínas que se agregan para formar la red tridimensional, o como la lactosa y de las proteínas del suero que se pierden con el suero en gran medida. Además, los parámetros de la composición físico-química del queso sufrirán aún más transformaciones a lo largo del proceso de maduración.

En la Tabla 1 se presentan los valores de la composición físico-química de distintos tipos de quesos elaborados con leche de cabra, donde se puede observar una gran variabilidad en los principales componentes del mismo, según diferentes autores.

Tabla 1. Composición físico-química (%) de diferentes quesos de cabra

Tipo de queso	Días maduración	Materia seca	Grasa	Proteína	Sal
Majorero	90	61	32	22	2,8
Mato	-	33	16	12	-
Cabra curado	45	62	34	25	1,3
Ibores	60	59	31	23	2,5
Servilleta ¹	-	38	18	14	-
Carioricotta	7	47	17	17	3,0

Fuente: Romero (2016)

La humedad de los quesos difiere considerablemente entre los distintos tipos, siendo mayor en los quesos frescos que presentan por tanto un mayor contenido en agua y un menor porcentaje de materia seca. La materia seca o extracto seco del queso está formado por todos los componentes sólidos incluyendo proteínas, materia grasa, vitaminas, minerales y azúcares.

Por otra parte, las diferencias en relación al contenido de grasa en los distintos tipos de queso pueden estar relacionadas con la composición de la leche (en particular de la relación proteína/grasa) y con el proceso de elaboración del queso. La grasa, además de ser el principal componente del queso, está muy relacionada con el aroma y sabor, ya que influye sobre él de forma directa. Los quesos elaborados con leche de cabra contienen un mayor porcentaje de ácidos grasos de cadena corta y media, que le confieren al queso sabores diferentes a los elaborados con la leche de vaca.

En cuanto al contenido en proteína resulta muy diferente según el tipo de queso siendo lógicamente más elevado en los quesos curados que en los frescos presentando además diferencias según la leche empleada como materia prima y el proceso de elaboración. También el contenido en sal es diferente dependiendo del producto obtenido.

Otros componentes presentes en el queso en menor medida son las vitaminas y minerales. El contenido en vitaminas hidrosolubles es variable en función de las pérdidas en el suero, mientras que las vitaminas liposolubles se incrementan debido al elevado contenido graso del queso.

2. IMPORTANCIA DE LA MATERIA PRIMA SOBRE LA CALIDAD DEL QUESO

2.1. Calidad de la leche de cabra

La composición química de la leche reviste una gran importancia en la calidad del queso, ya que determina su calidad nutritiva y muchas de sus propiedades. Así, la aptitud tecnológica de la leche para su transformación en queso depende, en gran medida, de su composición, especialmente de su contenido en grasa y proteína que presentan una estrecha relación con el rendimiento quesero.

En la Tabla 2 se presenta la composición química de la leche de distintas razas caprinas. Se observa una gran variabilidad entre los parámetros de composición, ya que estos pueden verse afectados por diferentes factores entre los que se encuentran la raza, estado de lactación, tipo de parto, edad del animal, reproducción, manejo alimentación y el estado sanitario, entre otros.

En la Tabla se presenta la composición de la leche de cabras Murciano-Granadinas que es una de las razas autóctonas más extendidas en España en especial en aquellas regiones de climas secos y cálidos. Esta raza tiene una producción láctea que oscila entre los 450 y 500 litros por ciclo de lactación y su composición, con un elevado porcentaje en grasa y proteína, la hace ideal para la elaboración de quesos (Durán, 2010).

Tabla 2. Composición de la leche de cabra según diferentes autores

Raza	Materia seca	Proteína	Lactosa	Grasa
Boer	-	4,97-5,03	4,48-4,97	6,13-6,39
Nguni	-	4,54-4,95	4,27-4,51	6,04-7,48
Griega	14,8	3,77	4,76	5,63
Nubian	13,2-14,6	3,90-4,50	-	4,40-4,50
Sarda	-	3,9	-	5,1
Canaria	13,64	4,82	-	3,87
Damascus	11,30-12,90	3,20-3,90	2,3-4,9	3,60-4,90
Granadina	13,57	3,48	4,11	5,23
India	12,33-13,66	3,21-4,09	4,19-4,88	3,54-4,54
Alpina	9,17	6,45	5,02	3,6
Granadina	14,67	3,72	4,66	5,61
Saanen	11,61	3,55	4,85	3,15
Rango	9,50-16,50	2,40-6,45	2,30-4,97	2,7-7,48

Fuente: Romero (2016)

En cuanto a la calidad higiénico-sanitaria de la leche de cabra que también puede tener un impacto en la calidad de los quesos, la legislación europea relativa a la higiene de los alimentos de origen animal destinados a la alimentación humana (Reglamentos CE nº 852, 853 y 854/2004) realiza una valoración de la calidad de la leche cruda en base a su contenido en

gérmenes totales, células somáticas y residuos de antibióticos, aunque en el caso de las células somáticas no existe límite establecido para la leche de oveja y cabra.

2.2. Normas microbiológicas aplicables a la leche y los quesos de cabra

Según la FAO/OMS (2017), el criterio microbiológico para un alimento define la aceptabilidad de un producto o lote del alimento, o de un proceso para producirlo, basada en la ausencia o presencia, o cantidad de microorganismos, y/o cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad o unidades de masa, volumen, superficie o lote.

Las normas o criterios microbiológicos para la leche y quesos de cabra vigentes en la Unión Europea, y por lo tanto en España, se establecen en el Reglamento (CE) 2073/2005 y en sus sucesivas modificaciones. En la Tabla 3 se resumen estos criterios para el caso de la leche cruda de otras especies diferentes a la vaca y también para el queso elaborado a partir de leche que no ha sido sometida a ningún tratamiento térmico. En el caso de la leche cruda de cabra, el límite máximo de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C permitido es de 5×10^5 ufc/mL. Mientras que para los quesos curados elaborados a partir de leche cruda la normativa indica que el límite máximo de estafilococos coagulasa positivos no debe superar 10^5 ufc/mL en 2 de cada 5 muestras analizadas. Además en el queso madurado se debe verificar la ausencia de los patógenos *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*.

Tabla 3. Normas microbiológicas aplicables a la leche y al queso de cabra

Alimento	Legislación/ Recomendación	Aerobios mesófilos	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Otros límites Comentarios
Leche cruda de otras especies (no vaca). Elaboración de productos lácteos sin tratamiento térmico	Reglamento CE 853/2004 modificado por Reglamento CE 1662/2006	Nº gérmenes a 30 °C: 5 x 10 ⁵ ufc/mL	NC	NC	Nº de gérmenes: media geométrica observada en un periodo de dos meses con dos muestras por lo menos al mes. Real Decreto 1338/2011
Queso a base de leche cruda	Reglamento 2073/2005 Modificado por Reglamento CE 1441/2007	NC	Estafilococo coagulasa positivo n=5, c=2, m=10 ⁴ , M=10 ⁵	<i>Salmonella</i> n=5 c=0, Ausencia en 25 g	Fase de aplicación de los criterios: Salmonella durante su vida útil. Estafilococos coagulasa positivos se aplica al final del proceso de fabricación, en el que se prevee que el número de <i>S. aureus</i> será el máximo. Si los valores son > 10 ⁵ pruebas para enterotoxinas estafilocócicas.
				<i>Listeria monocytogenes</i> n=5 c=0, Ausencia en 25 g	De aplicación solo si se considera que puede favorecer el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> y en la fase anterior a la que el alimento haya dejado el control inmediato de la empresa alimentaria que lo ha producido
				<i>Listeria monocytogenes</i> n=5 c=0 100 ufc/g	Fase de aplicación del criterio: Productos comercializados durante su vida útil

n: número de muestras de lote; c: número de muestras que pueden encontrarse entre m y M; m: criterio mínimo establecido; M: criterio máximo establecido

Algunos autores han estudiado la microbiota del queso de cabra elaborado a partir de leche cruda y sus cambios a lo largo del proceso de maduración. Así, Buffa et al. (2001) analizan los cambios microbiológicos durante el proceso de maduración de queso elaborado a partir de leche de cabra cruda, pasteurizada y tratada con altas presiones. Estos autores indicaron que la microbiota dominante son los lactobacilos y lactococos, siendo los recuentos de lactobacilos más elevados en los quesos de leche cruda que en aquellos elaborados a partir de leches tratadas, aumentando en todos los casos conforme transcurre el tiempo de curación.

A su vez, Picón et al. (2016) estudiaron la dinámica de la microbiota de quesos elaborados con leche cruda de cabra en dos provincias españolas (Cádiz y Málaga) en diferentes periodos del año (primavera y otoño) durante la maduración, estableciendo que el recuento de mesófilos disminuye con el tiempo, mientras que los lactobacilos y leuconostoc aumentan al final de la maduración y los enterococos permanecen constantes. También identifican 33 bacterias ácido-lácticas pertenecientes a ocho géneros diferentes con el fin de desarrollar fermentos específicos para los quesos de cabra. Otros autores como Ramírez-López y Vélez-Ruiz (2016) aislaron y caracterizaron 18 cepas autóctonas de bacterias en el queso fresco de cabra de tipo artesanal con el objetivo de seleccionar aquellas con características funcionales definidas para ser utilizadas como cultivos iniciadores en la producción de queso fresco.

3. PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN LA LECHE Y LOS PRODUCTOS LÁCTEOS

3.1. Uso de antibióticos en cabras lecheras

La utilización de medicamentos veterinarios a base de antibióticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas del ganado caprino lechero es una práctica generalizada que puede ocasionar la contaminación de la leche si no se toman medidas de protección adecuadas.

La mamitis es la principal causa de aplicación de terapia antimicrobiana en ganado caprino lechero y según un estudio realizado por Berruga et al. (2008) para el Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino (MARM), actualmente Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), sobre las posibles causas de residuos de antibióticos en leche de pequeños rumiantes, la mayor parte de los veterinarios (76,9 %) de caprino lechero tratan los casos de mamitis clínica utilizando mayoritariamente antibióticos betalactámicos (56,8 %) y macrólidos (18,3 %).

Desde el descubrimiento de la eritromicina (Figura 2) a principios de los años 50 a partir de un microorganismo del suelo, *Streptomyces erythreus*, han sido aislados y/o sintetizados numerosos macrólidos como la tilosina, tilmicosina y espiramicina, entre otros, que son

habitualmente utilizados para el tratamiento y prevención de mastitis y otras patologías de tipo respiratorio en caprino lechero (Berruga et al., 2008). La eritromicina es un antibiótico bacteriostático, de amplio espectro, sobre todo frente a bacterias gram positivas, y algunas gram negativas, Actinomicetos, Clamidas, Micoplasmas, Rickettsias y algunas Micobacterias. Este antibiótico atraviesa la barrera placentaria, y es eliminada en la leche materna. Su acción antibacteriana se basa en la unión de los antibióticos a la subunidad 50S ribosomal, inhibiendo la translocación del RNA de transferencia desde el punto aceptor del aminoácido lo que impide la formación del enlace peptídico y, por tanto, la síntesis de nuevas proteínas microbianas (Papich y Riviere, 2002).

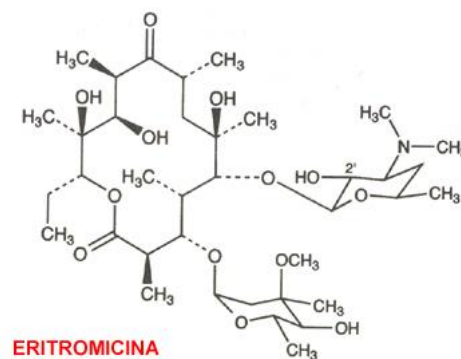


Figura 2. Fórmula de la eritromicina

Para controlar la presencia de los residuos veterinarios en los alimentos y proteger a la salud pública se establecen los Límites Máximos de Residuos (LMR). En el Reglamento (CE) 470/2009 se define el LMR como “la concentración máxima de residuo de una sustancia farmacológicamente activa (expresado en $\mu\text{g}/\text{kg}$ o g/kg sobre la base del peso en fresco) que puede permitirse en los alimentos de origen animal”. En el caso de la eritromicina el LMRs establecido por la legislación europea (Reglamento 37/2010/CE) para la leche de bóvidos, ovinos y caprinos es de $40 \mu\text{g}/\text{kg}$.

En el caso del ganado caprino lechero, la administración de antibióticos macrólidos se realiza en la mayoría de las ocasiones en forma de tratamientos “extra-label” o fuera de etiquetaje, ya que no existen presentaciones comerciales de estas sustancias autorizadas para su uso en pequeños rumiantes productores de leche. Esta utilización incrementa el riesgo de presencia de residuos de estos antibióticos en la leche de cabra, ya que no se conoce el tiempo de eliminación más adecuado.

3.2. Consecuencias de la presencia de antibióticos en la leche

La presencia de residuos de antibióticos, en la leche cruda destinada a la elaboración de productos lácteos para el consumo humano, puede tener repercusiones negativas en diferentes ámbitos como son el productor de leche, la salud pública y la industria láctea.

Productor de leche

La presencia de residuos en la leche puede llevar a la prohibición por parte de las autoridades sanitarias de la comercialización de la leche, al ser calificada como “no apta para consumo humano” por contener residuos de medicamentos según el Reglamento CE 853/2004 donde se establecen las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal, e incluso se puede llevar a cabo la sanción y/o cierre de la explotación productora (Directiva 96/23/CEE). La presencia de antibióticos en los alimentos, como la leche y el queso, representa un riesgo importante para la seguridad alimentaria, por lo que es necesario establecer un sistema de control.

Para establecer los controles de calidad en la leche cruda de oveja y cabra, así como para establecer los mecanismos de gestión de la trazabilidad y cumplir con la legislación comunitaria en cuanto a la trazabilidad de los alimentos (Reglamento CE 178/2002), se publicó el Real Decreto 752/2011 por el que se establecieron los controles obligatorios a realizar por los agentes del sector, entre los que se encontraba la detección de antibióticos. Así para la leche empleada como materia prima en quesería existe un protocolo para evitar la llegada al consumidor de residuos de antibióticos por encima del LMR, no estando establecidos estos límites ni un protocolo de control rutinario para productos lácteos derivados como es el caso del queso.

Salud pública

La presencia de antibióticos en la leche y sus productos derivados supone un riesgo para la salud pública ya que puede tener grandes consecuencias desde el punto de vista toxicológico, ocasionando alteraciones de la flora intestinal y reacciones alérgicas que pueden llegar a producir anafilaxia en los casos más extremos (Sanders et al., 2011).

Además, la presencia de antibióticos en los productos alimenticios puede ser la responsable del desarrollo de resistencias microbianas a sustancias farmacológicamente activas, contribuyendo a la propagación a lo largo de la cadena alimentaria (Trobos et al., 2009). Estas consecuencias son más graves en aquellos sectores de la población más débiles, como son los ancianos y los niños, ambos tradicionalmente consumidores de leche y productos lácteos.

Muchas de las sustancias farmacológicas presentes en la leche resisten las altas temperaturas, por lo que pueden llegar al consumidor aún después de haber sido sometidas a tratamientos térmicos en la industria láctea (Roca et al., 2010), lo que agrava el problema para la salud pública.

Industria láctea

La presencia de residuos de antimicrobianos en la leche también puede tener efectos de tipo tecnológico ya que puede afectar los procesos bacterianos requeridos en la elaboración de productos lácteos fermentados como el queso y el yogur.

Los residuos de antibióticos pueden inhibir la producción de ácido por las bacterias de arranque y afectar de manera significativa la elaboración de este tipo de productos, dando lugar a procesos de mala calidad, como la dificultad en el cuajado y la maduración (Berruga et al., 2007a, b), llegando incluso a inhibir completamente la fermentación en algunos casos (Grunwald y Petz, 2003) y a la interrupción de los tiempos de fabricación de queso.

En el proceso de elaboración de muchas variedades de queso, especialmente curados, es necesario el empleo de fermentos o estárteres constituidos generalmente por bacterias ácido-lácticas (LAB) que son en la mayoría de los casos, sensibles a las sustancias antimicrobianas, pudiendo inhibirse o verse alteradas por su presencia (Mourot y Lousouarn, 1981) afectando de este modo a la posterior maduración y por tanto, al desarrollo de componentes aromáticos.

Los daños tecnológicos que produce la presencia de estos residuos dependen de la naturaleza de los antibióticos, su concentración en la leche y del tipo de producto a fabricar. Goursand (1991) señala que la presencia de bajos niveles de antibióticos, en la leche utilizada para elaborar queso, puede ser la causa de defectos en el sabor, color, textura y la tendencia a la fermentación del ácido butírico.

Para profundizar en el estudio sobre la presencia de antibióticos en la leche y su efecto en la elaboración de quesos, se ha desarrollado en el Instituto de Ciencia y Tecnología de la Universitat Politècnica de Valencia el proyecto de investigación "Trazabilidad de la presencia de antibióticos en la leche, queso y lactosuero de cabra" (AGL2013-45147-R). En el ámbito de dicho proyecto Balerdi (2014) analizó el efecto de la enrofloxacin y ciprofloxacina presentes en la leche de cabra a una concentración equivalente a su LMR (100 µg/kg) sobre la elaboración de queso fresco señalando que una cantidad importante de ambas quinolonas (40 % a 45 %) queda retenida en la cuajada y, por tanto, en el queso. Calabuig (2015) utilizando también enrofloxacin y ciprofloxacina al LMR en la leche de cabra evaluó las características de quesos curados; concluyendo que los quesos del grupo control (sin antibiótico) diferían de

manera significativa con los quesos con antibiótico en la textura y color. A su vez Romero (2016) empleó leche de cabra con penicilina para la elaboración de queso de cabra curado no observando apenas efecto del antibiótico a una concentración equivalente al LMR.

Sin embargo, en ninguno de los estudios realizados hasta el momento se ha evaluado el efecto que puede tener la presencia de antibióticos en la leche sobre la microbiota de los quesos elaborados a partir de ella. Este aspecto resulta de interés, ya que determinados grupos de microorganismos son responsables, en gran medida, de los procesos de lipólisis y proteólisis que ocurren durante la maduración y que causan características específicas en los diferentes tipos de quesos.

Además, los estudios de evaluación del efecto de la presencia de sustancias antimicrobianas en la leche sobre el proceso de elaboración y características del queso de cabra, son muy limitados, lo que hacen que sean de gran importancia para la industria láctea y la seguridad alimentaria.

Objetivos

II. OBJETIVOS

La presencia de antibióticos en la leche puede suponer un riesgo para la Salud Pública, así como ser la causa de problemas tecnológicos tanto en la fabricación como en las características de los productos lácteos, como es el caso del queso, por lo que resulta de interés evaluar su impacto.

En el caso del ganado caprino, uno de los antibióticos más empleados con fines terapéuticos es la eritromicina, perteneciente al grupo de los macrólidos, en especial para el tratamiento de la mamitis. La información sobre la presencia de eritromicina en la leche y su efecto sobre la elaboración y las características del queso curado de cabra es muy limitada.

Por ello, el objetivo general de este estudio ha sido analizar el efecto de la presencia de eritromicina en la leche de cabra sobre la microbiota, así como sobre los procesos de lipólisis y proteólisis durante la maduración del queso de Tronchón, uno de los quesos más característicos de la Comunidad Valenciana.

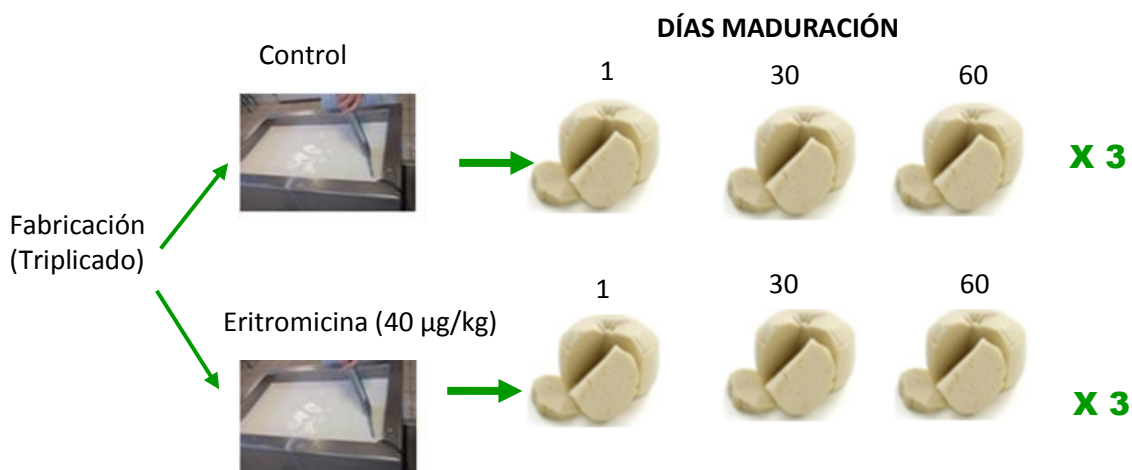
Con este trabajo se pretende aportar una mayor información sobre el efecto de la presencia de antibióticos, empleados en ganado caprino lechero, en la elaboración de productos lácteos.

Materiales y métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental empleado para el estudio del efecto de la presencia de eritromicina en la leche de cabra, sobre el proceso de elaboración y las características del queso curado se presenta en la Figura 3.



Análisis por triplicado:

1. Recuentos de aerobios mesófilos, estafilococos coagulasa positivos, proteolíticos y lipolíticos.
2. Detección de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*.
3. Índices de proteólisis (AAL) y lipólisis (AGL).

Figura 3. Diseño experimental del estudio sobre la interferencia de eritromicina en la leche de cabra sobre la microbiota del queso curado de Tronchón

Las fabricaciones de queso de Tronchón se realizaron por triplicado a partir de leche cruda de cabra. En cada una de ellas se elaboró un lote de quesos a partir de leche sin antibiótico (control) y otro con leche de cabra con eritromicina, a una concentración equivalente al LMR establecido por la Unión Europea (40 µg/kg). De cada lote se obtuvieron 9 quesos de tipo Tronchón, que se maduraron durante 60 días, realizando la toma de muestras para las diferentes determinaciones analíticas a diferentes tiempos (1, 30 y 60 días). Las determinaciones microbiológicas y bioquímicas efectuadas se enumeran en la Figura 3. Todos los análisis de las muestras de leche y queso se realizaron por duplicado.

2. OBTENCIÓN DE LA LECHE Y ELABORACIÓN DE LOS QUESOS

2.1. Obtención y análisis de la leche de cabra

La leche utilizada se obtuvo del rebaño de cabras de raza Murciano-Granadina de la granja experimental del Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de València (UPV).

Los animales se encontraban a mitad del período de lactación y su alimentación estaba constituida por una ración a base de concentrados (cebada y maíz), soja, pulpa de naranja y alfalfa, cubriendo las necesidades de dicho período. Los animales estaban sanos, además no habían sido tratados con antibióticos, ni habían recibido alimentación medicada, antes o durante el periodo del experimento.

La leche se recogió, tras el ordeño mecánico del tanque de refrigeración el mismo día de la elaboración del queso y se conservó refrigerada a 4 °C hasta su uso.

Para las fabricaciones a partir de leche con eritromicina (Sigma-Aldrich Química, S.A., España), se tuvo en cuenta la pureza del antibiótico (98,5 %) y se realizaron los cálculos oportunos para la correcta dosificación del mismo, preparando una disolución con agua a una concentración de 10^3 µg/kg en un matraz de 100 mL. Esta disolución se conservó en refrigeración (4 °C) hasta el momento de su adicción a la leche.

Antes de iniciar el proceso de elaboración del queso se adicionó a la leche (10-11 °C) el volumen de la disolución preparada anteriormente necesario para obtener una concentración de eritromicina equivalente a 40 µg/kg (LMR).

Las muestras de leche cruda de cabra se tomaron por duplicado de la leche empleada para cada una de las tres fabricaciones de queso, tanto muestras de leche sin antibiótico destinada a fabricaciones control como la leche con eritromicina. Las muestras de leche se mantuvieron en refrigeración hasta sus análisis microbiológicos

2.2. Elaboración queso curado de Tronchón

Los quesos se fabricaron en la Planta Piloto del Departamento de Ciencia Animal (UPV) siguiendo el proceso que se presenta en la Figura 4 que corresponde a la elaboración tradicional de queso de Tronchón.

La leche (50 L), una vez en la cuba se calentó hasta 10-11 °C, temperatura a la que se adicionó el antibiótico sólo en los quesos con eritromicina, para luego añadir el fermento láctico mesófilo (Choozit Cheese Cultures, Danisco, Francia) en una proporción de 1,78 g por cada 100 L. Se homogeneizó y se elevó la temperatura a 33-35 °C y se añadió el cloruro cálcico (Proquical, Proquiga, España) en una cantidad de 1 mL/8 L, manteniendo en agitación durante 1 minuto. Seguidamente se añadió cuajo animal (Fuerza 1:10.000, Laboratorios Arroyo, Santander, España) en una proporción recomendada por el fabricante de 0,6 mL/L, se agitó durante 30 segundos y posteriormente se dejó en reposo hasta producirse la coagulación (35-45 min).

Una vez obtenida la consistencia de la cuajada recomendada se procedió al corte con una lira manual hasta obtener un grano de 1x1x1 cm, el cual se trabajó manualmente (batido) durante al menos 1 hora. Cuando el grano presentó la dureza adecuada y un pH próximo a 6,45 se realizó el desuerado y posteriormente el moldeado del queso (moldes de queso Tronchón de 800 g).

Inmediatamente después del moldeado se pasaron los quesos a la prensa hidráulica dividiendo el prensado en tres fases: en la primera se empleó a una presión de 1,5 KPa durante 1,5 h, transcurrido ese tiempo se voltearon los quesos para introducirlos de nuevo en la prensa durante 1 hora y media a una presión de 2 KPa, pasado ese tiempo se voltearon de nuevo los quesos retirando el paño y elevando la presión a 2.5 KPa durante 15 minutos.

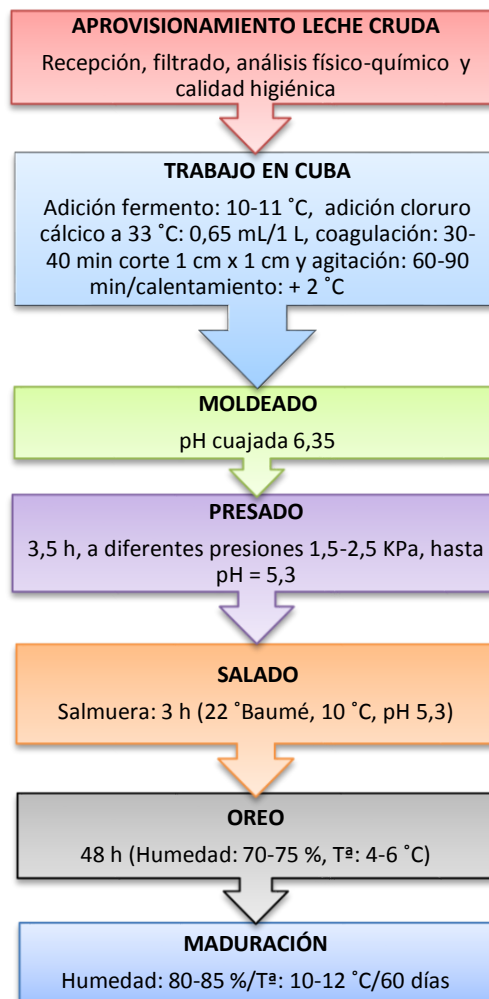


Figura 4. Diagrama de flujo del proceso de elaboración del queso curado de Tronchón

A continuación los quesos se salaron por inmersión en una salmuera, con una concentración de sal de 22 °B (grados Baumé) a 10 °C de temperatura durante 3 horas.

Después del salado los quesos se trasladaron a la cámara de oreo a 4 °C y 70 % humedad relativa durante 48 horas.

Una vez finalizado el oreo, los quesos se llevaron a la cámara de maduración donde permanecieron a 10-12 °C y 80-85 % de humedad relativa durante 60 días. Durante este periodo los quesos fueron volteados periódicamente.

Las muestras de queso se tomaron en diferentes momentos del período de maduración (1, 30 y 60 días). Todas las muestras de queso se envasaron al vacío con la identificación correspondiente (fecha de toma de la muestra, nº de lote y fecha de elaboración) y se mantuvieron en refrigeración para realizar posteriormente las diferentes determinaciones analíticas o en congelación (-80 °C) para la determinación del índice de proteólisis y lipólisis.

3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS DE LECHE Y QUESO DE CABRA

Se analizaron un total de 6 muestras de leche a partir de las cuales se elaboraron los quesos, 3 muestras de leche sin antibiótico y 3 muestras de leche con eritromicina. A partir de éstas se elaboraron los quesos y se realizaron los análisis microbiológicos a diferentes tiempos de maduración (1 día, 30 días y 60 días). En todos los casos los análisis se realizaron por duplicado.

Para todas las muestras de leche y queso de cabra se realizaron los análisis establecidos por la legislación vigente, tanto los criterios de higiene del proceso que valoran si el funcionamiento del proceso de producción es aceptable o no, como los criterios de seguridad alimentaria que definen la aceptabilidad de un producto comercializado. En la Tabla 3 de la Introducción se recogen los parámetros a analizar según estos criterios microbiológicos: recuento de colonias aerobias (especificado como criterio de higiene del proceso para Leche cruda para elaboración de queso sin tratamiento térmico), recuento de estafilococos coagulasa positivos (especificado como criterio de higiene del proceso para quesos a base de leche cruda), y detección de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* (especificado como criterio de seguridad alimentaria para quesos a base de leche cruda). En este trabajo se realizaron todas las determinaciones analíticas tanto en la leche cruda de cabra como en el queso, aunque no son parámetros exigidos en la legislación para ambos.

Se efectuaron determinaciones de la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en todas las muestras de leche y queso, para valorar la posible contaminación debida a la manipulación de las muestras.

También se realizaron recuentos de microorganismos lipolíticos y proteolíticos en todas las muestras para evaluar su relación con los índices de lipólisis y proteólisis de los quesos a lo largo de la maduración.

Las muestras de leche para los análisis microbiológicos se prepararon a partir de diluciones decimales seriadas en agua destilada estéril y para el análisis de los quesos se prepararon las muestras a partir de 25 g de queso en condiciones de asepsia, homogeneizadas con 225 mL de Agua de Peptona Tamponada (APT) (Ref. 02-277-500, Scharlau, Barcelona, España), excepto para *Listeria monocytogenes*, con Caldo Fraser (Ref. 02-496-500, Scharlau, Barcelona, España).

3.1. Determinación de microorganismos establecidos por la legislación

Recuento de aerobios mesófilos

El recuento de las colonias aerobias se realizó a partir de las muestras de leche cruda y queso según describe la norma UNE-EN ISO 4833-2 (2014). Para las muestras de leche se prepararon las diluciones decimales seriadas 10^{-1} - 10^{-4} y en el caso del queso se prepararon las diluciones 10^{-2} - 10^{-5} para tener en cuenta el aumento en los recuentos debidos a la adición del fermento en el proceso de elaboración del queso. Las diluciones se sembraron por duplicado y en superficie en medio Plate Count (Ref. 01-161-500, Scharlau, Barcelona, España), incubándose a 28-30 °C durante 72 h.

Recuento de estafilococos coagulasa positivos

El recuento de estafilococos coagulasa positivo se realizó a partir de las muestras de leche cruda y queso, siguiendo la norma UNE-EN ISO 6888-1/A1 (2004), en Agar Baird Parker (Ref. 01-030-500, Scharlau, Barcelona, España). Se prepararon las diluciones decimales seriadas en agua destilada estéril 10^{-1} - 10^{-2} para la muestra de leche y en el caso del queso se prepararon las diluciones 10^{-2} - 10^{-3} en agua destilada estéril a partir del APT. Las diluciones se sembraron por duplicado en superficie y se incubaron a 37 °C durante 48 h.

Detección de *Salmonella* spp.

La investigación de la presencia/ausencia de *Salmonella* spp. se realizó a partir de las muestras de leche cruda y queso. El método utilizado ha sido el descrito en la norma internacional UNE-EN ISO 6579 (2003).

El preenriquecimiento se preparó en APT, el enriquecimiento se preparó en caldo Base Tetrionato (Ref. 02-033, Scharlau) y Rappaport-Vassiliadis (Ref. 218581, BD), y el aislamiento en medios Agar XLD (Ref. 01-211-500 Scharlau) y Agar Cromógeno de *Salmonella* (Oxoid). Para

la identificación bioquímica de las colonias sospechosas rojas en XLD y púrpura en el cromógeno, gram negativas, catalasas positivas, se realizaron pruebas IMVIC, TSI, y se utilizaron las baterías miniaturizadas API 20E (Biomerieux).

Detección de *Listeria monocytogenes*

La investigación de la presencia/ausencia de *L. monocytogenes* se realizó a partir de las muestras de leche cruda y queso. El método utilizado ha sido el descrito en la norma internacional UNE-EN ISO 11290-1:1997/A1 (2005).

El preenriquecimiento y el enriquecimiento se realizaron en caldo Fraser preparado según el protocolo normalizado. El aislamiento se hizo en Agar Aloa (Cromógeno para *Listeria*, Oxoid, Hampshire, Reino Unido) y Agar Base Palcam (Ref. 01-470-500, Scharlau). Para la identificación bioquímica se utilizaron las baterías miniaturizadas APIListeria (Biomerieux) para las colonias sospechosas grisáceas y con el centro hundido en Agar Palcam y las colonias azules en Agar Aloa, gram positivas, catalasas positivas y beta-hemolíticas en agar sangre.

3.2. Detección de microorganismos no exigidos por la legislación como control de manipulación

Detección de *Escherichia coli*

La investigación de la presencia/ausencia de *Escherichia coli* se realizó a partir de las muestras de leche cruda y queso. La metodología ha sido la utilizada en el Laboratorio de Microbiología de la ETSIAMN, elaborada a partir de varias normas internacionales UNE-EN-ISO para la investigación de *Escherichia coli*. El preenriquecimiento se preparó en APT, el enriquecimiento se realizó en Caldo Verde Brillante (Merck) y el aislamiento en Agar TBX (Ref. 01-619-500 Scharlau) y Agar ENDO (Ref. 01-589-500 Scharlau). Para la identificación de las colonias sospechosas azules en TBX y rojas con brillo verde metálico en ENDO, gram negativas y catalasa positivas, se realizaron pruebas IMVIC y se utilizaron las baterías miniaturizadas API 20E (Biomerieux).

Detección de *Staphylococcus aureus*

La investigación de la presencia/ausencia de *Staphylococcus aureus* se realizó a partir de las muestras de leche cruda y queso. El método utilizado se ha basado en el descrito en la norma internacional UNE-EN ISO 6888-3:2003/AC (2003). El preenriquecimiento se preparó en APT, el enriquecimiento se preparó en Caldo Giolitti-Cantoni (Ref. 02-230-500, Scharlau) y el aislamiento en medio Agar Base Baird Parker (Ref. 01-030-500 Scharlau).

Para la identificación bioquímica de las colonias sospechosas negras y elevadas, gram positivas, catalasas positivas, DNasa positivas y hemolíticas en agar sangre, se utilizaron las baterías miniaturizadas APIStaph (Biomerieux).

3.3. Determinación de microorganismos lipolíticos y proteolíticos

El recuento de microorganismos lipolíticos se realizó según la metodología descrita en la norma UNE-EN ISO 4833-2 (2014), en medio para lipolíticos descrito por Harrigan y McCance (1979). Para la obtención de 1 L de medio de cultivo se utilizaron 10 g de peptona bacteriológica (BD, New Jersey, Estados Unidos), 10 mL de Tween 80, 15 g de agar-agar (Scharlau, Barcelona, España), 0,1 g de cloruro cálcico, 5 g de cloruro sódico (PanReac, Castellar del Vallès, España), 1000 mL de agua destilada. Una vez realizada la mezcla se mezcló y se autoclavó a 115 °C durante 20 minutos. Se realizaron diluciones decimales seriadas en agua destilada estéril (10^{-2} - 10^{-4}) para la muestra de leche y a partir del APT en las muestras de queso, y se sembraron por duplicado en el medio descrito anteriormente y se incubaron 30 °C durante 72 h.

Para el recuento de proteolíticos se siguió el procedimiento descrito en la norma UNE-EN ISO 4833-2 (2014), en medio para proteolíticos descrito por Harrigan y McCance (1979). En este caso para la obtención de 1 L de medio de cultivo se mezclaron, en condiciones estériles, 500 mL de medio de cultivo Plate Count (Scharlau, Barcelona, España) a doble concentración, autoclavado a 115 °C durante 20 minutos con 500 mL de una dilución de leche en polvo desnatada (Central Lechera Asturiana, Gijón, España), al 4 % concentración final (pesada en doble concentración) autoclavada a 115 °C durante 20 minutos. La incubación una vez sembrada la muestra y solidificado el medio se efectuó a 37 °C durante 24 h.

4. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS DE LAS MUESTRAS DE QUESO DE CABRA

4.1. Índice de proteólisis

El índice o grado de proteólisis en el queso (determinación de ácidos grasos libres) se analizó siguiendo el método Cadmio-Ninhidrina descrito por Folkertsma y Fox (1992). Las muestras de queso se descongelaron 24 horas antes del análisis. El método consistió en dos fases, en la primera fase se obtiene la fracción nitrogenada soluble (FSA) y en la segunda fase se valoraron los aminoácidos libres.

Así, para obtener la FSA se pesaron 30 g en un matraz al cual se adicionaron 70 mL de agua destilada. La mezcla se homogenizó durante 5 minutos a 5000 rpm (Ultraturrax T25, Jankel & Kunkel, Alemania) y posteriormente se introdujo en un baño de agua a 40 °C durante una hora. Transcurrido este tiempo, se centrifugó la mezcla a 7000 rpm durante 30 minutos a

una temperatura de 10 °C. El sobrenadante obtenido tras el centrifugado de las muestras se filtró con ayuda de lana de vidrio.

Una muestra de FSA entre 70-100 µL se diluyó hasta 1 mL con agua destilada y se añadieron 2 mL del reactivo cadmio-ninhidrina (0,8 g de ninhidrina disuelto en 80 mL de etanol (99,5%) y 10 mL de ácido acético, para completar el reactivo se adicionó la mezcla de un 1 g de cloruro de cadmio con 1 mL de agua destilada) en tubos de ensayo.

Esta mezcla se calentó a 84 °C durante 5 min y se enfrió para valorar los aminoácidos libres totales, que se basa en la reacción colorimétrica que tiene lugar entre la ninhidrina y los grupos α -amino que se encuentran en la FSA para formar un cromóforo violáceo. La lectura de la absorbancia se determinó a 507 nm mediante un espectrofotómetro (Thermo scientific; Evolution 201, Madrid, España). El análisis de diferentes soluciones de leucina de 0,015 hasta 0,06 mg permite calcular la recta patrón. Los resultados se calcularon a partir de la recta patrón expresando los resultados en mg de leucina /g de queso.

4.2. Índice de lipólisis

El índice de lipólisis (contenido en ácidos grasos libres, AGL) se realizó siguiendo la metodología descrita por Núñez et al. (1986) sobre las muestras de queso congeladas a -80 °C para todos los tiempos de maduración (descongeladas 24 horas antes).

Para ello se homogeneizaron 10 g de queso con 6 g de Na_2SO_4 anhidro. El contenido se vertió en botes de 250 mL y se añadieron 60 mL de éter de petróleo, manteniendo la mezcla en agitación durante dos horas para realizar la extracción de los AGLs. A continuación, se filtró la dilución en un matraz previamente tarado. Posteriormente, se colocó el matraz en el rotavapor (RV 10 D S99, IKA®, Alemania), donde se destiló el éter a 40 °C durante 15 minutos (Figura 5).



Figura 5. Valoración de la acidez de la grasa

Seguidamente el matraz con el extracto lipídico se dejó durante 30 minutos en una campana de extracción de gases para su completa evaporación. Trascorrido ese tiempo, se volvió a pesar el matraz y por diferencia de pesada se obtuvieron los gramos de grasa total.

Para el cálculo del índice de lipólisis se procedió a la valoración de la grasa mediante KOH 0,1 M y fenolftaleína hasta el completo viraje (Figura 5). Los análisis se realizaron por duplicado.

La concentración de Ácidos Grasos Libres (AGL) se expresa como meq/100 g de grasa mediante la siguiente fórmula: $\text{Meq/ 100 g grasa} = \text{KOH (mL)} \times 0,1 / \text{grasa total (g)} \times 100$.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante el programa Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA Multifactorial) para todas las variables estudiadas, considerando el factor tiempo de maduración, el factor concentración de antibiótico y el factor fabricación, así como la interacción entre ellos según el siguiente modelo.

$$Y_{ijk} = \mu + TM_i + PA_j + F_k + (TM_i \times PA_j) + \epsilon_{ijk}$$

Siendo: Y_{ijk} = variable dependiente; μ = media general; TM_i = tiempo de maduración ($i = 1, 30$ y 60); PA_j = presencia de antibiótico ($j =$ sin antibiótico y con antibiótico al LMR); $TM_i \times PA_j$ = interacción; ϵ_{ijk} = error residual.

Resultados y discusión

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS DE LECHE Y QUESO DE CABRA

1.1. Determinación de microorganismos establecidos por la legislación

Según los criterios microbiológicos para la leche cruda de cabra (Reglamento CE 2073/2005; 853/2004 modificado por R.CE 1662/2006 DOUE 18.11.2006), se requiere exclusivamente el recuento de aerobios mesófilos con un valor máximo permitido de 5×10^5 ufc/mL. Para los quesos elaborados a partir de leche que no ha sido sometida a ningún tratamiento térmico, la normativa (Reglamento CE 2073/2005 modificado por R.CE 1441/2007) indica que el recuento de estafilococos coagulasa positivos no debe superar un valor máximo permitido de 10^5 ufc/g. También en el caso del queso se debe cumplir el requisito de ausencia de patógenos, como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*.

En este estudio se planteó analizar todos los parámetros para la leche cruda y los quesos elaborados en las tres fabricaciones. Tras analizar todas las muestras, se confirmó que cumplen la normativa establecida.

En la Figura 6 se observa el resultado del recuento de las colonias aerobias a partir de las muestras de leche cruda según describe la norma UNE-EN ISO 4833-2 (2014).

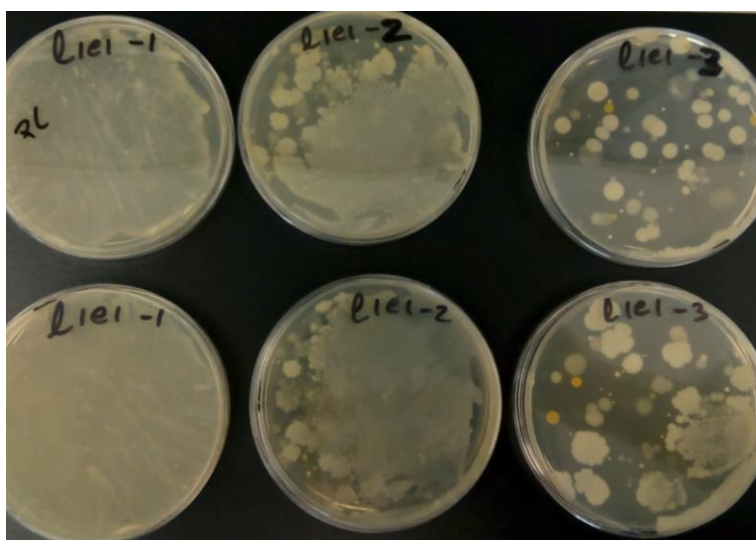


Figura 6. Recuento de aerobios mesófilos en leche cruda

Los resultados de los recuentos de las poblaciones de aerobios mesófilos en leche de cabra se recogen en la Tabla 4. Desde el punto de vista estadístico, la presencia de antibiótico al LMR presenta un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la población de aerobios mesófilos en la leche de cabra, con valores menores en la leche con eritromicina. También se obtuvieron diferencias en las leches utilizadas para las diversas fabricaciones de queso de cabra, siendo la

leche de la fabricación 1, la que presenta mayor población de aerobios mesófilos respecto a las otras fabricaciones.

La interacción resulto significativa entre la concentración y la fabricación, dado que la leche empleada en la fabricación 1, presenta mayor número de aerobios mesófilos en la leche sin antibiótico, existiendo una diferencia notable entre la fabricación 1 y la 3.

Tabla 4. Recuento de aerobios mesófilos en las muestras de leche de cabra

Leche	Eritromicina ($\mu\text{g/Kg}$)			Fabricación			
	0	40	ES	1	2	3	ES
Aerobios mesófilos (log ufc/mL)	4,64 ^a	4,44 ^b	0,03	4,87 ^a	4,56 ^b	4,21 ^c	0,04

ES: error estándar, a, b, c: letras distintas en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p\text{-valor} < 0.05$).

En la Figura 7 se observa el resultado del recuento de estafilococos coagulasa positivo realizado a partir de las muestras de leche cruda, siguiendo la norma UNE-EN ISO 6888-1/A1 (2004).

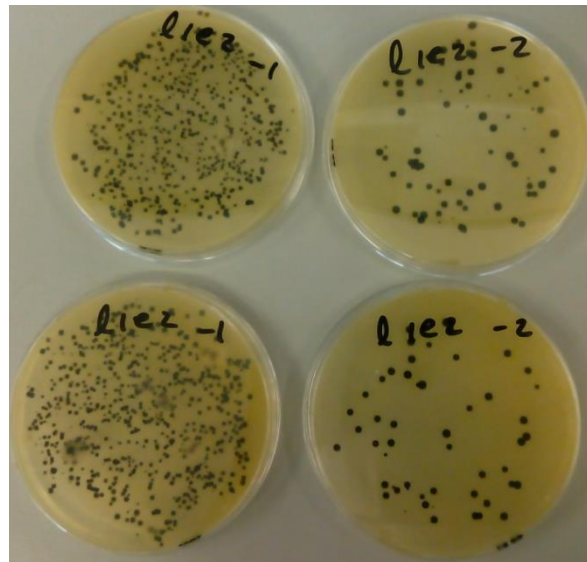


Figura 7. Recuento de estafilococos coagulasa positivos en leche cruda

En el recuento de la población de estafilococos coagulasa positivo en leche de cabra, no se encontró ningún efecto de la presencia de eritromicina al LMR, como se observa en la Tabla 5. Sin embargo, la leche de las tres fabricaciones resultaron diferentes, sobre todo la fabricación 3, donde se obtuvo valores más altos de estafilococos que en las otras dos fabricaciones. Además ninguna de las interacciones entre los factores estudiados resultó estadísticamente significativa.

Tabla 5. Recuento de estafilococos coagulasa positivos en las muestras de leche de cabra

Leche	Eritromicina ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)			Fabricación			
	0	40	ES	1	2	3	ES
Estafilococos coagulasa positivos (log ufc/mL)	3,85	3,83	0,01	3,87 ^a	3,7 ^b	3,94 ^c	0,01

ES: error estándar, a, b, c: letras distintas en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0.05).

En la Figura 8 se observa el recuento de las colonias aerobias mesófilas a partir de las muestras de queso, realizado según describe la norma UNE-EN ISO 4833-2 (2014).

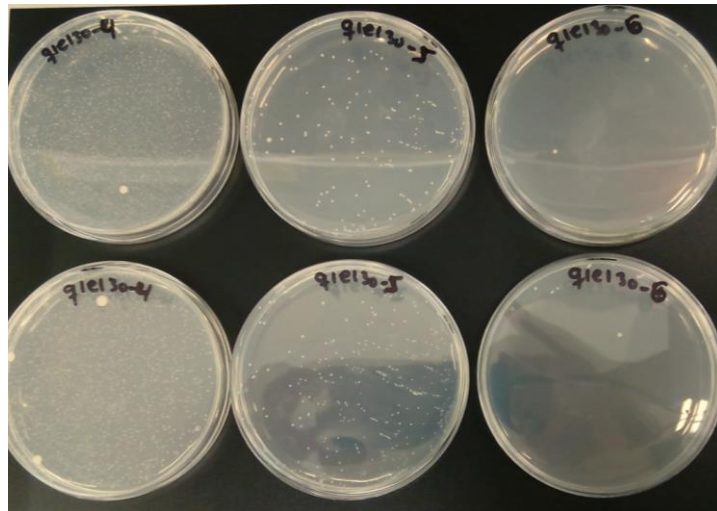


Figura 8. Recuento de aerobios mesófilos en queso

En la Tabla 6 se detallan los resultados de los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos en el queso de cabra. No se observa diferencia en el número de microorganismos con la presencia de eritromicina, pero si debida al proceso de la maduración disminuyendo la población de estos microorganismos con el tiempo. Las fabricaciones resultaron también diferentes entre sí y la interacción entre fabricación-maduración resulto significativa. La fabricación 3 presenta valores más elevados a los de las fabricaciones 1 y 2.

Tabla 6. Recuento de aerobios mesófilos en queso de cabra

Queso	Eritromicina ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)			Maduración (días)				Fabricación			
	0	40	ES	0	30	60	ES	1	2	3	ES
Aerobios mesófilos (log ufc/g)	7,30	7,26	0,02	7,56 ^a	7,24 ^b	7,03 ^c	0,02	7,10 ^a	7,20 ^b	7,46 ^c	0,02

ES: error estándar, a, b, c: letras distintas en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0.05).

Los resultados encontrados son similares a los obtenidos por Psoni et al. (2002) y Litopoulou-Tzanetaki (1992) con valores comprendidos entre 6-8 unidades logarítmicas. Estos

dos estudios tratan de la microbiota hallada también en quesos elaborados a partir de leche de cabra durante el proceso de elaboración y la maduración.

En la Figura 9 se presenta las placas correspondientes al recuento de estafilococos coagulasa positivo realizado a partir de las muestras de queso, siguiendo la norma UNE-EN ISO 6888-1/A1 (2004).

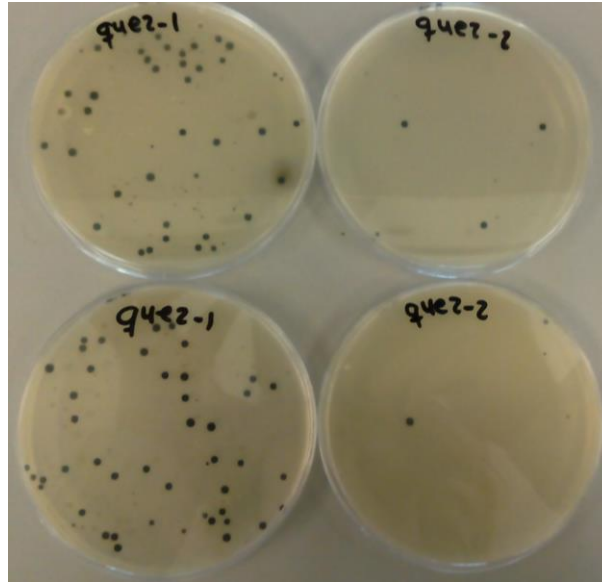


Figura 9. Recuento de estafilococos coagulasa positivos en queso

En el queso de cabra la población de estafilococos coagulasa positivo (Tabla 7), no resultó afectada por la presencia de eritromicina ($p > 0,05$). Sin embargo, sí hubo diferencias entre los quesos en los diversos tiempos de maduración y en las distintas fabricaciones. En la maduración, el queso fresco presenta valores superiores respecto a los dos meses siguientes de curación. Además en la fabricación 3 se obtuvieron valores mayores en comparación a las otras dos fabricaciones.

Tabla 7. Recuento de estafilococos coagulasa positiva en queso de cabra

Queso	Eritromicina ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)			Maduración (días)				Fabricación			
	0	40	ES	0	30	60	ES	1	2	3	ES
Estafilococos coagulasa positivos (log ufc/g)	3,43	3,36	0,02	3,57 ^a	3,28 ^b	3,33 ^b	0,03	3,41 ^a	3,20 ^b	3,58 ^c	0,03

ES: error estándar, a, b, c: letras distintas en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p\text{-valor} < 0.05$).

Litopoulou-Tzanetaki (1992) indicó valores comprendidos entre 2-5 unidades logarítmicas que fueron en general superiores a los obtenidos en el presente estudio.

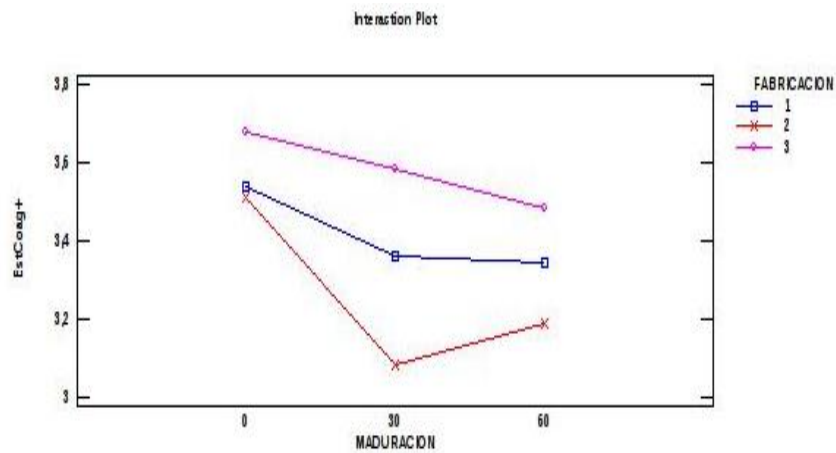


Figura 10. Recuento de estafilococos coagulasa positivos en el queso de cabra de las distintas fabricaciones según el tiempo de maduración

Como se observa en la Figura 10, tras el análisis estadístico, resultaron significativas dos interacciones, concentración-fabricación y maduración-fabricación. La primera interacción resulto significativa debido a que existe una gran diferencia de población de estafilococos entre las fabricaciones 2 y 3, con valores más altos de estos microorganismos en la fabricación 3. En la segunda interacción los valores obtenidos en la fabricación 2 al mes de curación, son bastante bajos en comparación con las fabricaciones 1 y 3.

El criterio de seguridad alimentaria para el queso fabricado a partir de leche cruda especifica que se debe verificar la ausencia de *Salmonella* spp. y de *Listeria monocytogenes*. En este trabajo se confirmó la ausencia de ambos microorganismos tanto en leche cruda como en los quesos elaborados a partir de ésta, en presencia de eritromicina y sin el antibiótico.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio realizado por Trigueros (2016), que determino la ausencia de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en 36 muestras de queso, con presencia de enrofloxacin, otro antibiótico perteneciente a la familia de las quinolonas.

En cuanto a la investigación de la presencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* como controles de manipulación, los resultados obtenidos confirman su ausencia en todas las muestras. Los resultados de ambos microorganismos coinciden con los obtenidos por Duran et al. (2010) en un trabajo sobre caracterización fisicoquímica y microbiológica de quesos de cabra de San José de los Ranchos, en Venezuela.

1.2. Determinación de microorganismos lipolíticos y proteolíticos

Los recuentos de microorganismos lipolíticos y proteolíticos se realizaron en la leche cruda, de cabra según la metodología descrita en la norma UNE-EN ISO 4833-2 (2014), en los medios descritos por Harrigan y McCance (1979). Las Figuras 11 y 12 muestran dos de estos recuentos.

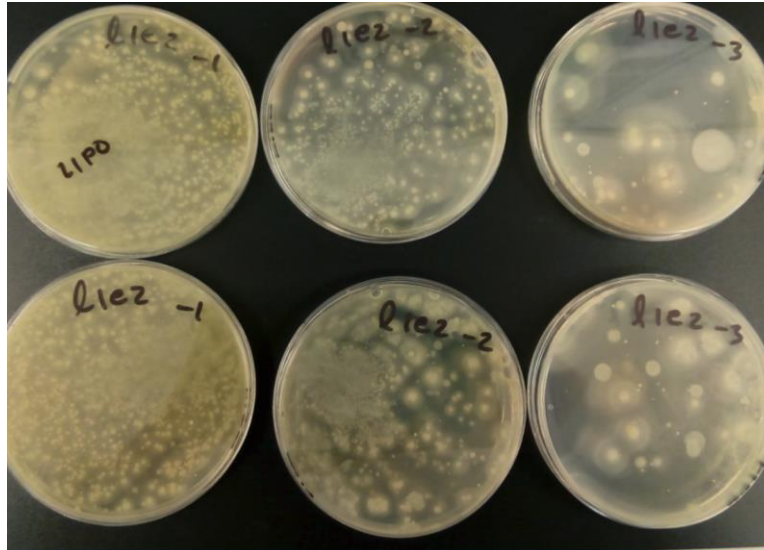


Figura 11. Recuento de microorganismos lipolíticos en leche cruda

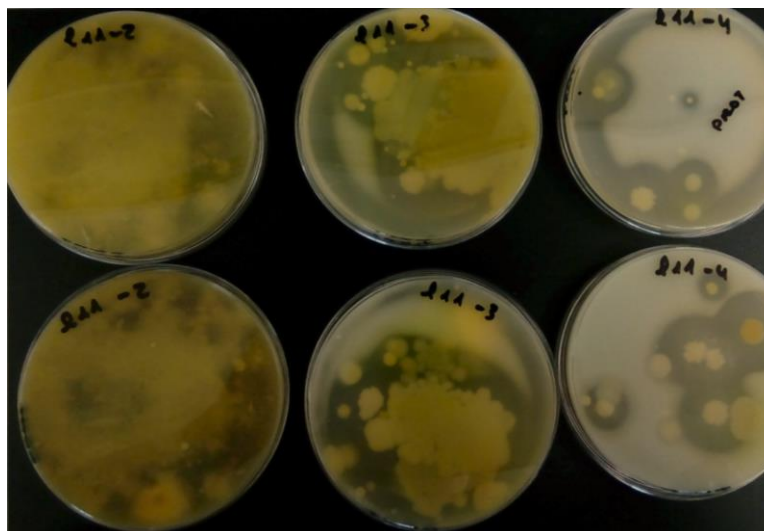


Figura 12. Recuento de microorganismos proteolíticos en leche cruda

Los resultados de los recuentos de microorganismos en leche de cabra con acción lipolítica y proteolítica, se presentan en la Tabla 8 de acuerdo a los factores de variación estudiados. En dicha tabla se observa que no hubo influencia del antibiótico sobre la población de microorganismos con acción lipolítica.

Sin embargo, la leche de las tres fabricaciones estadísticamente resulta diferente, con valores más altos en la fabricación 1. Por el contrario no resultó significativa ninguna de las interacciones estudiadas.

Los microorganismos con acción proteolítica en la leche de cabra tampoco se vieron afectados por la presencia de la eritromicina. En cambio, entre las distintas fabricaciones la población de proteolíticos resulta diferente, con mayor número de microorganismos en la fabricación 1. La interacción entre la concentración y la fabricación resultó significativa y los valores se presentan en la Figura 13 en donde se observa que en la leche sin antibiótico de la fabricación 2 y 3, el número de población de proteolíticos disminuye de forma más marcada que en la leche con eritromicina.

Tabla 8. Recuento de lipolíticos y proteolíticos en la leche de cabra

Leche	Eritromicina (µg/Kg)			Fabricación			
	0	40	ES	1	2	3	ES
Lipolíticos (log ufc/mL)	4,14	4,07	0,08	4,51 ^a	4,08 ^b	3,71 ^c	0,1
Proteolíticos (log ufc/mL)	4,27	4,22	0,04	4,92 ^a	4,13 ^b	3,68 ^c	0,05

ES: error estándar, **a, b, c**: letras distintas en una misma fila indican diferencia estadísticamente significativa (p-valor < 0.05).

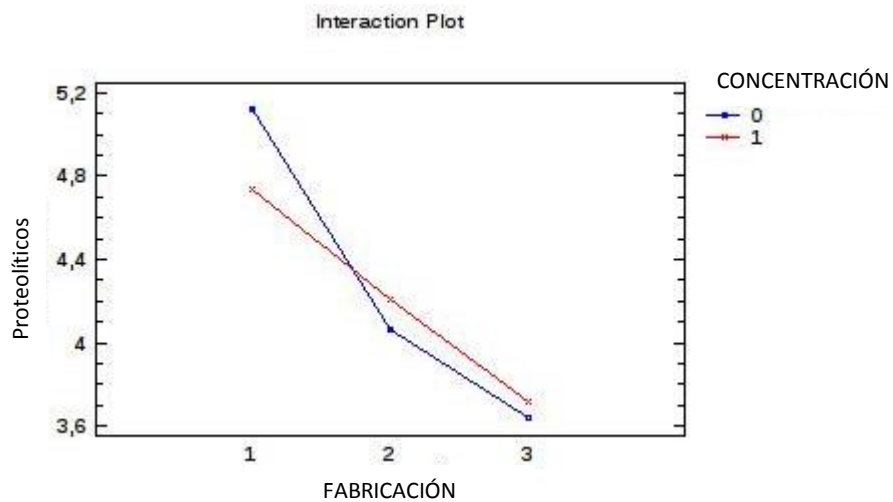


Figura 13. Recuento de microorganismos proteolíticos en la leche cruda de cabra con eritromicina y sin antibióticos según las fabricaciones

Trigueros (2016) en un estudio sobre leche de cabra indicó resultados similares a los del presente trabajo con valores comprendidos entre 2-4 unidades logarítmicas.

También los recuentos de microorganismos lipolíticos y proteolíticos se realizaron en queso, según la metodología descrita en la norma UNE-EN ISO 4833-2 (2014), en los medios descritos por Harrigan y McCance (1979). Las Figuras 14 y 15 muestran dos de estos recuentos.

En cuanto a los recuentos de microorganismos en queso de cabra con acción lipolítica y proteolítica, se presentan en la Tabla 9 de acuerdo a los factores de variación estudiados.

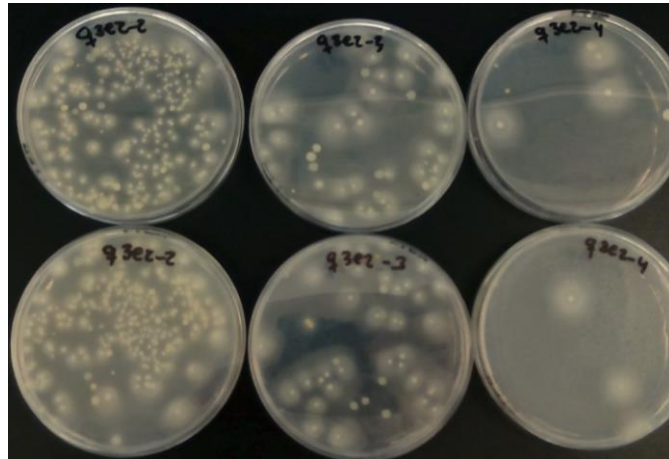


Figura 14. Recuento de microorganismos lipolíticos en queso

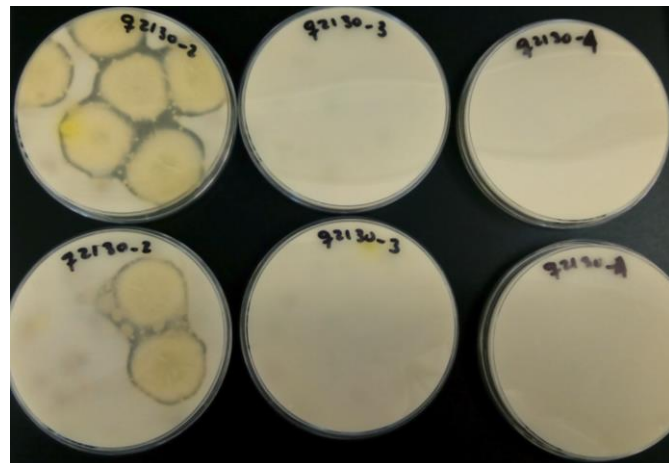


Figura 15. Recuento de microorganismos proteolíticos en queso

Tabla 9. Resultados de los recuentos de lipolíticos y proteolíticos en queso de cabra

Queso	Eritromicina (µg/Kg)			Maduración (días)				Fabricación			
	0	40	ES	0	30	60	ES	1	2	3	ES
Lipolíticos (log ufc/g)	3,88	3,73	0,08	4,41 ^a	3,59 ^b	3,42 ^b	0,09	3,76 ^{ab}	4,00 ^a	3,65 ^b	0,09
Proteolíticos (log ufc /g)	3,48	3,52	0,06	3,79 ^a	3,41 ^b	3,31 ^b	0,08	3,50 ^a	3,21 ^b	3,80 ^c	0,06

ES: error estándar, a, b, c: letras distintas en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (p< 0.05).

No hubo influencia del antibiótico sobre la población de microorganismos con acción lipolítica en el queso de cabra. Sin embargo, el tiempo de maduración sí que influyó sobre los recuentos siendo el queso fresco (0 días) el que presenta valores más elevados, disminuyendo los microorganismos lipolíticos a medida que transcurre el periodo de curación. Las diferencias entre las fabricaciones solo resultaron estadísticamente significativas entre la 2 y 3 presentando la fabricación 1 recuentos intermedios. En cuanto a las interacciones entre los factores ninguna resultó estadísticamente significativa.

En todos los casos los resultados son inferiores a los señalados por Litopoulou-Tzanetaki (1992) que presentaba valores para este tipo de microorganismos comprendidos entre 5-7 unidades logarítmicas.

A su vez los microorganismos con acción proteolítica en el queso de cabra no se vieron afectados por la presencia de la eritromicina. Por el contrario el efecto del tiempo de maduración sí que resultó significativo con un recuento de microorganismos proteolíticos diferente en el queso recién elaborado que los analizados a 30 y 60 días de maduración que resultan similares desde el punto de vista estadístico. En cambio, en las fabricaciones la población de proteolíticos resulta diferente, con mayor número e inferiores al del queso fresco. Las diferencias entre recuentos de las distintas fabricaciones también resultaron diferentes estadísticamente con valores superiores en la fabricación 3. En este caso la interacción entre la maduración y fabricación resultó significativa (Figura 16).

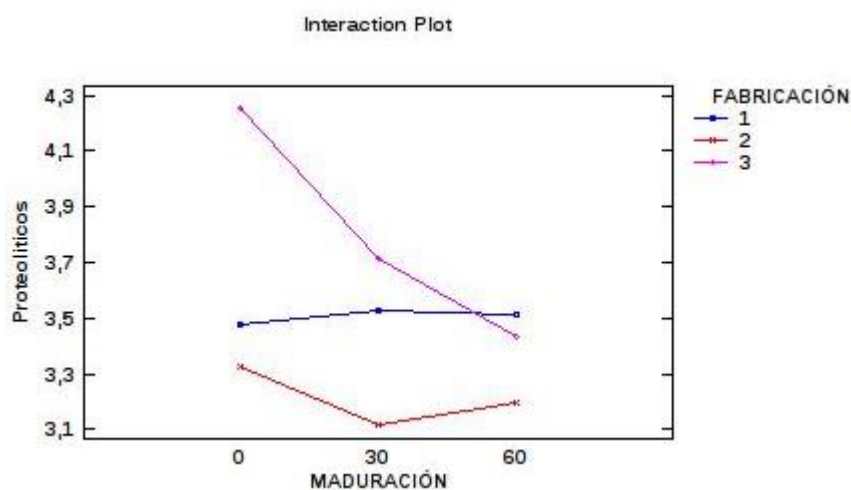


Figura 16. Recuento de microorganismos proteolíticos en el queso de cabra de las diferentes fabricaciones según el tiempo de maduración

La interacción entre maduración y fabricación (Figura 16) resultó significativa debido a que en la fabricación 3 del queso fresco, se obtuvieron valores elevados respecto a las fabricaciones 1 y 2. Sin embargo, hubo poca variabilidad a tiempo 30 y 60 días de curación en las fabricaciones 1 y 2.

En este caso, los resultados encontrados también son inferiores a los obtenidos por Litopoulou-Tzanetaki (1992) que señalaba recuentos comprendidos entre 6-7,5 unidades logarítmicas.

2. ÍNDICES DE LIPÓLISIS Y PROTEÓLISIS DEL QUESO DE CABRA

Los resultados de los índices de lipólisis y proteólisis en el queso de cabra, se presentan en la Tabla 10 de acuerdo a los factores de variación estudiados. La presencia del LMR de eritromicina en el queso de cabra no presentó ninguna influencia sobre los valores de lipólisis. Por el contrario el contenido de ácidos grasos libres aumento con el tiempo de maduración siendo el contenido en ácidos grasos libres (AGL) superior en el primer y segundo mes de maduración que en el queso recién elaborado y diferentes significativamente entre todos ellos. También el índice de lipólisis resulto diferente significativamente entre la primera y tercera fabricación respecto a la segunda donde el índice resulto inferior que en las otras. En cuanto a las interacciones entre los factores no resultaron significativas sobre el índice de lipólisis.

Tabla 10. Resultados de los índices de lipólisis y proteólisis en queso de cabra

Queso	Eritromicina ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)			Maduración (días)				Fabricación			
	0	40	ES	0	30	60	ES	1	2	3	ES
Índice de lipólisis (meq /100 g grasa)	2,87	2,83	0,18	1,95 ^a	2,98 ^b	3,61 ^c	0,22	3,22 ^a	1,96 ^b	3,36 ^a	0,11
Índice de proteólisis (mg leucina/g queso)	2,24 ^a	2,15 ^b	0,03	0,68 ^a	2,27 ^b	3,64 ^c	0,03	2,18 ^a	2,07 ^b	2,32 ^c	0,03

ES: error estándar, a, b, c: letras distintas en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En cuanto al índice de proteólisis la presencia del LMR de eritromicina en el queso de cabra si que presento un efecto significativo sobre el contenido de aminoácidos libres siendo menor en el queso elaborado con leche con eritromicina que en el fabricado a partir de leche de cabra sin antibiótico. También el tiempo de maduración influyó significativamente sobre este índice que aumento entre los tres tiempos con diferencias significativas entre todos ellos Además las tres fabricaciones resultaron diferentes estadísticamente, con valores mayores en aminoácidos libres en la fabricación 3.

Además el análisis estadístico mostró que la interacción entre la concentración y el tiempo de maduración resultaba significativa, ya que los quesos de cabra con y sin antibiótico presentaron índices de proteólisis diferentes según el tiempo de maduración.

Los resultados sobre el índice de lipólisis de este estudio son similares a los obtenidos por Rivera et al. (2016), también en el queso de Tronchón elaborado con leche cruda de cabra. Mientras que los resultados relativos al índice de proteólisis son mayores a los obtenidos por Rivera et al. (2016) y Romero, (2016), este último estudio abordaba el efecto de la presencia de la penicilina G, antibiótico perteneciente a la familia de betalactámicos en la leche de cabra y queso Tronchón curado de cabra.

Conclusiones

V. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la presencia de eritromicina a una concentración equivalente a LMR en la leche de cabra no afecta a la microbiota de manera general, excepto al recuento de aerobios mesófilos que fue menor en la leche con antibiótico. En cuanto al queso elaborado a partir de leche de cabra con eritromicina, solamente el índice de proteólisis fue menor en los quesos sin antibiótico, lo que indica un efecto muy reducido del antibiótico.

Por el contrario el tiempo de maduración sí que influyó sobre los diferentes recuentos de microorganismos así como también sobre los índices de lipólisis y proteólisis, además se encontraron diferencias en algunos parámetros entre las diferentes fabricaciones. Todo ello señala la gran influencia del proceso de elaboración, por su marcado carácter artesanal, del queso de Tronchón a partir de leche cruda de cabra.

Por otro lado, en todas las muestras de leche y queso de cabra analizadas, no se detectó la presencia de microorganismos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. que exige la legislación como criterios de seguridad alimentaria. Tampoco se detectó *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, lo que indica un proceso de obtención de la leche y elaboración del queso correcto, desde el punto de vista higiénico-sanitario.

Dado que la presencia de antibióticos en el queso puede constituir un problema para la salud pública y su presencia depende de muchos factores, además de la propia naturaleza del antibiótico y del proceso de elaboración, resulta conveniente continuar con el estudio del comportamiento de la presencia de otros antibióticos empleados en el ganado caprino en la leche y en su posterior transformación en queso.

Bibliografía

VI. BIBLIOGRAFÍA

- BALERDI J. 2014. Presencia de quinolonas en queso fresco de cabra. Trabajo Fin de Carrera. ETSIAMN. Universitat Politècnica de Valencia, España.
- BELTRÁN, M.C. 2016. Uso "extra-label" de antibióticos macrólidos en ganado caprino lechero detección de residuos en la leche y el queso de cabra. Trabajo Fin de Grado, ETSIAMN. Universitat Politècnica de Valencia, España.
- BERRUGA M. I., BATTACONE G., MOLINA M. P., ROMAN M., MOLINA A. 2007b. Influence of beta-lactams on Manchego cheese manufacture. 148. 5th International Symposium on the challenge to sheep and goats milk sectors. International Dairy Federation, Alghero, Italia.
- BERRUGA, M.I., LOZOYA, S., RUBIO, R., CASTRO N., MOLINA, A. 2008. Estudio sobre las posibles causas de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche de ovino y caprino. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. 102 pp.
- BERRUGA M. I., MOLINA M. P., NOVES B., ROMAN M., MOLINA A. 2007a. In vitro study about the effect of several penicillins during the fermentation of yogurt made from ewe's milk. *Milchwissenschaft*, 62: 303-305.
- BUFFA, M.N., TRUJILLO, A.J., PAVIA, M. & GUAMIS, B. 2001. Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *Int. Dairy J.*, 11: 927-934.
- CALABUIG, M. 2015. Efecto de la presencia de quinolonas en la leche de cabra sobre las características del queso curado. Trabajo Fin de Carrera. ETSIAMN. Universitat Politècnica de Valencia, España.
- DURAN, L., SÁNCHEZ, C., PALMERO, J., CHAPARRO, L., GARCÍA, T., SÁNCHEZ, E. 2010. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de quesos de cabra en Carora, estado Lara, Venezuela. *Zootécnia Trop.*, 28: 467-475.
- FAO 2017. Producción y productos lácteos. Pequeños rumiantes. Consultado el 11 de abril del 2017. <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/produccion-lechera/animales-lecheros/pequenos-rumiantes/es/>
- FOLKERTSMA B., FOX P. F. 1992. Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *J. Dairy Res.*, 59: 217-224.
- GOURSAND L. 1991. Composición y propiedades físico-químicas. In *Leche y productos lácteos: vaca-oveja-cabra*. Ed. Acribia, Zaragoza. 1-92.
- GRUNDWALD L., PETZ M. 2003. Food processing effects on residues: penicillins in milk and yogurt. *Anal. Chim. Acta*, 483: 73-79
- HARRIGAN, W.F., MCCANCE, M.E. 1979. Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. Ed. Academia. 420 pp.
- LITOPOULOU-TZANETAKI E., TZANETAKIS N., 1992. Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food Microb.*, 9: 13-19.
- MAGRAMA 2015. Leche de oveja y de cabra. <http://origin.magrama.gob.es>. Consultado 15 marzo 2017.
- MOUROT D., LOUSSOUARN S., 1981. Sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire. *Rec. Med. Vét.*, 157: 175-177

- Norma UNE-EN ISO 4833-2. 2014. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 2: Recuento de colonias a 30 °C mediante la técnica de siembra en superficies. AENOR. Madrid.
- Norma UNE-EN ISO 6579. 2003. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. ISO 6579:2002. AENOR, Madrid.
- Norma AENOR. UNE-EN ISO 6888-1. 2004. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa-positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Parte 1: Técnica que utiliza el medio agar de Baird-Parker. Modificación 1: Incorporación de los datos de precisión. AENOR, Madrid.
- Norma AENOR. UNE-EN ISO 6888-3. 2003. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa-positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Parte 3: Detección y técnica NMP para números bajos. AENOR, Madrid.
- Norma UNE-EN ISO 11290-1. 2005. Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. Modificación 1: Modificación del medio de aislamiento y de la prueba de la hemólisis e inclusión de los datos de precisión. ISO 11290-1:1996/AM1:2004. AENOR, Madrid.
- NÚÑEZ, M., GARCÍA ASER, C., RODRÍGUEZ MARTIN, M.A., MEDINA, M., GAYA, P. 1986. The effect of ripening and cooking temperatures on proteolysis and lipolysis in Manchego cheese. Food Chem., 21: 115-123.
- ORDEN 2008, de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, por la que publica la reglamentación de calidad del queso de cassoleta, queso blanquet, queso de la Nucia o de pastel, queso de servilleta y queso tronchón, para su distinción con la marca de CV. DOCV 5924: 93919-93923.
- PAPICH M., RIVIERE J. 2002. Fluoroquinolonas. En: Farmacología y terapéutica veterinaria. 2 ed. Editorial Acribia. Zaragoza. 961-980.
- PICON A., GARDE S., AVILA M., NÚÑEZ, M. 2016. Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses. Int. Dairy J., 58: 14-22.
- PSONI L., TZANETAKIS N., LITPOULOU-TZANETAKI E., 2002. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. Food Microb., 20: 575-582.
- RAMÍREZ-LÓPEZ C., VÉLEZ-RUIZ J.F. 2016. Isolation, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat milk and fresh artisanal-goat cheese. Inf. Technol., 27:115-117.
- REAL DECRETO 1113/2006, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. BOE, 239: 34717- 34720.
- REAL DECRETO 752/2011, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los agentes del sector de leche cruda de oveja y cabra. BOE, 137: 58609-58631.
- REAL DECRETO 1338/2011, de 3 de octubre, por el que se establecen distintas medidas singulares de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene de la producción y comercialización de los productos alimenticios. BOE, 248:107631-107635.
- REGLAMENTO (CE) 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO, L338: 1-25.

- REGLAMENTO (CE) 178/2002/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. DO L 31: 1-24.
- REGLAMENTO (CE) 852/2004/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la higiene de los productos alimenticios. DO L 139: 1-54.
- REGLAMENTO (CE) 853/2004/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. DOI L 139: 55-205.
- REGLAMENTO (CE) 854/2004/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. DO L 139: 206-319.
- REGLAMENTO (CE) 470/2009/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen procedimientos para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, Parlamento Europeo y del Consejo. DO L 152: 11-22.
- REGLAMENTO (CE) 37/2010/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. DO L 15: 1-72.
- RIVERA, N., QUINTANILLA, P., ROMERO, T., BELTRÁN, M.C., MOLINA, M.P. 2016. Caracterización del queso Tronchón elaborado con leche cruda de cabra. Parte I: parámetros fisicoquímicos durante la maduración. XLI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovino y Caprino. Talavera de la Reina. Actas: 253-258.
- ROCA, M., CASTILLO, M., MARTÍ, P., ALTHAUS, R.L., MOLINA, M.P. 2010. Effect of heating on the stability of quinolones in milk. J. Agric. Food Chem., 58: 5427-5431.
- ROMERO, T. 2016. Efecto de la presencia de "Penicilina G" en la leche de cabra sobre la elaboración y características del queso Tronchón curado. Trabajo Fin de Grado. ETSIAMN. Universitat Politècnica de València.
- SANDERS, P., BOUSQUET-MELOU, A., CHAUVIN, C., TOUTAIN, P.L. 2011. Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique (Use of antibiotics in animal and public health issues). INRA Prod. Anim., 24: 199-204.
- TRIGUEROS I. C., 2016. Estudio sobre el crecimiento de bacterias proteolíticas y lipolíticas en leche y quesos obtenidos a partir de cabras tratadas con Enrofloxacin. Trabajo Fin de Máster. Universitat Politècnica de València.
- TROBOS, M., LESTER, C.H., OLSEN, J.E., FRIMODT-MOLLER, N., HAMMERUM, A.M. 2009. Natural transfer of sulphonamide and ampicillin resistance between *Escherichia coli* residing in the human intestine. J. Antimicrob. Chemother., 63: 80-86.