



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CON
MAYOR ACIVIDAD LIPOLÍTICA DEL QUESO
COTIJA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

García Saturnino Verónica



México D.F. Noviembre 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Aurora Irma Ortegón Avila
Vocal	Prof. Amelia Ma. De Gpe. Farrés González Saravia
Secretario	Prof. Maricarmen Quirasco Baruch
1er. Suplente	Prof. Martha Giles Gómez
2º. Suplente	Prof. Francisco Ruiz Terán

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 312, Conjunto E. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química, UNAM, México D.F.

Este trabajo de investigación recibió apoyo de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico, Proyecto PAPIIT IN200705: Caracterización de la microbiota presente en quesos tradicionales mexicanos.

Asesor del tema:

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Supervisor técnico:

M. en C. Idalia Ma. A. Flores Argüello

Sustentante:

Verónica García Saturnino

"Cuando nuestros sueños se han cumplido es cuando comprendemos la riqueza de nuestra imaginación y la pobreza de la realidad".

Ninón.

Dedico la realización de este proyecto a mis padres y familia.

Agradezco a Dios y a la Virgen por darme toda la fe necesaria para llegar a cumplir esta meta tan importante para mí y mi familia.

Agradezco a mis padres por darme la vida.

A Alicia Saturnino Ávila, mi mamita querida. Por estar conmigo en todas esas noches de desvelo, por cuidarme, por todas las lágrimas y risas que compartimos, por las preocupaciones que pasó por mí, así como por todas los momentos a su lado que me dieron la fuerza necesaria para seguir sobresaliendo en momentos de tempestad. Y principalmente por todo su inmenso cariño. ¡Gracias Mamá!

A José Luis García Moreno, mi papá. Por todos los consejos que me brindó para ser cada vez mejor, por todas las veces que me corrigió, por estar a mi lado, por enorgullecerse de mí y por todo el cariño y confianza que depositó en mí. ¡Gracias Papá!

A mis hermanas Ma. De los Ángeles y Alicia Rebeca por estar a mí lado siempre, por apoyarme en las buenas y en las malas. Y por seguir tan unidas como lo estamos. ¡Gracias!

Gracias a la Dra. Maricarmen Quirasco, mi asesora y amiga, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por todos sus consejos tan acertados y por la confianza que me brindó desde que comencé con este proyecto.

A la Q.F.B. Aurora Irma Ortegón y a la Dra. Amelia Ma. De Guadalupe Farrés González Saravia, por sus buenos consejos para la realización de este trabajo.

A todos mis amigos por seguirme en este largo camino que apenas comienza. Especialmente a aquellos que estuvieron a mí lado en esta última etapa. Así como también a los compañeros del laboratorio 312 por su ayuda y consejos.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Generalidades.	5
2.2. Definición de Queso Cotija.	5
2.3. Proceso de elaboración del Queso Cotija.	7
2.4. Efecto del tratamiento térmico en la elaboración del queso.	12
2.5. Efecto del salado	12
2.5.1. Efecto de la sal en la composición del queso.	14
2.5.2. Efecto del NaCl en la microbiología del queso.	14
2.5.3. Efectos de la sal en la calidad del queso.	14
2.5.4. Aspectos nutricionales del NaCl en el queso.	15
2.6. Maduración del queso.	15
2.6.1. Generalidades.	15
2.6.2. Microbiología de la maduración.	16
2.6.3. Actividad acuosa.	17
2.6.4. Potencial redox.	17
2.6.5. Temperatura de maduración.	18
2.6.6. Otros microorganismos en la maduración del queso.	18
2.7. Lipólisis.	19

2.8. Identificación de poblaciones microbianas.	22
2.8.1. Detección de microorganismos lipolíticos.	22
2.8.2. Métodos moleculares.	23
2.8.2.1. ARDRA.	23
2.8.2.2. Aislamiento de ADN.	24
2.8.2.3. Electroforesis de ADN.	24
2.8.2.4. Reacción de PCR.	25
2.8.2.5. Análisis de restricción.	29
2.8.2.6. Secuenciación de la región del gen 16s rADN.	31
3. HIPÓTESIS.	32
4. OBJETIVOS.	33
5. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.	34
6. METODOLOGÍA.	36
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	55
7.1. Resultados de pruebas fisicoquímicas.	55
7.2. Humedad.	57
7.3. Grasa.	58
7.4. Proteína.	58
7.5. Cenizas.	59
7.6. Resultados de pruebas microbiológicas.	64
7.7. Detección de microorganismos lipolíticos.	66
7.7.1. Optimización de medios para la detección de actividad.	66

7.7.2. Aislamiento de microorganismos con mayor actividad.	68
7.7.3. Comparación de actividad lipolítica.	71
7.8. Caracterización microscópica.	73
7.9. Prueba de la catalasa.	75
7.10. Identificación por métodos moleculares.	76
7.10.1. Aislamiento de ADN.	76
7.10.2. Productos de la reacción de PCR.	78
7.10.3. Análisis de restricción.	79
7.10.4. Criterio de selección.	81
7.10.5. Secuenciación de ADN.	83
7.10.6. Alineamiento de secuencias.	88
7.11. Identificación por pruebas bioquímicas (API).	92
8. CONCLUSIONES.	95
9. ANEXOS.	98
9.1. Anexo 1.	99
9.2. Anexo 2.	100
9.3. Anexo 3.	103
9.4. Anexo 4.	105
9.5. Anexo 5.	108
9.6. Anexo 6.	109
9.7. Anexo 7.	112
9.8. Secuencias	113
10. BIBLIOGRAFÍA.	120

RESUMEN

En México existen muchos alimentos elaborados de manera artesanal, varios de éstos tienen propiedades nutritivas y características sensoriales auténticas que no se encuentran en ningún otro producto. Este es el caso del queso Cotija, un queso maduro de textura desmoronable y dura, con alto contenido de sal y elaborado con leche cruda.

Este queso se elabora en la Región de Jalisco desde hace mucho tiempo, una área ubicada entre Jalisco y Michoacán. Tiene gran aceptación por la gente de esa región y su consumo va en aumento, pues es un queso de gusto fuerte y uno de los pocos quesos maduros elaborados y consumidos en el país. Por lo que se pretende obtener la denominación de origen para este producto, estandarizar el proceso de elaboración y mejorar la calidad higiénica del proceso para obtener un producto final de buena calidad, que pueda competir con otros quesos de fama internacional, ocupar un amplio mercado y resaltar sus propiedades.

Se han conseguido avances en cuanto al mejoramiento de buenas prácticas de higiene en su elaboración, pero aún no se ha caracterizado a la microbiota que participa en el proceso de manufactura y maduración. Dentro de esta última etapa, los microorganismos lipolíticos son unos de los principales causantes de la formación de compuestos de sabor y olor en el queso. En las etapas del proceso de elaboración no se incluye ningún tratamiento térmico que garantice la disminución de la microbiota contenida.

Se esperaba encontrar quesos con alta carga microbiana, pero al realizar el análisis microbiológico se observaron cuentas bajas en los productos con mayor tiempo de maduración. Por lo que se recomienda consumirlos con tres meses de maduración mínima. También se descartaron dos muestras que tenían presencia de coliformes, que indica que todavía existe la necesidad de informar a los productores de los puntos críticos que afectan su producto.

Se observó que los quesos con mayor tiempo de maduración tenían un a_w menor, y que la cantidad de sal afectaba directamente a éste. Los quesos que presentaron mayor acidez y un valor menor de pH, eran los más maduros.

Dentro de todas las muestras analizadas la cantidad de grasa variaba, y con esto el valor de proteína.

Quesos que tenían menor cantidad de proteína se compensaban con una mayor cantidad de grasa, que no afectaría el producto final, ya que la grasa también es sustrato metabólico para la formación de olores y sabores.

Hubo variabilidad en la cantidad de sal para cada queso, lo que indica que la adición de ésta depende de cada productor.

En este trabajo se identificaron los microorganismos con mayor actividad lipolítica, aislados del queso, por métodos moleculares. Se recurrió a la técnica de secuenciación de la región ribosomal 16S para tener una identificación acertada, y también se realizó la identificación por medio de pruebas bioquímicas APIs que resultó un método menos sensible. Los resultados muestran que nuestros quesos contenían *Staphylococcus psifermentans*, *S. xylosum*, *S. saprophyticus*, *Bacillus pumilus*, además de *Candida zeylanoides* y *Yarrowia lipolytica*, dos levaduras que contenían gran actividad lipolítica.

1. INTRODUCCIÓN:

En México se han reportado alrededor de 30 distintos tipos de quesos, los que se pueden dividir en dos grandes grupos: industriales y artesanales, estos últimos de producción local. Hay dos que están en vías de obtener la denominación de origen; se trata de los conocidos Cotija y Chihuahua, considerados como quesos artesanales.

Hasta la fecha hay que considerar que se producen grandes toneladas de Queso Cotija, “auténtico” principalmente en los estados de Jalisco y Michoacán, donde se elabora de manera genuina y artesanal desde hace 400 años en seis municipios adyacentes de la Sierra de Jalmich (entre Jalisco y Michoacán)³⁶.

Como una primera etapa para obtener la denominación, el 7 de marzo del 2005 se les otorgó a los miembros de la Asociación Regional de Productores de queso Cotija de la región de Jalmich, bajo la figura legal de Sociedad de Producción Rural SPR-RI, la Marca Colectiva de “Queso Cotija Región de Origen”, por parte del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI).²

La Asociación Regional de productores de Queso Cotija publicó también en el mismo año Las “Reglas de uso”, con las que se apoya el proceso y se inicia su protección oficial. Al adquirir la denominación de origen, ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, el producto pertenecería única y exclusivamente a la región donde se elabora, su nombre sería el mismo que ostenta, contaría con un sello de distinción y, además de obtener fama internacional, competirían con los quesos de otros países sin ningún problema. Entre los beneficios están su protección ante otros no elaborados en la región de origen, y de las imitaciones. El producto adquiriría un valor agregado en el mercado, la posibilidad de mejores estrategias de posicionamiento nacional e internacional y la conformación de una organización sólida de productores.³⁶

El queso Cotija es uno de los pocos quesos salados y madurados que se consumen en México, del cual se desconocen muchos aspectos, por ejemplo lo que respecta a su microbiota, composición, proceso y producción. Hasta hace pocos años, no se contaba con un proceso

estandarizado de producción, sino hasta la reciente obtención de la Marca Colectiva, donde se describen las reglas de uso y se especifican las características que tiene que llevar un queso Cotija para ser considerado como auténtico.

Lo anterior marca un avance en cuanto al mejoramiento en la higiene y la estandarización del proceso, pero faltan muchas cosas por conocer. Por ejemplo, las normas oficiales como la NOM-121-SSA1-1994³¹ y el Código Sanitario que rigen las especificaciones de los quesos en México, ignoran la existencia de quesos elaborados con leche cruda, y aunque lo nombran, no hay especificaciones microbiológicas que se ajusten a este tipo de queso.

De ahí la necesidad de conocer más a fondo las características de este producto que pretende obtener la denominación de origen, por que además, se sabe que es un queso muy consumido localmente y tiene un mercado internacional informal.

El queso Cotija es elaborado con leche cruda de vaca inicia con alta carga microbiana, y no lleva un tratamiento térmico que reduzca la microbiota contenida en la leche en ninguna etapa de elaboración. Además, se lleva a cabo un amasado y salado manual, de donde pudiera provenir la incorporación de algún otro microorganismo ajeno a la leche.

Por otra parte, se sabe que la producción de olores y sabores del queso se obtiene por el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos presentes en el queso por acción de la microbiota contenida, que pudiera provenir o no de la leche.

Con base en lo anterior, este proyecto tiene como objetivo principal conocer la microbiota involucrada en la producción de las características de aroma y sabor tan pronunciado que obtiene el queso al final de su proceso. Se considerarán sólo los microorganismos con actividad lipolítica que tienen gran importancia en la producción de compuestos de olor, sabor y color. Para lograr el objetivo planteado, este trabajo se apoya de técnicas y métodos ya establecidos y en algunos casos, en métodos modificados en el laboratorio ajustados al tipo de muestra que se analizó. Todo con el fin de realizar un análisis físicoquímico, microbiológico y molecular adecuado para aislar e identificar a algunos de los microorganismos con mayor actividad lipolítica, así como también conocer la composición del medio en el que crecen (el

queso) y verificar la calidad microbiológica de muestras de queso de diferentes estados de maduración, obtenidas de la región de Jalmich.

2. ANTECEDENTES

2.1. GENERALIDADES

El queso Cotija es de gran tradición en México, se produce desde hace mucho tiempo de manera artesanal en la Sierra de Jalmich, aunque también se elabora en otros estados como Tabasco y Chiapas, pero se sabe que los que se elaboran allí, presentan sabor diferente³⁶.

La región productora del queso Cotija se localiza: con centro en el cruce de las coordenadas 19° 30' de latitud norte y 102° 45' de longitud oeste, tiene forma de herradura orientada al norte, que va de los 19° 15' a los 19° 40' latitud norte y de los 102° 30' a los 103° 05' de longitud oeste, y abarca una superficie territorial de aproximadamente 2400 kilómetros cuadrados.

Abarca la región ubicada en las inmediaciones serranas de los estados de Jalisco y Michoacán (Sierra Jalmich), en jurisdicción de los municipios de Santa María del Oro, Jalisco, sur de Tocombo y de Cotija, Michoacán, principalmente. Además se extiende a territorio de los municipios vecinos a los anteriores: norte de Jilotlán de los Dolores, oriente de Tamazula, sur de Valle de Juárez y de Quitupan, Jalisco; suroeste de Los Reyes, Peribán y Tancítaro, y norte de Buena Vista Tomatlán, Michoacán (Ver fig 1).

2.2. DEFINICIÓN DE QUESO COTIJA

La norma NOM-121-SSA1-1994³² define a los quesos madurados, como “alimentos que en lo general cumplen con ser un producto que se obtiene a partir de la leche pasteurizada entera sometida a procesos de coagulación, cortado, desuerado, salado, prensado , y se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda, con o sin corteza; sometidos a un proceso de maduración mediante la adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto de que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración”.

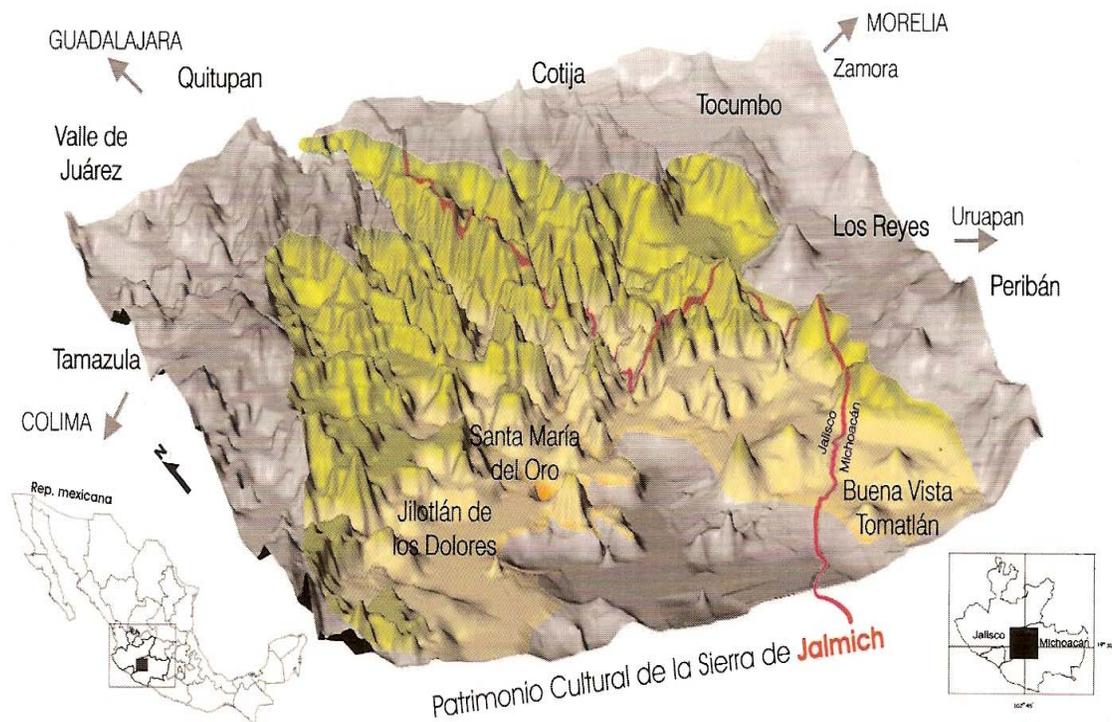


Figura 1. Sierra de Jalmich, región productora del queso Cotija.²

A pesar de que este queso se encuentra mencionado en la norma, la definición cumple con los demás quesos, pero no define al queso Cotija en su totalidad.

El Cotija puede clasificarse como un queso de pasta dura, prensada, no cocida y madurada (el genuino debe ser madurado al menos 100 días), que se elabora con leche cruda de vaca, entera o ligeramente descremada.

Posee una pasta desmoronable, ácida y con elevado porcentaje de sal. Cuando está bien madurado presenta un color blanco-amarillento. Es un queso seco y de gusto muy fuerte.

Su peso oscila entre 20 y 30Kg por pieza, sus dimensiones promedio son 40 cm de diámetro 18 cm de altura.

2.3. PROCESO DE ELABORACIÓN DEL QUESO COTIJA

La normatividad que rige la elaboración de distintos quesos en el país, define a éstos como el producto que se obtiene a partir de leche pasteurizada entera sometida a procesos de coagulación, cortado, desuerado, salado, prensado y madurado o no, a temperatura y humedad controladas; sin que se haya empleado en su elaboración grasas o proteínas no provenientes de la leche.

La norma NOM-121-SSA1-1994³², clasifica a los quesos en base a su proceso, y los divide en:

- Frescos (frescales, de pasta cocida y acidificados)
- Maduros (prensados, prensados de pasta dura y de maduración con mohos)
- Procesados (fundidos y fundidos para untar).

Al queso Cotija lo clasifica como un queso maduro prensado de pasta dura, características que se adquieren debido a su proceso.

De acuerdo a la observación de las costumbres de algunos productores en una visita de campo realizada, y a lo que se estipula en las reglas de uso², el proceso de elaboración del queso Cotija que llevan acabo los productores de la Región de Origen, se describe a continuación y se ilustra en la Figura 2.

1. La recepción de la leche. La leche que se utilice debe ser recién ordeñada del día. La ordeña se realiza siempre temprano, de 7 a 9 am, no más tarde a menos que las lluvias lo impidan. La persona que se dedique a ordeñar las vacas se tiene que lavar las manos muy bien, y limpiar la ubre de las vacas con un trapo limpio, como pasos previos a la ordeña. Para mantener la mayor higiene posible, la persona que ordeña no debe ser la misma que acarree el ganado o realice otras actividades que puedan ensuciar sus manos, por lo menos hasta el término de la ordeña en el ganado. La mezcla de toda la leche se hace pasar por cedazos limpios para retener cualquier materia extraña, antes de su utilización. La temperatura de la leche recién salida de la vaca es de 37-38° C, con un pH= 7.

2. La leche obtenida se deja reposar en un recipiente de acero inoxidable limpio. Aunque también se utilizan recipientes de plástico y cazos grandes para contener la leche. Se observó que dejan reposar la leche aproximadamente de 3 a 4 horas a temperatura ambiente antes de agregar el cuajo.
3. Una vez que la leche alcanza la temperatura óptima para ser cuajada (alrededor de 34° C, con un pH cercano a siete), se le incorpora el cuajo (Cuamex, Cuajo XXX estandarizado, enzimas coagulantes de leche bovina), mezclándolo rápidamente, y puede acompañarse de una parte de la sal total añadida, según la costumbre. El tiempo que tarda en cuajar es alrededor de una hora.
4. La consistencia de la cuajada se prueba cruzándola con una cuchara ó cuchillo y, una vez alcanzado el punto deseado, se corta con los mismos utensilios que anteriormente se esterizaron en agua hirviendo, hasta obtener grumos equivalentes en tamaño aproximado a un grano de maíz (dependiendo del productor puede variar el tamaño).
5. La mezcla del suero y cuajada se dejan reposar hasta que la cuajada cortada se asiente en el fondo del recipiente. Para poder eliminar el suero, éste se drena o se cuela con ayuda de un trapo limpio esterilizado en agua hirviendo.
6. La cuajada se separa del suero y se deja escurrir en una artesa que puede ser de madera apropiada o de acero inoxidable. Posteriormente se amasa de forma manual en una mezcladora de acero inoxidable, la cual se lava con agua hirviendo o con el mismo suero que se obtuvo en el proceso, incorporándole la sal (de 138g- 140g por cada 20 litros de leche, la cantidad puede variar).
7. La masa salada se puede moldear o dejar reposar sobre la artesa a temperatura ambiente, para que al día siguiente se incorpore otra cantidad equivalente a la del primer amasado y así juntas, obtener la cantidad adecuada para llenar el aro (el cincho del diámetro específico), cubierto en su interior de dos bandas de ixtle (fibra de maguey) con las que se envolverá la masa, obteniendo la presentación tradicional cilíndrica de alrededor de 20 kilogramos.
8. La pasta fajada se prensa de 18 a 24 horas, volteándola sobre su propia cara al concluir el periodo. A partir de esta etapa se considera que inicia la vida de cada pieza de queso.

9. La pasta prensada se mantiene fajada para que no pierda la forma cilíndrica, se voltea sobre su cara diariamente hasta que se oreo a temperatura ambiente, durante 15 días o hasta que adquiriera la firmeza necesaria para que cada pieza pueda ser manipulada.
10. El queso se desfaja cuando la consistencia es la adecuada, pero se continúa volteándolo, alternando la cara expuesta al medio diariamente durante los tres primeros meses de su vida.
11. La superficie se limpia con un trapo limpio, suave pero que no desprenda hilos o materia extraña que pueda poner en riesgo la calidad del queso, se limpia y voltea cada tercer o cuarto día durante los tres primeros meses de producido. En algunas ocasiones se les coloca una malla de tela limpia para evitar las moscas e insectos que pudiera haber.

La elaboración del queso con leche cruda, la ausencia de algún tratamiento térmico durante el proceso, el salado y amasado manual, el prensado fuerte (que lo hace desmoronable) y el tiempo mínimo de tres meses de maduración antes de ser consumido son aspectos que diferencian al Cotija de los demás quesos.

También se observa que las etapas de este proceso que pudieran ser vehículos de inoculación de microorganismos son la ordeña, el tiempo de reposo que lleva la leche a temperatura ambiente antes de agregar el cuajo, el amasado y salado manual, los utensilios como cuchillos o cucharas sin esterilizar y las etapas de oreo y maduración en el caso de que no se cubra el queso o se limpie con trapos o cedazos limpios (estériles).



Figura 2. Proceso de elaboración del queso Cotija. Se marcan las etapas del proceso de donde pudiera provenir la microbiota principal del queso.³⁶

El queso Cotija entre otras cosas, también debe cumplir con los siguientes puntos, marcados en las Reglas de uso²:

- Debe producirse de manera natural, a partir de leche entera, sin la adición de compuestos químicos o análogos de la leche u otros ingredientes que no sean sal y cuajo.
- El queso debe estar libre de cualquier microorganismo patógeno.
- Libre de pesticidas, fertilizantes, detergentes, etc.
- La composición promedio de la leche será la siguiente:
 1. Humedad máxima 36%
 2. Grasa mínima 23%
 3. Proteína mínima 25%
- El cuajo utilizado deberá ser natural, elaborado higiénicamente por los mismos productores de queso, o a partir del cuajo comercial de origen natural, no microbiano, es decir, que su composición corresponda a la mezcla enzimática, proveniente del extracto enzimático del estómago de rumiantes.
- La sal deberá ser de mar (de grano), libre de materia extraña y compuestos químicos.
- El Cotija Región de Origen deberá tener un mínimo de tres meses de vida dentro del área geográfica que protege esta marca, considerando el inicio de su vida a partir del retiro de la prensa.

Por lo tanto, si el queso cumple con el proceso y los puntos anteriormente citados, se le puede considerar un queso Cotija auténtico.

Las características sensoriales de un queso las determina el tipo de proceso y la microbiota contenida en el producto, y ésta última se ve afectada o modificada durante las diversas etapas del proceso por diferentes eventos que ocurren durante su elaboración. Algunos de ellos se nombran a continuación.

2.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA ELABORACIÓN DE QUESO

Uno de los objetivos de la pasteurización de la leche y otros tratamientos térmicos en la elaboración del queso es la disminución de la cuenta microbiana y con esto, la eliminación de los patógenos en la leche. El crecimiento de los patógenos depende fuertemente del tipo de tecnología que se aplique en el queso.

La literatura más reciente muestra que, especialmente, varios tipos de quesos hechos con leche cruda pueden ser considerados un posible vehículo para la contaminación con toxinas de *Escherichia coli*, *Aeromonas sp.*, *Salmonella typhimurium* DT104 y *Listeria monocytogenes*¹. No se descarta que también se pueda encontrar la presencia de *Staphylococcus aureus* en este tipo de productos, ya que también libera toxinas y es halotolerante. Además, está bien documentado que los patógenos crecen fácilmente en quesos con alta humedad, a pH cercano a la neutralidad y bajo contenido de sal, durante la elaboración y la maduración del producto¹.

Los tratamientos térmicos en la leche tienen varios efectos: eliminación de microorganismos, activación-inactivación de enzimas, desnaturalización de proteínas del suero, modificación del cuajado de la leche y en la actividad de las bacterias ácido lácticas que se agregan posteriormente como cultivos iniciadores.¹

Por todo lo anterior, en un queso maduro como el Cotija, que es salado, ácido y seco; se puede prevenir el crecimiento de patógenos, ya que, estos factores cumplen la labor de hacer al queso un medio selectivo e impedir el crecimiento de algunos microorganismos y la actividad de enzimas presentes. También se puede inducir el crecimiento de algunos otros microorganismos deseables en este tipo de queso.

2.5. EFECTO DEL SALADO

El cloruro de sodio (NaCl) se ha utilizado históricamente para la conservación de los alimentos.

Los tres métodos clásicos de conservación: fermentación, salado y deshidratación, complementados con refrigeración son usados para preservar el queso y/o controlar su

maduración. La concentración de sal varía del 1 al 5% aproximadamente, según el tipo de queso.¹³

La sal incrementa la presión osmótica de la fase acuosa de los alimentos, lo que causa deshidratación de células bacterianas y su muerte, por lo que su cantidad disminuye.

La concentración y distribución de sal en el queso tiene una mayor influencia en varios aspectos de calidad de éste.

Algunos de los principales efectos de la sal son:

- Inhibir o retardar el crecimiento y la actividad de los microorganismos, incluyendo patógenos y microorganismos que descomponen alimentos, y por lo tanto, incrementa la seguridad del producto y retarda la maduración.
- Inhibe la actividad de varias enzimas en el queso, como las proteasas, lipasas, etc.
- Ayuda a la sinéresis de la cuajada del queso, que resulta en la expulsión del suero, y esto, en la reducción de la humedad del queso, la cual influye en la actividad de los microorganismos y de las enzimas.
- Es causa de cambios en las proteínas del queso que influyen en la textura, la solubilidad de las proteínas y probablemente la conformación de las proteínas.
- Afecta el sabor del queso de forma directa e indirecta, pues influye en los microorganismos y enzimas del queso.
- Elevados niveles de sal en el queso tienen un efecto nutricional indeseable.

Durante el proceso de elaboración de quesos uno de los pasos importantes, es el del salado, ya que se logra inhibición del crecimiento de la microbiota iniciadora, obteniendo así una disminución del a_w en el queso. La sal al ser soluble deja menos agua disponible para el crecimiento de algunos microorganismos, provocando que el queso se vuelva un medio selectivo⁴.

La velocidad de absorción de la sal aumenta con un incremento de la superficie o área del queso. La cantidad de NaCl absorbida por cm^2 de superficie del queso es mayor en un bloque liso rectangular que en un queso con forma cilíndrica o esférica. Esto aplica cuando el salado es por superficie o por inmersión.

2.5.1. Efecto de la sal en la composición del queso.

La concentración de sal tiene una relación inversa con la humedad en el queso.

Altas concentraciones de sal son asociadas con un producto con niveles de grasa y proteína elevados, ya que dejan menor cantidad de agua en el queso.

Las concentraciones de lactosa y ácido láctico determinan el pH del queso y dependen de la continua actividad de los microorganismos ácido lácticos presentes, y por lo tanto, indirectamente del contenido de sal.

2.5.2 Efecto del NaCl en la microbiología del queso.

El crecimiento de cepas de *Lactococcus* usadas como iniciadores es estimulado por bajos niveles de NaCl, pero es fuertemente inhibido a niveles de alrededor del 5% de NaCl. Cepas de *Lc. lactis ssp. lactis* son más tolerantes que *Lc. lactis ssp. cremoris*¹³.

La actividad de cultivos iniciadores es inhibida si se adiciona una cantidad de sal excesiva.; sin embargo, la lactosa residual puede ser metabolizada más tarde durante la maduración, cuando el número de bacterias ácido lácticas sea mayor.

2.5.3 Efectos de la sal en la calidad del queso.

Si se considera que la sal tiene una gran influencia en la microbiología, enzimología, en el pH, y en el contenido de humedad en el queso, entonces no es sorprendente que también la concentración de sal tenga un principal efecto en cuanto a la calidad del queso.

Los defectos de sabor en quesos, que tienen concentraciones bajas de sal probablemente surgen de la excesiva o no balanceada actividad enzimática.

Además el NaCl tiene una contribución positiva y directa en el sabor del queso, aún más para los consumidores que aprecian el sabor salado en los alimentos.

2.5.4 Aspectos nutricionales del NaCl en el queso.

Altas cantidades de sal en la dieta son indeseables, pues provoca hipertensión y el riesgo de osteoporosis incrementada por la expulsión del calcio, debida a la concentración alta de sodio.¹³

2.6. MADURACIÓN DEL QUESO

2.6.1. Generalidades

Los microorganismos son un componente esencial en diferentes variedades de queso y desempeñan un papel importante durante el proceso de elaboración y la maduración del mismo.

Ellos pueden ser divididos en dos grandes grupos: los iniciadores (bacterias ácido lácticas) y la microbiota secundaria (microorganismos que actúan posteriormente a la etapa de cuajado y que pueden ser, o no, adicionamos intencionalmente).

Los microorganismo iniciadores, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* son utilizados individualmente o combinados, dependiendo de la variedad o tipo de queso, para la producción de ácido durante la manufactura y contribuyen en el procesos de maduración. Los microorganismos secundarios no contribuyen en la producción de ácido, pero generalmente cumplen un rol importante durante la maduración en la formación de compuestos de olor, sabor y color, entre otros. Esta microbiota secundaria esta compuesta por mezclas complejas de bacterias, bacterias ácido lácticas no iniciadoras, levaduras y hongos que crecen interna o externamente en el queso y son diferentes según el tipo de producto⁴.

Los cultivos iniciadores, junto con la microbiota secundaria que crece, se encuentran a lo largo del proceso del queso, promueven una serie de reacciones bioquímicas que son vitales para el desarrollo del sabor y la textura del producto.

En algunos quesos como el Cheddar se le recomienda la adición de lactobacilos no iniciadores (como *Lb. paracasei spp paracasei* y *Lb. plantarum*) para reforzar la leche, ya que los

lactobacilos heterofermentativos iniciadores se hayan en bajas concentraciones en la leche cruda, y no son suficientes para obtener una buena formación de sabor y olor en el queso²⁰.

En cambio, en la elaboración del queso Cotija no se adicionan cultivos iniciadores, además, es requisito (según las Reglas de Uso) no agregar ningún tipo de cultivo a la leche, si se quiere obtener un queso auténtico.

2.6.2. Microbiología de la Maduración

El sabor y la textura de un queso son modificados por las actividades enzimáticas presentes en el producto durante el proceso de maduración. Generalmente, tiempos prolongados de maduración producen sabores intensos en algunos quesos.

La actividad enzimática que participa en la maduración proviene de las enzimas endógenas de la leche, de la microbiota nativa de la misma, y de otras fuentes¹³:

- Cuajo. El cuajo usualmente contribuye con quimosina u otras enzimas proteinasas. Algunos quesos de variedades italianas usan una pasta de cuajo que contribuyen con proteinasas y lipasas.
- Leche. La leche contiene alrededor de 60 enzimas diferentes, pero muy pocas tienen gran importancia en la maduración; estas incluyen proteinasas, especialmente plasmita, lipasas, fosfatasa ácida y xantina oxidasa. Muchas enzimas son estables al calor, completa o parcialmente sobreviven a la pasteurización. Otras son asociadas con las micelas de la caseína, se presentan en la membrana de los glóbulos de grasa o se incorporan en el cuajo al queso. Las enzimas presentes en el suero se pierden casi completamente por lo que su importancia en la maduración es muy baja.
- Cultivos iniciadores. Los microorganismos iniciadores proveen de una diversidad de enzimas. Éstas, aunque en baja concentración son la principal contribución a la maduración.
- Microbiota secundaria. Muchas variedades de queso contienen diversos microorganismos secundarios, cuya función no es la producción de ácido, sino el desarrollo de sabor. Los microorganismos involucrados son bacterias ácido propiónicas, bacterias corineformes, levaduras y hongos, así como bacterias ácido

lácticas no iniciadoras que se van desarrollando en la leche, como lactobacilos mesófilos y algunos pediococos.

Durante la maduración los factores que controlan el crecimiento de los microorganismos en el queso incluyen: la actividad acuosa, la concentración de sal, el potencial óxido-reducción, el pH, NO_3^- , la temperatura de maduración y la presencia o ausencia de bacteriocinas producidas por los iniciadores.

2.6.3. Actividad acuosa.

Las levaduras pueden crecer a valores de a_w bajos y los hongos a valores todavía más bajos, en comparación de las bacterias. Muchas bacterias requieren un a_w mínimo de alrededor de 0.92 para crecer. El límite de muchas levaduras es alrededor de 0.83, pero levaduras osmófilicas crecen a valores de a_w de hasta 0.60, mientras que los hongos tienen un límite de alrededor del 0.75.

El crecimiento de microorganismos a un a_w bajo es caracterizado por una fase lag de crecimiento larga, con una velocidad de crecimiento lenta y baja producción de biomasa.

La evaporación de agua en la superficie del queso durante la maduración también contribuye a la reducción del a_w en el queso, pero el factor principal es el cloruro de sodio añadido al queso.

2.6.4. Potencial Redox.

El potencial redox o de óxido-reducción (E_h) es una medida de la habilidad de un sistema químico/bioquímico para oxidarse (perder electrones) o reducirse (ganar electrones). El E_h de la leche está alrededor de los +150mV, mientras que en el queso, está alrededor de -250mV. Es probable que esto, se deba a la producción de ácido láctico por la fermentación, y la reducción de pequeñas cantidades de O_2 que pasa de la leche al agua mientras ocurre la sinéresis⁴. Como consecuencia, el interior del queso es esencialmente un sistema anaerobio, el cuál solo soporta el crecimiento de microorganismos anaerobios facultativos u obligatorios.

El E_h del queso es uno de los principales factores en determinar el tipo de microorganismos que crecerán en el queso. Por lo tanto, aerobios obligados, tales como *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Bacillus* y *Micrococcus spp.* son excluidas de la flora que crece en el interior del queso, mientras que las bacterias que se desarrollan en la superficie del queso serán predominantemente aerobios obligados.

2.6.5. Temperatura de maduración.

Los microorganismos involucrados en la elaboración y maduración del queso son mesofílicos o termofílicos los cuales tienen una temperatura óptima de 30°C y 42°C, respectivamente. La temperatura a la que el queso es madurado tiene que promover las reacciones durante la maduración, así como controlar el crecimiento favorable de la flora secundaria y prevenir la propagación de microorganismos patógenos.

Altas temperaturas promueven una maduración acelerada, pero los cambios en el cuerpo y sabor del queso son perjudiciales⁴.

2.6.6. Otros microorganismos en la maduración del queso.

La microbiota de superficie tiene dos importantes funciones en la maduración:

1. Producción de enzimas.
2. La desacidificación de la superficie del queso.

Las enzimas incluyen las lipasas, proteinasas y peptidasas. Las lipasas y proteinasas hidrolizan la grasa y las proteínas en ácidos grasos y péptidos, respectivamente, y las peptidasas hidrolizan péptidos pequeños a aminoácidos. Ambos, ácidos grasos y aminoácidos son los precursores de muchos de los compuestos de sabor durante la maduración del queso.

Durante los primeros días de maduración las levaduras y los hongos crecen en la superficie y desacidifican oxidando el lactato a agua y CO₂.

Algunos otros grupos que se han encontrado en el queso son: *Arthrobacter*, *Brechybacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Propionibacterium*,

Pediococcus, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, levaduras como *Kluyveromyces ssp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia spp.*, etc..

2.7. LIPÓLISIS

El desarrollo del sabor y olor en los quesos proviene, en gran parte, de la modificación de la grasa de la leche pues se ha demostrado que en leches descremadas la falta de la grasa ocasiona un desarrollo de sabor escaso en el queso²⁰. La grasa en la leche puede ser oxidada o hidrolizada. La oxidación es limitada por el bajo potencial redox presente en el queso. Sin embargo, la lipólisis de los triglicéridos de la leche aporta altas concentraciones de ácidos grasos de cadenas cortas, los cuales son sustratos para diferentes reacciones bioquímicas.

Los lípidos contribuyen al sabor del queso por tres vías:

- son fuente de ácidos grasos, especialmente ácidos de cadena corta, los cuales tienen fuertes características de sabor. Los ácidos grasos son producidos a través de la acción de las lipasas en un proceso llamado lipólisis. En muchas variedades de quesos los ácidos grasos son convertidos en compuestos aromáticos y de sabor, especialmente metil cetonas y lactonas.
- Los ácidos grasos, especialmente los poliinsaturados, forman varios aldehídos insaturados que son fuertemente saborizantes y causan un sabor de rancidez. La oxidación es muy limitada en el queso por su bajo potencial redox (-250mV).⁴
- Los lípidos funcionan como disolventes para compuestos aromáticos y de sabor provenientes de la degradación de proteínas y lactosa, no solo de lípidos.

Las lipasas provienen de la leche, del cuajo adicionado, de los iniciadores, o de los microorganismos no iniciadores.

Las lipasas son hidrolasas que hidrolizan ésteres de ácidos carboxílicos.

Lactococcus ssp. y *Lactobacillus spp.* tienen niveles bajos de actividad lipolítica en comparación de otras bacterias y hongos. *Micrococcus* constituye parte de la microbiota no iniciadora del queso, especialmente de la superficie que produce lipasas que contribuyen a la lipólisis durante la maduración del queso.

También *Pediococcus* spp. incluido en la microbiota no iniciadora, tiene actividad esterolítica y lipolítica. Pero la lipólisis extensiva ocurre en presencia de los hongos y levaduras.

Los compuestos volátiles son principalmente los que aportan al perfil de aroma del producto, son de naturaleza muy variada y se han identificado cientos de ellos (Tabla 1). Los ácidos grasos de cadena corta tienen un impacto considerable en el sabor al producir aromas deseables, pero la lipólisis intensiva y desmedida puede causar problemas de rancidez en muchos tipos de quesos. Estos ácidos grasos son sustratos de reacciones enzimáticas que producen compuestos de sabor²⁰. Por ejemplo, por la β -oxidación y descarboxilación se obtienen metil-cetonas y alcoholes secundarios, y por esterificación de hidroxiacidos se produce lactonas. Adicionalmente, los ácidos grasos pueden reaccionar con grupos alcohol y formar ésteres, tales como etilbutanato, etilhexanato, metildecanoato. Estas reacciones se resumen en la Figura 3.

El gusto y el aroma de quesos azules son dominados por la saturación de n-metil-cetonas. La concentración de metil-cetonas se relaciona a la lipólisis.

Las lactonas son ésteres cíclicos resultado de la esterificación intramolecular de un hidroxiacido a bajas concentraciones de agua para formar una estructura de anillo.

Tabla 1. Algunos compuestos de aroma aislados de varios quesos.²⁰

Alcoholes	Cetonas	Lactonas	Ácidos grasos
1,2 butanediol	acetoína	δ -decalactona	acetato
2- butanol	acetona	γ -decalactona	butirato
etanol	diacetil	δ -dodecalactona	caproato
2-etilbutanol	2-butanona	δ -octalactona	decanoato
2-etihexanol	2-heptanona	(Z)-6-dodecen- γ -lactona	isobutirato
2-heptanol	2-hexanona		metil acetato
hexanol	2-pentanona		octanoato
Isobutanol	2-tridecanona		fenilacetato
2-metilbutanol	2-undecanona		propionato
3-metilbutanol	3-octanona		valerato
2-metilpropanol	1-octen-3-ona		ácido 2-metil butírico

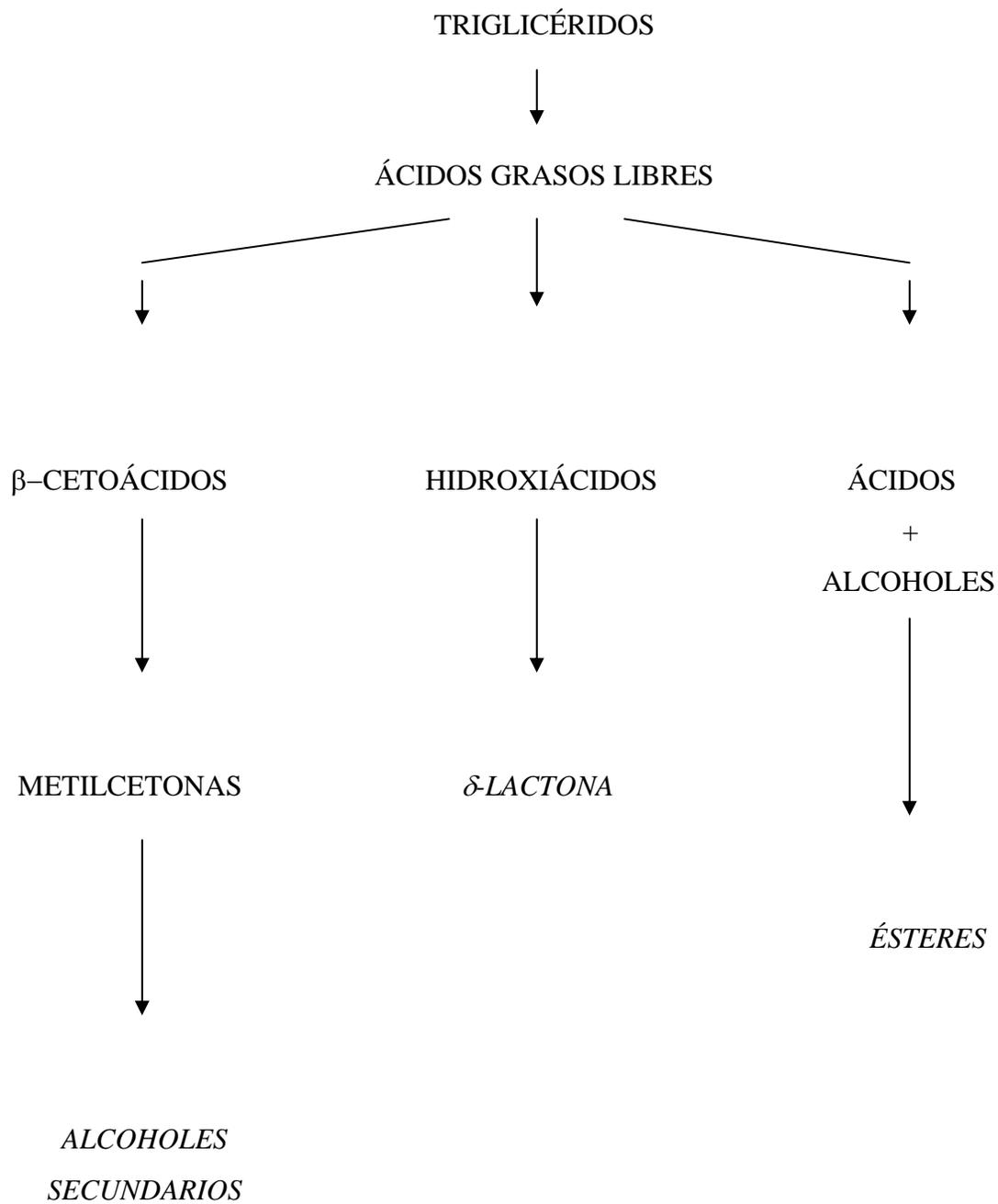


Figura 3. Principales reacciones bioquímicas que se presentan durante el proceso de maduración por la modificación de lípidos.²⁰

2.8. IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS

Se ha recurrido a varios tipos de análisis para la identificación de la microbiota que compone a un alimento y hasta la fecha se han desarrollado una gran variedad de técnicas moleculares para caracterizar las diversas poblaciones. Existen técnicas que requieren la combinación de varios tipos de análisis para llegar a clasificar un determinado microorganismo desde análisis morfológicos y bioquímicos, hasta análisis moleculares e inmunológicos.

En alimentos fermentados, por ejemplo, se sabe que la microbiota presente afectará la calidad del producto, por lo que es deseable conocerla para elaborar el producto en condiciones controladas. Algunos alimentos tradicionales se obtienen mediante fermentaciones naturales (en las que no se añaden inóculos) y están constituidos por microbiotas complejas que son difíciles de describir mediante el uso de métodos microbiológicos convencionales. Existen diferentes alternativas para la determinación de la estructura microbiana de estos alimentos. Una de ellas consiste en aislar microorganismos y tipificarlos mediante técnicas basadas en el DNA, como el de ARDRA.⁹

2.8.1. Detección de microorganismos lipolíticos.

Se ha encontrado que los géneros bacterianos de *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella* y *Staphylococcus*, así como hongos de géneros como *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor* y *Penicillium*, y de levaduras, como *Candida*, *Rhodotorula* y *Hansenula* son especies lipolíticas, microorganismos que producen lipasas de forma natural, y la lista puede ser ilimitada.

La actividad de la lipasa en un alimento puede ser determinada a través de la utilización de un medio de cultivo sólido, que contenga como sustrato una grasa que puede ser tributirina o trioleína incorporada en la formulación. La actividad de la lipasa es indicada por una aclaración (formación de halos alrededor de las colonias) del triglicérido opaco. El área o la zona de aclaramiento es proporcional a la concentración de la lipasa, aunque también influye la preparación del agar.⁴²

Para la preparación de los medios de cultivo pueden ser utilizados otros tipos de sustratos como aceite de maíz, aceite de soya, aceite de oliva, u otro aceite líquido, pero éstos, deben estar libres de antioxidantes o de otros materiales a concentraciones que inhiban el crecimiento de los microorganismos. Las grasas sólidas también pueden ser utilizadas, particularmente, cuando se examinan alimentos que tienen grasas sólidas presentes.

Para obtener un buen medio de crecimiento es importante que haya una buena emulsificación de la grasa añadida, con los demás componentes del medio.

La incubación de los medios de cultivo lipolíticos se hace desde los 20°C hasta los 37°C (según el grupo de microorganismos que se deseen aislar) por tres días, si el medio tiene tributirina como sustrato; y de 4 a 7 días, si se utilizaron otras grasas⁴².

2.8.2 Métodos moleculares.

Muchos de los métodos moleculares para la clasificación e identificación de cepas están basados en la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de un fragmento de DNA específico, tal como regiones variables del gen de rRNA, seguido de un análisis de restricción (ARDRA), son muy utilizados para obtener información para la clasificación dentro de los niveles de especie, subespecie y cepa de determinado microorganismo.

2.8.2.1 ARDRA.

El **ARDRA** (Análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado), es una técnica basada en la amplificación del gen 16S rRNA en bacterias y 26S para eucariontes, por la reacción en cadena de una polimerasa (PCR), utilizando cebadores universales y la restricción del amplicón, usualmente con endonucleasas que generan múltiples fragmentos de restricción que se analizan con geles de agarosa²⁰.

En esta metodología se obtienen patrones de bandas o “huellas digitales” de cada microorganismo. Se analizan, utilizando diferentes tipos de software, las diferencias entre éstos (de acuerdo con la presencia o ausencia de bandas) y se construyen dendrogramas.⁹ Generalmente se apoya en otros métodos de clasificación y de identificación.

2.8.2.2. Aislamiento del ADN.

El éxito de una buena amplificación de ADN depende de varios factores, entre ellos de la calidad y cantidad del ADN molde, por lo que el aislamiento y purificación del ADN del microorganismo es una de las etapas críticas de los protocolos de análisis molecular.

A pesar de que las técnicas de aislamiento del ADN varían ligeramente dependiendo del organismo experimental, todos estos métodos comparten las siguientes características:

- un tratamiento para romper a las células y liberar al ADN;
- un método para remover o desactivar a las enzimas que degradan al ADN;
- un método para separar al ADN de las proteínas y de otras moléculas contaminantes.

Existen varias metodologías de laboratorio sencillas y poco costosas para el aislamiento del ADN de bacterias, y de otros organismos. Estos métodos generalmente utilizan calor y un detergente para romper a las células y para desactivar a las enzimas que degradan al ADN. También utilizan la precipitación con alcohol para separar al ADN de los otros contaminantes.

2.8.2.3. ELECTROFORESIS DE ADN.

Típicamente, el análisis del ADN utiliza una técnica llamada electroforesis en gel de agarosa.

- La agarosa está compuesta de cadenas de azúcares y tiene una consistencia similar a la de la gelatina cuando se utiliza para este propósito.
- Una corriente eléctrica moviliza al ADN a través de la agarosa, del ánodo donde se cargan las muestras, en dirección al cátodo. De esta manera, las moléculas de ADN se separan de acuerdo a su tamaño, con las moléculas de ADN más pequeñas moviéndose más rápido.
- Las bandas de ADN de diferentes tamaños son detectadas utilizando un fluoróforo o fluorocromo que se le añade al gel.

2.8.2.4. PCR¹²

La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como **PCR** por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos.

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos (habitualmente conocidos por su nombre en inglés, "primers") actúan como cebadores para la síntesis in vitro de ADN la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada Taq polimerasa. Dicha enzima se aísla de una bacteria hipertermófila, denominada *Thermus aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 - 85 ° C). A esta temperatura dicha enzima es capaz de mantener una media de extensión de más de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G-C. La temperatura óptima a la que actúa la Taq polimerasa permite el uso de temperaturas elevadas para la hibridación de los cebadores, de esta manera se aumenta el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los primers unidos inespecíficamente al ADN.

La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos cada uno de los cuales incluye tres fases o pasos:

1. **DESNATURALIZACIÓN**: Para que comience la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95°C que producen la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra esta temperatura debe mantenerse unos minutos. Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los cebadores y una posterior extensión.
2. **HIBRIDACIÓN**: Esta fase se denomina también fase de "anillado" o de emparejamiento. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60° C para que se pueda

producir la unión de los cebadores a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La temperatura de fusión o annealing (T_m , “melting temperature”) depende de varios factores como la secuencia y la concentración de sales, y es relativamente específica para cada cebador; ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa.

3. **EXTENSIÓN:** Durante este paso la Taq polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la Taq polimerasa alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb.

COMPONENTES DE LA PCR.

❖ BUFFER DE AMPLIFICACIÓN

Los buffer de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y MgCl_2 . El MgCl_2 es el componente que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones Mg^{2+} son necesarios para la actividad de la Taq polimerasa, es decir, actúan como cofactores de la polimerasa.

La concentración óptima de MgCl_2 está en torno a 1.5mM si se emplean concentraciones de 200mM de cada uno de los dNTPs.

❖ CEBADORES

A la hora de elegir unos cebadores para amplificar un determinado fragmento de ADN hay una serie de reglas a seguir:

-La longitud de cada uno de los cebadores debe estar comprendida entre 18 y 24 bases ya que se ha comprobado que cebadores de mayor longitud (30-35 bases) disminuyen el rendimiento y los cebadores cortos carecen de suficiente especificidad.

-Ambos cebadores deben tener una temperatura de disociación (T_m) similar. Como máximo la diferencia entre ambas temperaturas debe ser de 5° C.

-Para evitar la formación de *dímeros de cebadores* es necesario comprobar que los éstos no contengan secuencias complementarias entre sí.

❖ DESOXINUCLEÓTIDOS TRIFOSFATO (dNTPs).

Las concentraciones de dNTPs que suelen usarse están en torno a 200µM para cada uno de ellos. En un volumen de reacción de 25µl con esta concentración de nucleótidos se sintetizarían entre 6-6.5µg de ADN. Las concentraciones de nucleótidos y de $MgCl_2$ van relacionadas ya que el Mg^{2+} se une a los dNTPs por lo que concentraciones elevadas de éstos inhibirían la reacción, al secuestrar al Mg^{2+} que necesita la polimerasa Taq para la catálisis. Para una concentración de 200µM de cada dNTP se suele añadir $MgCl_2$ a una concentración de 1.5 mM.

❖ POLIMERASA-TAQ

Las cantidades óptimas de Taq polimerasa necesarias para la síntesis de ADN están alrededor de 2 unidades en 25µl de volumen final de reacción, y se puede colocar menos, según la reacción que se lleva a cabo. La actividad de este enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de Mg^{2+} y de algunos iones monovalentes de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad.

Por otro lado, pequeñas concentraciones de KCl estimulan la actividad sintética de la Taq en un 50-60% con un máximo aparente cuando su concentración es de 50 mM. Existen algunos datos relacionados con la influencia de ciertos reactivos que se emplean antes de la amplificación y que alteran la actividad de la Taq. Por ejemplo, concentraciones 1M de urea estimulan la actividad, el SDS a bajas concentraciones que la inhibe al igual que concentraciones mayores del 10% de etanol.

❖ ADN MOLDE O “TEMPLADO”

Es el ADN del cual queremos copiar un determinado fragmento, por lo tanto, es lo que la polimerasa Taq utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas polinucleotídicas. La cantidad de ADN necesaria para la PCR depende de varios factores:

Número de copias presentes del fragmento que se quiere amplificar. Se prefiere utilizar un gen que esté presente en un número de copias alto, ya que será fácilmente amplificable, aún a partir de una concentración de ADN total baja.

Calidad del ADN: Cuando se trabaja con ADN cuya calidad es óptima no suele haber problemas en la amplificación y cantidades aproximadas a 100ng rinden buenos resultados. El problema aparece cuando la calidad del ADN obtenido no es la idónea, bien porque esté degradado o bien porque dicho ADN vaya ligado a una serie de contaminantes que pueden inhibir la actividad de la polimerasa. Si el ADN está degradado, el que obtengamos o no resultado en la amplificación va a depender de que el fragmento a amplificar esté íntegro o no. En el caso en el que tengamos ADN sin degradar pero unido a una serie de contaminantes habría que intentar diluir al máximo la muestra para disminuir dichos contaminantes, pero siempre dentro de un rango de ADN que no esté por debajo del límite de sensibilidad de la PCR.

ADYUVANTES DE LA PCR

Son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR. Aunque algunos autores han recomendado el uso del DMSO y del glicerol, el adyuvante más extendido y utilizado es el BSA. A concentraciones por encima de 0.8 µg/µl el BSA incrementa la eficiencia de la PCR ya actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la Taq polimerasa.

Todo este proceso se realiza en unos aparatos automáticos llamados termocicladores, en los que se pueden fijar los parámetros de tiempos y temperaturas de cada paso del ciclo.

2.8.2.5. Análisis de restricción.

Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen una secuencia entre 4-8bp en el ADN. El sitio de reconocimiento se llama sitio de restricción, y la enzima rompe un enlace fosfodiéster en la hebra líder y otro enlace fosfodiéster en la hebra complementaria.⁸

Son proteínas que cortan a las moléculas de ADN en lugares específicos de la secuencia de bases.

Tipos de enzimas de restricción:

Sistemas tipo I

Una sola enzima (multimérica, posee 3 subunidades) reconoce la secuencia específica de ADN, metila y restringe. Pero la restricción no ocurre en el sitio de reconocimiento, sino que es al azar y en sitios distantes al de reconocimiento.

Sistemas tipo II

Enzimas diferentes realizan la restricción y modificación. La restricción ocurre en el sitio de reconocimiento ó adyacente. Estas enzimas tipo II son las utilizadas en la [clonación de genes](#), puesto que permiten romper el ADN en sitios específicos, y así, recuperar secuencias conocidas.

Sistemas tipo III

Es similar al sistema tipo I, utilizan una enzima oligomérica que realiza todas las actividades enzimáticas, y rompen el ADN 25-27bp más allá del sitio de reconocimiento.⁸

Se han identificado más de 2300 endonucleasas de restricción tipo II. Se denominan isoesquizómeros a aquellas enzimas que han sido obtenidas de diferentes especies de bacterias, pero que reconocen la misma secuencia de ADN.

Las enzimas tipo II, dependiendo de su especificidad, al romper el ADN pueden provocar dos tipos de cortes:

- Cortes escalonados, dejando productos con extremos complementarios (cohesivos) Ej: Eco RI
- Cortes simétricos, dejando productos con extremos ciegos o rasurados. Ej: Alu I

Con ayuda del análisis del perfil de restricción podemos diferenciar entre las diversas secuencias obtenidas, y probar la similitud o diferencia entre cada una de ellas. La combinación de dos endonucleasas permite llevar a cabo una discriminación entre diversas secuencias, más acertada para definir las especies.

Ejemplos de enzimas de restricción tipo II:

MICROORGANISMO	ENZIMA	SECUENCIA
<i>Arthrobacter luteus</i>	Alu I	AG· CT TC· GA
<i>Escherichia coli RY13</i>	Eco RI	G· AATTC CTTAA· G
<i>Escherichia coli J62</i>	Eco RV	GAT· ATC CTA· TAG
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kpn I	GGTAC· C C· CATGG
<i>Nocardia otitis-caviarum</i>	Not I	GC· GGCCGC CG CCGG· CG
<i>Haemophilus aegyptus</i>	Hae III	RGCGC· Y Y· CGCGR
<i>Haemophilus influenzae</i>	Hinf I	G· ANTC CTNA· G

Y= C ó G.

R=G ó A

N= G, A, T ó C.

2.8.2.6. Secuenciación del gen 16s rADN para la identificación.

La identificación de un microorganismo se puede realizar secuenciando algún fragmento del genoma. Se puede diferenciar un organismo de otro, comparando sus secuencias, también se puede medir la distancia evolutiva entre dos organismos por diferencias en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de macromoléculas homólogas aisladas de ellos. Estas moléculas deben estar distribuidas universalmente en el grupo que se desea estudiar y debe ser funcionalmente homóloga en cada organismo. Para comparar secuencias es necesario alinear las moléculas, por lo que deben contener regiones con similitud significativa además de las que difieren en sus secuencias. Se han utilizado proteínas como las ATPasa y RecA (proteína requerida para la recombinación genética), pero los genes que codifican para el RNA ribosomal son los más utilizados. Esto se debe a que estas moléculas son funcionalmente constantes, se encuentran distribuidas universalmente y sus secuencias son moderadamente conservadas en la mayoría de los organismos. En el caso de los procariontes, el rDNA 16S (que contiene aproximadamente 1500 nucleótidos) es el más utilizado, y el 26S para eucariontes.

Para muestras en donde se espera una gran diversidad microbiana es imposible caracterizar a todos en tan poco tiempo, por lo que se puede comenzar eligiendo una población con alguna actividad metabólica de interés.

Este trabajo pretende caracterizar sólo los microorganismos lipolíticos presentes en el Queso Cotija, con mayor actividad. Se sabe que la participación de éstos es primordial para la formación de compuestos de aroma y sabor característicos de este producto elaborado artesanalmente, del cual se conoce que no existe ningún otro queso documentado en México que se le parezca, por lo cual se pretende obtener una denominación de origen.

El uso de técnicas moleculares basadas en la secuencia de alguna región variable del ADN hace que la identificación de microorganismos sea más acertada, en comparación al solo uso de técnicas tradicionales de microbiología; por lo tanto, una combinación de éstas ayudará a obtener una buena identificación de los microorganismos para este proyecto.

3. HIPÓTESIS:

*S*i el aroma y el sabor de los quesos son debidos en gran parte a la actividad lipolítica de los microorganismos presentes durante la maduración, entonces el queso Cotija al ser un producto madurado y de intenso aroma presentará microorganismos con una actividad lipolítica significativa.

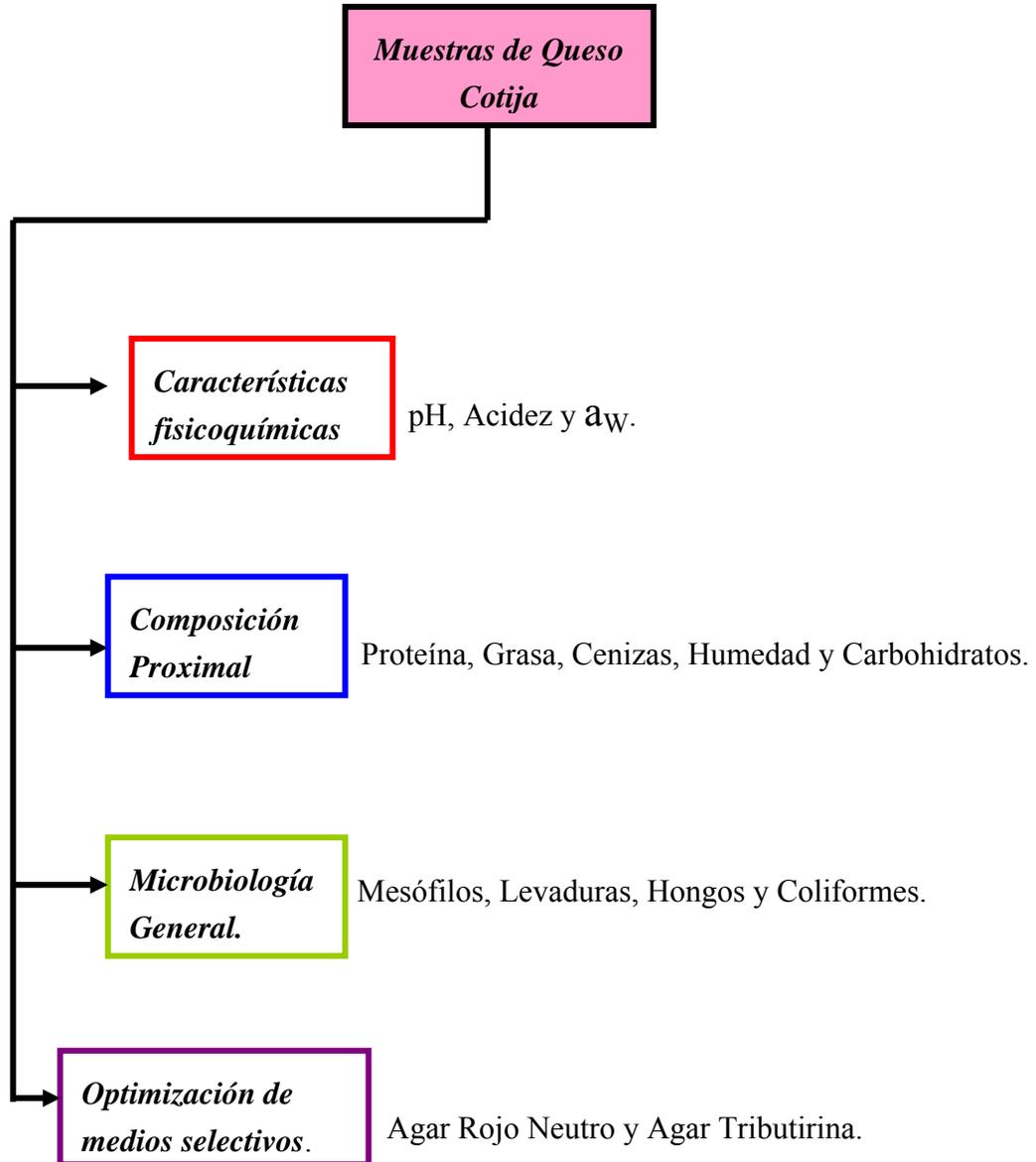
4. OBJETIVO GENERAL:

- Aislar, purificar e identificar los microorganismos que presenten mayor actividad lipolítica, a partir muestras de queso Cotija, de diferentes grados de maduración provenientes de la región productora de los estados de Michoacán y Jalisco.

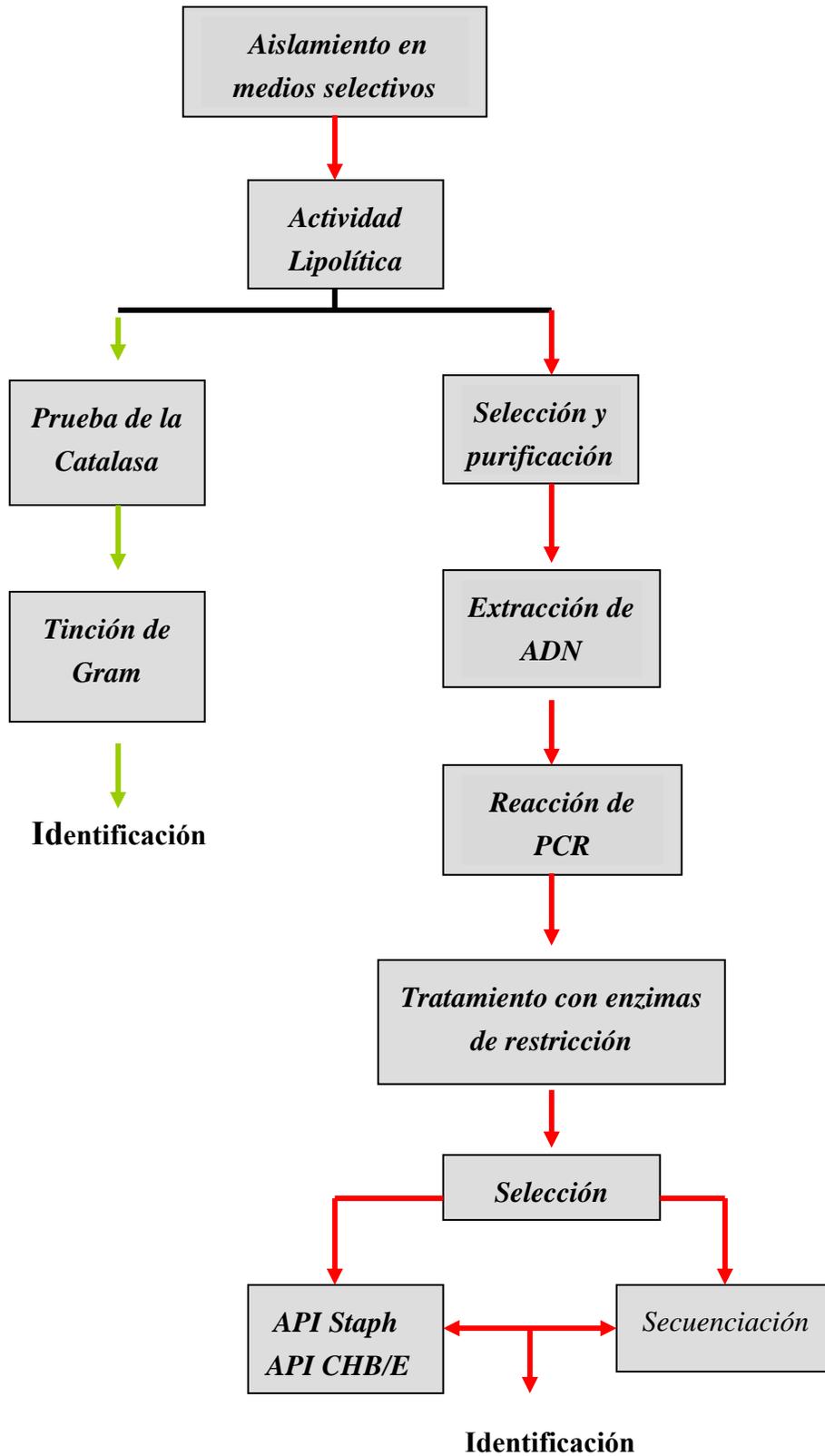
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Conocer la composición proximal y las características fisicoquímicas del queso a analizar en términos de a_w , acidez y pH.
- Evaluar la calidad microbiológica de las muestras:
 1. Cuenta en palca de mesófilos aerobios.
 2. Cuenta en placa de hongos y levaduras.
 3. Coliformes por NMP.
- Establecer y optimizar los medios utilizados para aislar microorganismos lipolíticos.
- Aislar y purificar los microorganismos con mayor actividad lipolítica, de las diferentes muestras, en los medios optimizados.
- Identificar las colonias lipolíticas seleccionadas mediante:
 1. Técnicas de microbiología tradicional, como morfología colonial, características microscópicas y pruebas bioquímicas.
 2. Técnicas moleculares.

5. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.



Segunda parte:



6. METODOLOGÍA:

MUESTRAS

Se analizaron seis muestras de Queso Cotija de la región de Jalisco:

Muestra	Tiempo de maduración	Lugar de Origen
E.V	De 6 meses a 1 año	Cotija, Michoacán
C.I	De 6 meses a 1 año	Cotija, Michoacán
C.II	Mayor a un año	Cotija, Michoacán
C.C	Mayor a un año	Cotija, Michoacán
S.M.O	De 6 meses a 1 año	Santa María del Oro, Jalisco
S.M.M	Aprox. 2 años	Santa María del Oro, Jalisco

Según la clasificación de los quesos determinada en las Reglas de Uso, todas las muestras se considerarían como “quesos rendidos”, ya que tienen más de seis meses de maduración.

Conservación y muestreo.

Todas las muestras antes del análisis se encontraban almacenadas en un ultracongelador a -70° C, dentro de bolsas estériles.

Para realizar el análisis físicoquímico y microbiológico, primero se descongelaron las muestras de la siguiente forma: fueron transferidas del ultracongelador a un refrigerador (a 4° C) durante 48 horas.

Después en condiciones de esterilidad las muestras se transfirieron a otra bolsa estéril y seca, las seis piezas de queso fueron desmoronadas en pedazos pequeños y posteriormente homogenizadas para hacer representativa la toma de muestras se apartó una fracción de queso para el análisis microbiológico en una segunda bolsa estéril y se mantuvo bien cerrada hasta su análisis, el resto se utilizó para realizar el análisis físicoquímico.

Las muestras se almacenaron en refrigeración (4° C).

EL ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

En todos los casos se realizaron los análisis por triplicado, a menos que se indique otra cosa.

-Determinación de %acidez y pH. ^{24,26}

La preparación de las muestras para la determinación de pH, como para la de % de acidez, se realizó en conjunto.

Procedimiento:

Se pesaron 9g de queso bien desmoronado. Se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250mL y se le adicionaron 100mL de agua destilada (previamente ajustada a pH=7) a 40° C.

Posteriormente, las muestras se dejaron en agitación a 175rpm por 15 minutos, a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo se filtró para separar los residuos sólidos y la grasa, con ayuda de una capa de gasa.

Del filtrado se tomaron 25mL y se pasaron a un matraz erlenmeyer de 100ml, para determinar la acidez por titulación con NaOH 0.1N y fenolftaleína al 1%(como indicador ácido-base).

El % de acidez se reportó como % de ácido láctico, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ácido láctico} = \frac{(\text{ml de NaOH } 0.1\text{N} * 0.09 *)}{\text{g de muestra}} * (100)$$

Al resto del filtrado, se le realizó la determinación de pH usando un potenciómetro (Marca Beckman, modelo 34 pH Meter) previamente calibrado.

Ejemplo del cálculo:

Para un queso al titularlo se obtuvo 0.3ml de NaOH 0.1N gastados.

$$\% \text{ Acidez} = (0.3\text{ml} * 0.1\text{N} * 0.09) / 9\text{g} = 0.12$$

(Normas: NMX-F-206- 1986 y NMX-F-099-1970).

-Determinación de a_w :

Técnica.

Las muestras de queso desmoronado se repartieron en varias placas.

Se colocaron las diferentes muestras de queso procurando que no se llenaran, que las partículas de muestra estuvieran lo más pequeñas posibles y bien distribuidas dentro de las placas.

Después se les colocó el sensor y se tomó la medición con el equipo AwQuick, marca Rotronic, con un sensor AwVC, a 25° C.

ANÁLISIS PROXIMAL

-Cuantificación de proteína.¹⁸

Determinación de proteína cruda por el método de Kjeldahl.

Procedimiento:

Se pesaron 0.2g de queso (en un cuadro de papel del residuo de parafilm) y se introdujeron en un tubo de Kjeldahl, se agregó una pastilla digestiva (sulfato de cobre pentahidratado y sulfato de potasio o sodio) y 10ml de ácido sulfúrico concentrado.

Los tubos de las muestras se colocaron en el digestor (Digest-kjeldahl), se accionó la trampa de succión de gases, y se dejó digerir hasta la destrucción total de la muestra, es decir, hasta que el líquido quedó transparente, con una coloración azul verdosa (leer instrucciones de manejo del equipo).

Una vez finalizada la digestión, sin retirar la unidad de evacuación de gases, se dejaron enfriar los tubos. Una vez fríos, se desconectó la trampa de gases.

Después los tubos se destilaron uno por uno, en el destilador (Destillador-kjeldahl) con NaOH 1:1.

El producto destilado se recibió en un matraz erlenmeyer de 125ml, al que se le agregaron 50ml de ácido bórico al 4%, con 10 gotas de indicador (verde de bromocresol al 0.1% virará del color azul al verde) se dejó de burbujear hasta que se obtuvo un volumen de 50ml.

El contenido del tubo se desechó y el contenido del matraz destilado se tituló con HCl 0.1N, hasta que se observó el vire.

Se anotaron los volúmenes obtenidos de HCl 0.1N.

Nota: se realizó el análisis a un tubo que fue el blanco, al cual se le agregó todo menos la muestra, y un tubo testigo que llevó hemoglobina en lugar de la muestra.

Se obtuvo el % de nitrógeno con la siguiente fórmula:

$$\% \text{de nitrógeno} = \frac{(\text{ml muestra} - \text{ml de blanco}) * N (\text{HCl}) * 0.014 * 100}{\text{peso de la muestra en gramos}}$$

Con el dato anterior se calculó %de proteína cruda:

%proteína cruda = % de nitrógeno * factor de conversión de proteína (para el queso es de 6.38).

-Determinación de humedad. ²⁴

Se realizó por el método Secado con estufa a vacío (marca National Appliance Company, modelo 5831).

Procedimiento:

Se colocaron a peso constante los pesafiltros, en los que se pesó la muestra, durante dos horas en una estufa a 90° C. Se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron.

En cada pesafiltro se pesaron 2 gramos de la muestra molida o rayada y se distribuyó uniformemente.

Se colocaron los pesafiltros con las muestras en la estufa a vacío con las siguientes condiciones: temperatura de 92 ° C y presión de 12KPa, de 5 a 6 horas aprox.

Después se transfirieron los pesafiltros al desecador y se dejaron enfriar, luego se pesaron hasta que se obtuvo el peso constante.

Se calculó el porcentaje de humedad por diferencia tomando en cuenta la cantidad de muestra con la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Peso del pesafiltro} + \text{muestra húmeda}) - (\text{peso del pesafiltro} + \text{muestra seca}) * 100}{\text{Peso de la muestra en gramos}}$$

También obtuvimos por diferencia la cantidad de sólidos totales.

Ejemplo de cálculo:

Peso constante del pesafiltro = 13.8152g

Muestra húmeda = 2.0012g

Muestra + pesafiltro sin humedad = 14.8344g

$13.8151\text{g} + 2.0012 - 14.8344\text{g} = 0.982\text{g} / 2.0012\text{g} * 100 = 49\%$ de humedad
 $100\% - 49\% = 51\%$ de sólidos totales.

(Norma NMX-F-111-1984.).

-Determinación de cenizas.²⁷

Procedimiento:

Se colocaron los crisoles a peso constante en una mufla a $550^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$, durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo se pasaron a un desecador, se dejaron enfriar, y se determinó el peso constante del crisol en una balanza analítica.

Se pesaron 3g de queso desmoronado o rayado en los crisoles y se colocaron en una parrilla, después las muestras se quemaron muy lentamente (evitar las proyecciones), hasta su carbonización total, posteriormente se colocaron los crisoles dentro de la mufla y se comenzó la calcinación completa de la muestra a 550°C durante dos horas.

Transcurrido el tiempo se verificó que las cenizas estuvieran completamente blancas o ligeramente grisáceas.

Una vez obtenidas, se sacaron y colocaron los crisoles en el desecador hasta que se se enfriaron.

Se pesaron los crisoles con las cenizas y se registraron.

El % de cenizas se llevó acabo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{(\text{peso del crisol} + \text{cenizas}) - (\text{peso del crisol})}{\text{gramos de muestra}} * 100$$

Ejemplo del cálculo:

Muestra húmeda: 2.0048g

Peso de las cenizas: 0.1116g

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Peso de cenizas (g)}}{\text{muestra húmeda (g)}} * 100$$

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{0.1116\text{g}}{2.0048\text{g}} * 100 = 5.57$$

(Norma NMX-F-701-COFOCALEC-2004).

-Determinación de grasa. ¹⁹

Para esta medición se utilizó el método de Gerber.

Procedimiento:

Se pesó directamente en el tubo fijado en el tapón de un butirómetro Gerber-Vangulik para queso, 3g de la muestra de queso molido. Se colocó el tapón con la muestra de queso dentro del butirómetro. Por la abertura superior del butirómetro, se le agregaron 15ml de ácido sulfúrico (con una densidad de 1.530 a 15° C) de manera que cubra todo el queso, después se colocaron los butirómetros en un baño maría a 65° C por 30 minutos, agitando cuidadosamente. Posteriormente, se destapó y se agregó un mililitro de alcohol isoamílico y se agitaron. Se terminó de llenar el butirómetro con ácido sulfúrico hasta que el volumen llegó aproximadamente a las 3/4 partes de la columna graduada. Se tapó la abertura superior y se metió en baño maría por 5 minutos. Se mezclaron antes de centrifugar a 2000rpm durante 5 minutos. Se volvió a incubar en baño maría por 10 minutos y se tomó la lectura llevando a la base de la columna de grasa exactamente al cero por medio de presión en el tapón del butirómetro.

-El contenido de azúcares se determinó por diferencia de la suma de los porcentajes de las pasadas determinaciones.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado para que hubiera reproducibilidad en los resultados de las pruebas.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se realiza con el fin de obtener el número de unidades formadoras de colonias presentes de los grupos microbianos generales. En todos los casos se utilizaron los medios de cultivo de la marca Oxoid.

Las diluciones se hicieron de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994, con agua peptonada (Anexo 1).

1. **Mesófilos aerobios.** Análisis realizado con variación a la NOM-092-SSA1-1994. Cuenta de bacterias aerobias en placa.

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias que se desarrollen en un medio cuya composición permite el crecimiento de un gran número de microorganismos, exento de sustancias inhibidoras y de indicadores, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio.

La dilución primaria (10^{-1}) se realizó tomando 10g de queso en 90 ml de agua peptonada al 0.1%, de ésta se realizaron las demás diluciones con agua peptonada al 0.1%. Las diluciones se prepararon por duplicado (dos series). La inoculación de las cajas se realizó por extensión de superficie en el medio Agar Cuenta en placa, adicionando un volumen de 150 μ l de cada dilución (10^{-1} - 10^{-6}), por triplicado.

Las cajas se incubaron a $37 \pm 1^\circ$ C por 48 horas.

Se obtuvo el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/g de muestra, término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa.

Para la expresión de los resultados se tomaron en cuenta cajas con colonias aisladas de entre 25 y 250 colonias.

2. **Coliformes.** La técnica utilizada para la cuenta de coliformes fue la basada en la NOM-112-SSA1-1994. Determinación de bacterias coliformes por la técnica del número más probable.

El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubadas a $35 \pm 1^\circ$ C durante 24 a 48 horas, resultando una producción de ácidos y gas, el cual se detecta por desplazamiento de volumen en las campanas de fermentación.

Se llevó a cabo la prueba presuntiva inoculando en Caldo Lauril Sulfato y la prueba confirmativa inoculando en Caldo Bilis Verde Brillante.

De acuerdo al número de tubos positivos y de la dilución en que se encuentran, se determina el NMP de acuerdo a tablas.

3. **Hongos y levaduras.** La técnica basada en la NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio

selectivo específico, acidificado a pH 3,5 e incubado a una temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

La dilución primaria (10^{-1}) se realizó tomando 10g de queso en 90ml de agua peptonada al 0.1%, de ésta se realizaron las demás diluciones en agua peptonada al 0.1%. Las diluciones se prepararon por duplicado (dos series). La inoculación de las cajas se realizó por superficie en el medio Agar papa dextrosa acidificado, adicionando un volumen de 150 μl de cada dilución (10^{-1} - 10^{-6}), por triplicado.

Las cajas se incubaron a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ por 5 días.

Se obtuvo el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/g de muestra, término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa.

Para la expresión de los resultados se tomaron en cuenta cajas con colonias de entre 10 y 150 colonias para hongos.

Ejemplo del cálculo:

dilución	10^{-5}	10^{-6}
A1	190	33
A2	119	19
B1	136	16
B2	155	9
C1	200	41
C2	120	27

$$190+119/2= 154.5 \qquad 330+190/2= 260$$

$$136+155/2= 145.5 \qquad 160+90/2= 125$$

$$200+ 120/2= 160 \qquad 410+270/2= 340$$

$$154.5+260/2= 207.25$$

$$145.5+125/2= 135.25$$

$$160+340/2= 250$$

$$207.25+135.25+250/3= 197.5 \approx 200 \text{ colonias, por lo tanto:}$$

$200 \text{ UFC} / 0.15\text{ml} * 1\text{ml} / 1 \text{ X}10^{-5}\text{g} = 1.3 \text{ X}10^8 \text{ UFC/g}$, de levaduras en agar papa-dextrosa acidificado incubadas 4 días a 25°C .

ACTIVIDAD LIPOLÍTICA. ⁴¹

El aislamiento de las colonias lipolíticas se realizó de la siguiente manera:

-A partir de las mismas diluciones utilizadas para el análisis microbiológico; en las que se hallaron colonias aisladas, se tomó el inóculo para sembrar en los medios de detección de actividad lipolítica.

Los medios de cultivo que utilizamos fueron: *Agar Tributirina para bacterias*, *Agar Tributirina para levaduras* y *Agar Rojo Neutro* con aceite de oliva (para levaduras y bacterias), ver Anexo 2. Los microorganismos lipolíticos que crecen en Agar Tributirina forman un halo claro, alrededor de las colonias, mientras que en el Agar Rojo Neutro se esperan colonias rojas o rosadas, el medio original es de un tono naranja-rojizo y cuando hay una degradación de grasa, disminuye el pH debido a que los ácidos grasos acumulados hacen que el medio se acidifique, entonces, el indicador virará a rosa o rojizo (en algunas ocasiones se observó un halo rojo alrededor de la colonia).

-Los microorganismos lipolíticos que crecieron, se aislaron y purificaron en los mismos medios (sembradas por agotamiento para obtener colonias aisladas), hasta que se obtuvieron colonias puras.

Para posteriores determinaciones, se eligieron únicamente las colonias que presentaron la mayor actividad lipolítica de todos los quesos analizados.

-Después se realizó una resiembra de cada microorganismo, en los diferentes medios con los que se trabajó, por ejemplo, los que crecieron en Agar Tributirina se inocularon en Agar Rojo Neutro y viceversa para valorar la eficacia de los medios y conocer si el microorganismo pudiera crecer en los dos.

Comparación de la Actividad Lipolítica

Para seleccionar a los microorganismos con mayor actividad lipolítica se sembraron en agar tributirina y se midió el tamaño de halo producido de la siguiente forma:

-Se hizo uso de una caja petri cuadrículada (el número de cuadros se consideró en relación al número de colonias que se quieren comparar), que se llenó con el medio de cultivo selectivo; que en este caso fue el Agar Tributirina.

-Se inocularon todos los microorganismos por picadura, cada uno en el centro de cada cuadro.

-Una vez inoculada, se incubó la caja a 37° C y, a las 24 y 48 horas se midió el tamaño de halo de cada colonia.

CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA.

La caracterización microscópica del microorganismo se realizó con una *tinción de Gram*, para definir el grupo al que pertenecían (levaduras, bacterias u hongos). Se utilizó un microscopio marca Olympus CX31 con interfase a la computadora (Olympus U-CMAD3).

La tinción de los microorganismos se realizó con cultivos jóvenes de 24 horas de crecimiento.

PRUEBA DE LA CATALASA.

Esta prueba se realizó agregando peróxido de hidrógeno a una colonia aislada de cada microorganismo lipolítico; y se observó la aparición de burbujas, pues si esto ocurre, la prueba es positiva e indica la presencia de la enzima peroxidasa.

EXTRACCIÓN DE ADN

➤ Para bacterias.

Para realizar la extracción de ADN, se tomaron colonias puras crecidas en el medio lipolítico sólido correspondiente.

Se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5mL (limpio y estéril), una cantidad de colonias que asemejan en tamaño a un de grano de arroz y se siguió el procedimiento de extracción con Fenol-cloroformo-Isoamílico (25:24:1); mostrado en el Anexo 3.

➤ Para levaduras.

En la extracción de ADN de levaduras se llevaron acabo los siguientes pasos previos:

- a. Inocular dos asadas de la colonia de levaduras, en 10 mL del Caldo YM (Anexo 2).
- b. Incubar a 200rpm de 18-24 horas a 30° C.
- c. Centrifugar a 15,000rpm por 10 minutos a 4° C.
- d. Se realizan dos lavados de 10 mL c/u, con agua destila estéril. Resuspender con vortex y centrifugar a las mismas condiciones anteriores.
- e. Pasar el paquete celular a un tubo eppendorf nuevo y estéril, y lavar con 1 mL de Buffer TE.
- f. Centrifugar a 15,000rpm por 10 minutos a 4° C.

Después se elimina el sobrenadante y se continúa con el método de extracción para levaduras con fenol-cloroformo-isoamílico, mostrado en el Anexo 4.

El ADN extraído se observó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.
Se cargó en cada pozo: 2µL de buffer de carga + 8µL del ADN extraído.

CUANTIFICACIÓN DE ADN

La cuantificación del ADN extraído se realizó midiendo la absorbancia a 260nm en diluciones 1:100 del templado con agua destilada, filtrada estéril.

Se cuantificó DNA extraído, a 260nm, con ayuda de la siguiente relación:

$$\mathbf{1 A_{260nm} = 50 \mu g / ml \text{ de DNA.}}$$

Ejemplo:

Un tubo de ADN con dilución 1:100, obtuvo una $A_{260nm} = 0.45$.

$$0.45 A_{260nm} * \frac{50 \mu g / ml}{1 A_{260nm}} * \frac{100}{1} = 2250 \mu g / ml \text{ de ADN} = 2250ng/\mu l \text{ de ADN}$$

Con la relación 260nm/280nm se relacionó la cantidad de ADN en comparación a la de proteína presente, para indicar la calidad de las muestras, esperando una relación arriba de 1.7.

REACCIÓN DE PCR.

Se realizó la amplificación del ADN que codifica para la región V3 de la subunidad 16s ribosomal en bacterias y el 26s ribosomal en eucariontes (para el caso de las levaduras), para después obtener la secuencia de la huella digital de los microorganismos.

Reacción de PCR en BACTERIAS

Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR en bacterias

Reactivos	Conc. inicial	Conc. Final	Una Rx (μL)	Para 25 Rx's (μL)
Amortiguador	10x	1x	2.5	62.5
MgCl₂	50mM	2.5mM	1.25	31.25
dNTP's	2.5mM	0.2mM	2	50
Primer 338F	10μM	0.4mM	1	25
Primer 518R	10μM	0.4mM	1	25
Taq. Diluida	2.5U/μL	0.05U/ μL	0.5	12.5
Agua			6.75	168.75
Templado	10 ng/ μL	4 ng/ μL	10	

Volumen de reacción: 25 μL

Los tubos de reacción se llenaron con las cantidades indicadas en la tabla 3.

A la mezcla de reacción se le agregó el ADN molde y la enzima polimerasa taq se agregó en último lugar.

Se utilizaron los siguientes cebadores universales:

	SECUENCIA	POSICIÓN	REGIÓN	APLICACIONES EN ALIMENTOS
338f	5'ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'	338-357	16S V3	Se ha utilizado en productos lácteos, agua mineral y pozol
518r	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'	518-534		

(Ercolini Danilo, 2003)¹¹

Condiciones del termociclador (Marca Techgene, Techne):

Tiempo aprox. 2.5 horas

No. de Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	5 min
20	94°C	1 min
	65°C	1 min
	72°C	3 min
10	94°C	1 min
	55°C	1 min
	72°C	3 min
1	72°C	10 min

(Muyzer et al,1999).²²

Al final de la reacción se espera obtener un amplicón de 250 pb, para bacterias.

Reacción de PCR en LEVADURAS

Los tubos de reacción llevaron las cantidades indicadas en la tabla de abajo, así como también el orden en que son adicionados

Tabla 4. Componentes de la reacción de PCR en levaduras

Reactivos	Conc. inicial	Conc. Final	Una Rx (µL)	Para 9 Rx's (µL)
Amortiguador	10x	1x	2.5	22.5
MgCl₂	50mM	3.0mM	1.5	13.5
dNTP's	2.5mM	0.2mM	2	18
Primer NL1	10µM	0.5mM	1.25	11.25
Primer NL2	10µM	0.5mM	1.25	11.25
Taq. Diluida	2.5U/µL	0.05U/ µL	0.5	4.5
Agua			6	67.5
Templado	10 ng/ µL	4 ng/ µL	10	

Volumen de reacción: 25 µL

A la mezcla de reacción se le agregó el ADN molde y la enzima polimerasa taq se agregó en último lugar.

Se utilizaron los siguientes cebadores universales:

	SECUENCIA	POSICIÓN	REGIÓN	APLICACIONES EN ALIMENTOS
NL1	5'GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G 3'	63-88	26S	EN LECHE
NL4	5'GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3'			

(Muyzer et al,1999)²²

Condiciones del termociclador (Marca Techgene, Techne):

Tiempo aprox. 2.5 horas

Ciclos	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95°C	1 min	
Desnaturalización	94°C	1 min	36 ciclos
Alineamiento	65°C	1 min	
Extensión	72°C	3 min	
Extensión final	72°C	7 min	

Al final se espera un amplicón de aproximadamente 560pb para levaduras.

En todos los casos se agregó la polimerasa Taq Platinum, marca Invitrogen.

Los productos de PCR se verificaron con una electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

Se cargó 4µL de producto de PCR + 2µL de buffer de carga + 4µL de agua.

Para comparar el tamaño del amplicón, se utilizó un marcador de peso molecular (O'RangeRuler 50 pb DNA ladder ready to use, marac Fermentas).

TRATAMIENTO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para realizar el análisis de restricción, seleccionamos dos endonucleasas de restricción, con las cuales se lograron obtener fragmentos de hidrólisis del amplicón obtenido del ADN de cada microorganismo.

1. Se probaron las siguientes endonucleasas de restricción:

Tabla 5. Endonucleasas de restricción.

ENZIMA	ESPECIFICIDAD	TEMP. ÓPTIMA	BUFFER
Hae III	GG↓CC	37°c	10x
Hinf. I	G↓ANTC	37°c	2 10x
Bgl I	GCCNNNN↓NGGC	37°c	Quantium10x
Bgl II	A↓GATCT	37°c	H 10x
EcoRI	G↓AATTC	37°c	H 10x
Kpn I	GGTAC↓C	37°c	L 10x
Pst I	CTGCA↓G	37°c	H 10x
Sal I	G↓TCGAC	37°c	H 10x
Sau 3AI	↓GATC	37°c	H 10x

2. Para la mezcla de reacción en cada tubo se tomaron como base las cantidades señaladas en la siguiente tabla:

- 3.

Tabla 6. Componentes para el tratamiento de restricción.

	Ci	Cf	Vol. (μL)
Producto de PCR	-		10
Enzima	10 U/μL	1 U/μL	2*
Buffer	10x	1x	2
Agua	-		6
Volumen de reacción			20 μL

*La cantidad de enzima depende de la concentración de ésta.

4. Una vez completos todos los tubos con las diferentes enzimas (por duplicado), se llevó a cabo la digestión a 37° C; y se trabajó con dos tiempos de digestión, uno a 12 horas y el otro a 24 horas.
5. Después de probar la eficiencia de cada una de las enzimas, seleccionamos dos, y con éstas, se realizó el análisis de restricción correspondiente para todos los productos de PCR.

Los fragmentos obtenidos por el producto de restricción, se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Se cargaron en cada pozo: 10µL del producto de restricción y 3µL del buffer de carga.

PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Los amplicones seleccionados para secuenciar debieron ser purificados con ayuda de un kit de purificación: High Pure PCR Product Purification kit (ROCHE). Los pasos se describen en el Anexo 5.

Los productos de PCR puros se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.

Se cargó 4µL de producto de PCR + 2µL de buffer de carga + 4µL de agua.

Para comparar el tamaño del amplicón, se utilizó un marcador de peso molecular (O'RangeRuler 50pb DNA ladder ready to use, marca Fermentas).

SECUENCIACIÓN DE ADN

Los amplicones purificados se enviaron a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se utilizaron como cebadores para la secuenciación el 338F para bacterias y el NL1 en el caso de las levaduras.

PRIMER 338F (5'ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3')
--

PRIMER NL1 (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3')

(Ercolini Danilo, 2003)

Las secuencias obtenidas de cada uno de los microorganismos elegidos se capturaron y metieron a la base de datos del NCBI²¹ para conocer el género y especie de éstos.

ANÁLISIS BIOQUÍMICO (API)

Este análisis se realizó, sólo a las colonias que se identificaron como bacterias.

Se analizaron tres colonias del género de *Staphylococcus sp*, con los medios y pruebas de Api Staph y para una colonia del género *Bacillus sp*. con el medio Api 50 CHB/E y las pruebas Api 50 CH.

La preparación del inóculo y la inoculación de las galerías se llevó a cabo con base a las instrucciones citadas en el Manual de uso proporcionado por el proveedor (Biomériux) y se describen a continuación:

Preparación del inóculo:

-En un tubo falcon de 15 ml, colocar 10ml de medio líquido nutritivo (este medio tiene que ser aquel en donde el microorganismo a estudiar crece con mayor facilidad), y esterilizar.

-Inocular el medio con el microorganismo problema. Anterior a este paso, verificar que la cepa esté pura y:

- En el caso de *Staphylococcus*, que pertenezca al género de los *Micrococcaceae* (cocos, Gram positivo y catalasa positivo).
- En caso de *Bacillus*, especies que pertenezcan a bacilos esporulados, aerobios estrictos, Gram positivo y facultativos.

-Después de inocular, incubar el medio a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ de 18 a 24 horas, a 250rpm. para realizar la prueba se recomienda utilizar cultivos jóvenes (18-24horas).

-Transcurrido el tiempo de crecimiento, centrifugar a 3600rpm durante 15 minutos.

-Desechar el sobrenadante y lavar el paquete celular con 2ml de solución salina isotónica estéril, y centrifugar a 3600rpm durante 10 minutos. Realizar dos lavados y disolver el paquete celular en 2ml de la solución salina isotónica.

-Realizar la medición de turbidez a 600nm, colocando en un tubo limpio 5ml de agua destilada estéril y agregando gota por gota de la solución con las células, hasta alcanzar una $A_{600nm} = 0.468$ (la absorbancia corresponde al patrón número 2 de McFarland).

*Nota: contar el número de gotas (n), utilizar como blanco agua destilada estéril.

-Una vez que se alcanzó la turbidez requerida, colocar el volumen de 2n de la solución salina que contiene el paquete celular, en el medio para la prueba correspondiente, Api Staph médium o Api 50 CHB/E. Obtener una suspensión bacteriana homogénea.

La inoculación de las galerías se resume en el siguiente cuadro, para los dos géneros de *Staphylococcus* y *Bacillus*, respectivamente.

API Staph	API 50 CHB/E
<p>*Reunir fondo y tapa de la cámara de incubación y repartir aproximadamente 5ml de agua destilada o desmineralizada en los alveólos para crear humedad.</p> <p>*Con ayuda de una pipeta, rellenar la galería Api Staph Medium.</p> <p>*Rellenar solo los tubos, no las cúpulas y evitar la formación de burbujas.</p> <p>*Crear anaerobiosis en los test <u>ADH</u> y <u>URE</u>, rellenando la cúpula con aceite de parafina para provocar un menisco convexo.</p> <p>*Cerrar la cámara de incubación y etiquetar.</p> <p>*Incubar durante 18-24 horas a $37 \pm 2^\circ$ C.</p> <p>*Después de la incubación, agregar los reactivos correspondientes para las pruebas <u>NIT</u>, <u>PAL</u> y <u>VP</u> (ver Anexo).</p>	<p>* Reunir fondo y tapa de la cámara de incubación y repartir aproximadamente 5ml de agua destilada o desmineralizada en los alveólos para crear humedad.</p> <p>*Repartir Api 50 Medium preparado en los tubos de la galería Api 50 CH.</p> <p>*Rellenar solo los tubos, no las cúpulas y evitar la formación de burbujas.</p> <p>* La adición de aceite de parafina es opcional; sin embargo se desaconseja para bacterias aerobias estrictas.</p> <p>*Inocular solamente los 12 ensayos de la galería API 20 E.</p> <p>*Cerrar la cámara de incubación y etiquetar.</p> <p>*Inocular a $30-37^\circ$ C tomar lectura a 24 y a 48 horas.</p>

Después de que ha pasado el tiempo de incubación correspondiente para cada microorganismo analizado, checar las tablas de interpretación de resultados, para cada género (que aparecen en el Anexo 6) y sacar el perfil bioquímico. Una vez que lo tenemos, identificar el nombre (género y especie) del microorganismo a partir de la base de datos (V4.1):

- Con la ayuda del catálogo analítico.
- Por medio del software de identificación APiLAB Plus (bioMérieux V.3.3.3).

CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

Todos los microorganismos caracterizados se conservaron en chaquiras, almacenadas en a -70° C, para su uso futuro.

El procedimiento se describe en el Anexo 5.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

7.1. Resultados de análisis fisicoquímicos.

Para analizar los datos fisicoquímicos prescindimos de los resultados de uno de los seis quesos que analizamos, se trata del queso (S.M.O), de Santa María del Oro. La calidad microbiológica de este queso no fue buena, porque durante el almacenamiento en refrigeración que se realizó mientras se llevaba a cabo los análisis, este queso se echó a perder, lo que hizo imposible su manipulación. El queso presentó apariencia muy cremosa y viscosa y un olor a putrefacción; así como, demasiada sinéresis, lo que indica que presentaba demasiada carga microbiana, comprobado por cuantas microbiológicas.

➤ a_w :

El a_w se determinó por medio de un higrómetro, descrito en el apartado de metodología. En la Tabla 7 se describen los resultados. Se muestra el promedio de al menos dos determinaciones.

Tabla 7. Valores de a_w para las muestras de queso Cotija.

Muestra	Tiempo de maduración	A_w	%C.V
E.V	6-12 meses	0.928 ± 0.001	0.107
C.I	6-12 meses	0.907 ± 0.001	0.11
C.II	Mayor a un año meses	0.798 ± 0.002	0.25
C.C	Mayor a un año meses	0.904 ± 0.003	0.33
S.M.M	Aprox. 24 meses	0.847 ± 0.0004	0.047

En todos los casos se obtuvo un %C.V menor al 1%.

Los resultados arrojan que los quesos menos maduros tienen un a_w todavía mayor a 0.9, y los quesos con mayor tiempo de maduración tienen valores de a_w menores. El a_w refleja en cierta medida la humedad que tiene la muestra, por lo que es de esperarse que al perder humedad por el tiempo de exposición al aire durante la maduración el a_w disminuya. Ahora bien, el queso (S.M.M) es el más maduro y de éste se esperaría el valor de a_w más bajo, pero en los resultados tenemos que el queso (C.II) tiene un a_w todavía más bajo. Si se consideran

los parámetros que determinan el agua disponible, podemos decir que a este último seguramente se le agregó una mayor cantidad de sal lo que hace que el agua presente en el queso, no esté disponible para el crecimiento de los microorganismos. Estos resultados sugieren que existe una variabilidad de cada productor en cuanto a la cantidad de sal añadida para sus diferentes productos.

Pero en general, los demás quesos cumplen con lo esperado: entre más tiempo esté el queso madurando, el a_w tiene va disminuyendo, lo que ayuda a que la microbiota del queso se vaya haciendo selectiva, pues sólo crecerán aquellos que soporten a_w bajos.

➤ **ACIDEZ:**

En la Tabla 8 se presenta el promedio de las determinaciones de acidez y pH. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Tabla 8. Valores de pH y acidez para las muestras de queso.

Muestra	pH	%C.V	Acidez (% de ac.láctico)	%C.V
E.V.	6.48 ± 0.01	0.1	0.12 ± 0.00	-
C.I.	5.99 ± 0.005	0.08	0.41 ± 0.01	2.43
C.II.	5.50 ± 0.004	0.07	1.11 ± 0.009	0.81
C.C.	5.4 ± 0.008	0.14	1.24 ± 0.02	1.61
S.M.M	5.21 ± 0.008	0.15	1.75 ± 0.009	0.51

En todos los casos se obtuvo un %C.V menor al 1% en los valores de pH y un %C.V menor al 3% para los datos de acidez.

Se observa que, a medida que es más largo el tiempo de maduración, la acidez de los quesos incrementa; por la acción de la microbiota presente, que va produciendo mayor cantidad de ácido láctico en el queso. Se observa en los resultados obtenidos que los quesos de menos de doce meses de maduración tienen menor acidez, y el queso (S.M.M), es el que presentó la mayor acidez de todos los quesos, y el resultado se esperaba, pues es el que tiene cerca de dos años de maduración.

Se observa que al aumentar la acidez hay una disminución del pH en todos los quesos. Aunque se sabe que el pH puede ser modificado por otros productos de degradación, como el de proteínas (que generan pH básicos) que podrían aumentar el valor de pH.

Tabla. 9. RECOPIACIÓN DE RESULTADOS FISICOQUÍMICOS

Muestra	aw	pH	Acidez	Tiempo de maduración
E.V	0.928	6.48	0.12%	6 a 12 meses
C.I	0.907	5.99	0.41%	6 a 12 meses
S.M.O	N.D	N.D	N.D	6 a 12 meses
C.C	0.904	5.4	1.24%	Mayor a 12 meses
C.II	0.798	5.50	1.11%	Mayor a 12 meses
S.M.M	0.847	5.21	1.75%	Aprox. 24 meses

N.D.. No determinado.

7.2 . HUMEDAD.

Para la determinación de humedad se utilizó una estufa a vacío a 92 ° C con una presión negativa de 12KPa. También se probó el método de la termobalanza para determinar humedad, y se comprobó que requería demasiado tiempo y las muestras se fundían antes de que se llegara a obtener un valor de humedad constante con en el equipo. No había reproducibilidad.

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Tabla 10. Datos de humedad y sólidos totales.

Muestra	%Humedad	%C.V	%Sólidos totales	%C.V
E.V	49.3 ± 0.21	0.42	50.6 ± 0.25	0.45
C.I	45.58 ± 0.15	0.33	54.41 ± 0.15	0.27
C.C	35.74 ± 0.14	0.39	64.24 ± 0.15	0.23
C.II	27.09 ± 0.07	0.26	72.93 ± 0.03	0.04
S.M.M	21.55 ± 0.004	0.018	78.44 ± 0.02	0.02

En todos los casos se obtuvo un C.V menor al 1%.

Los quesos E.V y C.I, son las muestras de queso que tienen un menor tiempo de maduración, por lo cual, tienen humedad más alta, en comparación a los restantes. Se observa que el producto de mayor tiempo de maduración (S.M.M) es el que presenta menor humedad. De acuerdo a estos resultados se observa que los quesos pierden humedad mientras aumenta el tiempo de maduración, pues éstos se van secando y la superficie expuesta al aire se va secando primero y se torna más dura y firme (se forma una costra).

La formación de corteza se observó en los quesos maduros y muy maduros, que se encontraban muy duros y fue más difícil cortarlos.

7.3.GRASA.

En la Tabla 11 se resumen los valores de los porcentajes de grasa para cada queso. Los promedios muestra el promedio de tres determinaciones.

Tabla 11. Valores de contenido de grasa en los quesos.

Muestra	Tiempo de maduración	%Grasa	%C.V
E.V	6-12 meses	24.66 ± 0.2	0.811
C.I	6-12 meses	22.6 ± 0.24	1.05
C.C	Mayor a un año meses	26.6 ± 0.24	0.902
C.II	Mayor a un año meses	33.5 ± 0.41	1.22
S.M.M	Aprox. 24 meses	40.66 ± 0.94	2.31

En todos los casos se obtuvo un %C.V menor al 3%.

7.4.PROTEÍNA.

Los resultados de proteína se resumen en la siguiente tabla, mostrando los promedios de determinaciones por triplicado.

Tabla 12. Porcentaje de proteína cruda en quesos.

Muestra	% N	% Proteína	%C.V
E.V	2.9	18.52 ± 0.66	3.56
C.I	3.60	22.95 ± 0.17	0.74
C.C	4.36	27.88 ± 0.82	2.94
C.II	4.84	30.87 ± 0.29	0.93
S.M.M	4.28	27.37 ± 0.18	0.65
*ESTANDAR 1	14.62	91.40	
BLANCO 0.35 ml gastados de HCl 0.1N			

*El estándar es de hemoglobina.

7.5.CENIZAS.

Las determinaciones de cenizas se realizaron por triplicado y los promedios se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 13. Contenido de cenizas en muestras de queso Cotija.

Muestra	% Cenizas	% C.V
E.V	5.99 ± 0.03	0.53
C.C.	6.04 ± 0.05	0.76
C.I.	6.99 ± 0.13	1.86
C.II.	8.86 ± 0.01	0.09
S.M.M.	5.60 ± 0.05	0.83

En todos los casos se obtuvo un %C.V menor al 2%.

La cantidad de carbohidratos se obtiene por diferencia de los demás componentes, los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla.14. ANÁLISIS PROXIMAL DE LOS DIFERENTES QUESOS COTIJA.

QUESO	HUMEDAD (%)	PROTEÍNA (%)	GRASA (%)	CENIZAS (%)	AZUCARES (%)
<i>E.V.</i>	<i>49.30</i>	<i>18.52</i>	<i>24.66</i>	<i>5.99</i>	<i>1.53</i>
<i>C I</i>	<i>45.58</i>	<i>22.95</i>	<i>22.60</i>	<i>6.99</i>	<i>1.88</i>
<i>C.C</i>	<i>35.74</i>	<i>27.88</i>	<i>26.60</i>	<i>6.04</i>	<i>3.74</i>
<i>C.II.</i>	<i>27.09</i>	<i>30.87</i>	<i>33.50</i>	<i>8.86</i>	<i>0.0</i>
<i>S. M.M.</i>	<i>21.54</i>	<i>27.37</i>	<i>40.66</i>	<i>5.60</i>	<i>4.89</i>

Para realizar un mejor análisis de la composición de todos los quesos, se muestran los valores en base seca en la Tabla 15 y en la Figura 4.

En el grupo de trabajo se llevó a cabo el análisis proximal de varios quesos elaborados de la manera tradicional por productores de La Asociación Regional de Productores de Queso Cotija, quienes han estandarizado el proceso de producción y tratan de utilizar leche de una calidad y composición uniforme. En la tabla 16 se muestran estos resultados en una propuesta de composición de lo que se denominaría un queso auténtico, con un tiempo de maduración máximo de tres meses.

Tabla.15 Datos en base seca de las muestras de queso Cotija.

Muestras	Proteína %	Grasa %	Cenizas %	Carbohidratos %
E.V	<i>36.50</i>	<i>48.65</i>	<i>11.83</i>	<i>3.00</i>
C.I	<i>42.24</i>	<i>41.65</i>	<i>12.85</i>	<i>3.40</i>
C.C	<i>43.38</i>	<i>41.50</i>	<i>9.40</i>	<i>5.82</i>
C.II	<i>42.31</i>	<i>45.94</i>	<i>12.15</i>	<i>0.0</i>
S.M.M	<i>34.88</i>	<i>51.74</i>	<i>7.14</i>	<i>6.23</i>

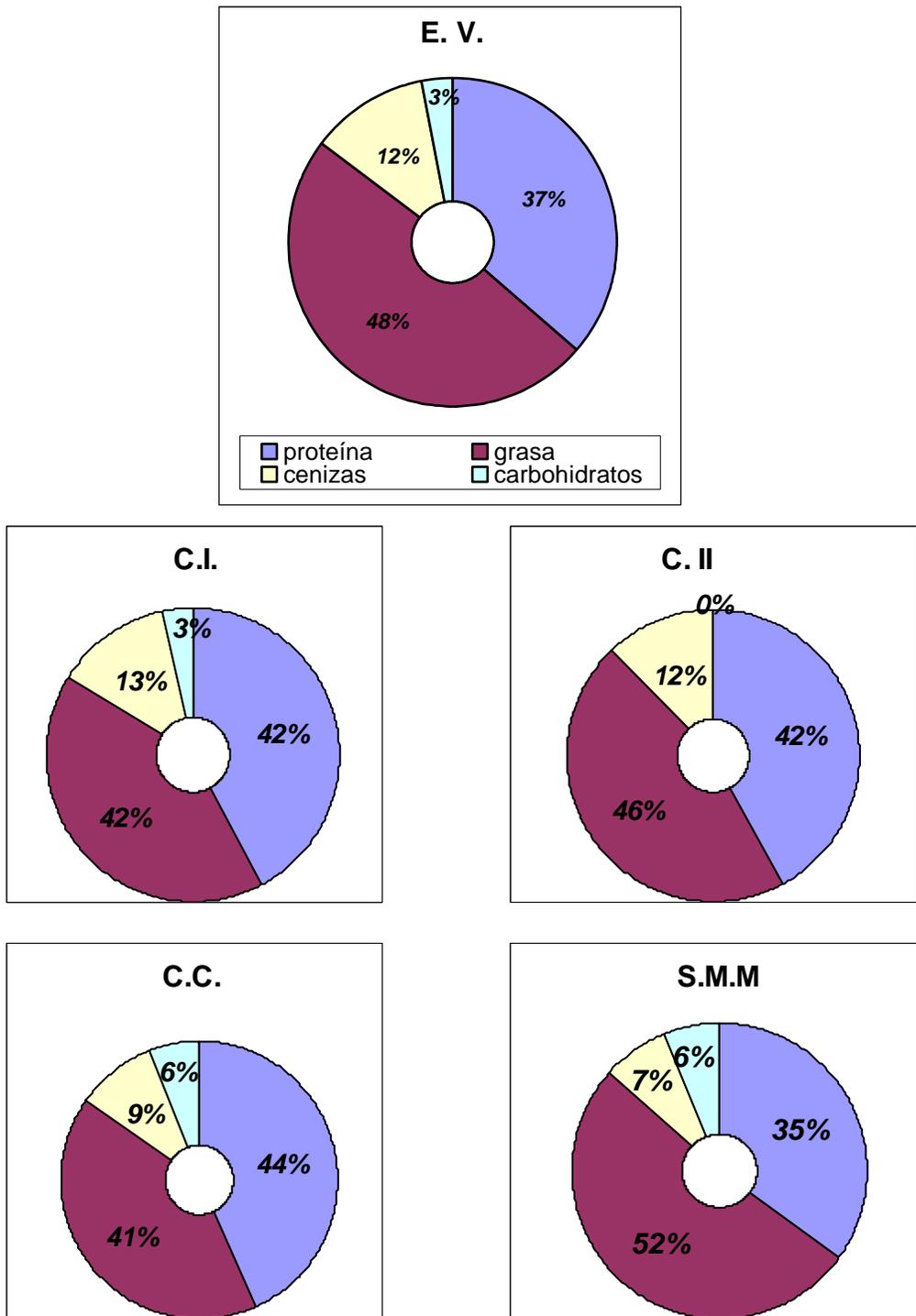


Figura. 4. Gráficas de Análisis Proximal de los diferentes quesos, con datos en Base Seca.

Se observa una variabilidad significativa entre las muestras analizadas que puede relacionar principalmente con la composición de la leche utilizada en su elaboración.

Los quesos E.V y S.M.M presentan una menor cantidad de proteína, pero mayor contenido de grasa; mientras que los otros tres tienen valores semejantes de esos componentes. Esta variabilidad se puede deber al tipo de ganado, por ejemplo, se sabe que las vacas de raza Holstein dan leche con una menor cantidad de grasa. Y en una práctica de campo realizada al lugar, se observó que todos los productores tienen vacas de diferentes razas, lo que contribuye a que se pueda dar este tipo de variaciones en la leche, cuando se realiza la mezcla de todas. Aunque también se debe a la temporada de elaboración del queso y al tipo de alimentación de las vacas.

En los quesos analizados se puede presentar esta última diferencia, ya que no se sabe la raza del ganado de cada productor ni la temporada en que se elaboró cada queso; aunque es conocido que la alimentación de las vacas es de libre pastoreo.

Dadas estas diferencias en composición, es importante la labor que la Asociación de Productores está realizando, ya que se han establecido algunos parámetros necesarios para considerar que el producto es auténtico. Por ejemplo, se establece que el queso se debe elaborar en época de lluvia (temporada ideal para que las vacas tengan una buena alimentación), pues dan leche con más cantidad de grasa y proteína, lo que conlleva a un queso de mejor calidad.

Con respecto a los valores de cenizas, tenemos que los quesos C.I y C.II presentan los valores más altos de cenizas en comparación a los demás quesos. La cantidad de cenizas es un indicador de la cantidad de cloruros en el queso, y básicamente la mayor parte de cloruros provienen de la sal adicionada a éstos, por lo que se puede inferir que a los quesos C.I y C.II se les agregó una mayor cantidad de sal. Esto confirmaría por qué el queso C.II tiene el valor de a_w más bajo, incluso menor que el S.M.M que tiene mayor tiempo de maduración.

Tabla 16. Propuesta de la Composición del queso Cotija auténtico.

Composición química	Base Seca
Proteína (%)	Mínimo 39
Grasa butírica (%)	Mínimo 32
Minerales (%)	8-11
NaCl (%)	4-7.5
Carbohidratos totales (%)	4.5-11.0

a_w	Máximo 0.90
pH	4.8-5.2
Acidez (% ácido láctico)	0.20-0.32

(Hernández, 2006)¹⁷

Ahora bien, todos los valores de grasa que se obtuvieron en los quesos analizados en este trabajo se encuentran por arriba del límite mínimo marcado en la Tabla 16, para grasa butírica en base seca, así que con el contenido de grasa sí se cumple.

En cuanto al contenido de proteína, marca como mínimo un 39%, y dos de los quesos analizados, el E.V y S.M.M están por debajo del valor mínimo, uno con 36.52% y el otro con 34.88%, respectivamente. Pero se observa que lo que le falta de proteína, lo tiene en exceso de grasa; y eso pudiera no afectar el producto final, pues la grasa al ser utilizada como sustrato produce compuestos deseables de sabor, color y olor al queso, además que la diferencia no es excesiva.

Los valores de cenizas también se encuentran entre el rango señalado, con diferencia de los dos quesos C.I y C.II que ya se había mencionado, donde se encontró más sal añadida; pero la diferencia con el rango es mínima. Además, el contenido de sal es diferente según el productor del queso porque no se ha establecido un contenido reglamentario, entonces hasta ahora es válido encontrar diferencias en cuanto a la cantidad de la sal añadida, ya que eso, está a criterio del productor.

Con respecto al a_w nos indica que todos deben de tener un valor menor a 0.9, pues los quesos deben estar madurados al menos tres meses. De los quesos analizados tenemos que el E.V tiene un a_w de 0.928, lo que pudiera ser indicio de que el queso se vendió cuando tenía menos semanas de maduración, pero ciertamente los demás quesos cumplen con esa característica.

Los valores de acidez y pH de los quesos analizados, no entran en los rangos de la Tabla 16. Puede deberse a que en la tabla se marcan rangos para quesos de tres meses de maduración, que es cuando comienzan a comercializarlos.

Es probable que existan variaciones en estos parámetros al madurar más tiempo. Por ejemplo, se pueden producir compuestos derivados de la proteólisis que causan un aumento de pH. Y sería explicable que la acidez aumente al aumentar el tiempo de maduración.

7.6. Resultados de los análisis microbiológicos.

Se llevaron a cabo las cuentas microbiológicas de acuerdo a las normas mexicanas NOM-092-SSA-1994, NOM-111-SSA-1994 y NOM-112-SSA1-1994. Para el cálculo se tomaron las cuentas de 25-250 colonias para mesófilos aeróbios y 10-150 colonias para hongos. Cada muestra se evaluó por triplicado. En la Tabla 17 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 17. Tabla de resultados microbiológicos de todos los quesos.

<i>Muestras</i>	<i>Mesófilos Aeróbios Ufc/g</i>	<i>Levaduras Ufc/g</i>	<i>Hongos Ufc/g</i>	<i>Coliformes Nmp/g</i>	a_w	<i>Tiempo de maduración (meses)</i>
<i>E.V</i>	3.0×10^3	1.3×10^8	<10	<30	0.928	6-12
<i>CI</i>	1.3×10^7	6.4×10^6	<10	<30	0.907	6-12
<i>S.M.O</i>	1.4×10^8	5.6×10^5	<10	2.4×10^2	N.D	6-12
<i>C.C</i>	1.06×10^8	2.7×10^7	4.6×10^4	2.4×10^2	0.904	>12
<i>C II</i>	3.3×10^4	3.5×10^2 ^b	<10	<30	0.798	>12
<i>S. M.M</i>	2.8×10^4	<10	<10	<30	0.847	~24

Valor estimado: ^b

N.D. No determinado.

NOTA: Todos los cálculos se ajustaron a 1 ml, pues a las cajas se inocularon por superficie con 150µL de las diluciones. La dilución primaria es de 10g de muestra en 90ml del medio agua peptonada al 0.1%.

No hay una norma estandarizada en México para quesos elaborados con leche cruda, aunque la NOM-121-SSA-1994⁽³¹⁾ menciona al queso Cotija, lo coloca con otros quesos madurados elaborados con leche pasteurizada; y marca las siguientes especificaciones microbiológicas: coliformes ≤ 50 NMP/g, hongos y levaduras ≤ 500 UFC/g, mientras, que la norma mexicana

para quesos procesados marca las siguientes especificaciones: mesófilos $\leq 1 \times 10^5$ col/g, hongos y levaduras ≤ 40 col/g, y ausencia de coliformes y patógenos.

Aunque ninguna de estas especificaciones sería la adecuada para comparar los resultados obtenidos, se observa que las cuentas de los quesos analizados están por arriba de las especificaciones.

Es normal que en un producto elaborado con leche cruda exista una mayor cuenta de microorganismos, mesófilos, de levaduras y hongos. Lo que llama la atención es que para estos últimos las cuentas hayan sido bajas.

Ahora bien, los quesos con cuentas más bajas de todos los grupos microbianos fueron el queso C.II y S.M.M. Este último queso sólo tuvo crecimiento de mesófilos, lo que se esperaba, pues son los dos quesos más maduros y con menor a_w .

Los quesos E.V y C.I son quesos menos maduros y en éstos las cuentas son más altas que los quesos con más de 12 meses de maduración, a excepción del C.C. Y observamos que el E.V tiene muy poco crecimiento de bacterias mesófilas y mayor crecimiento de levaduras.

En el queso C.I, hay crecimiento tanto de levaduras como de mesófilos (10^{-6} y 10^{-7} respectivamente), que comparándolo con el queso C.II que proviene de la misma tienda, con cuentas bajas de éstos, podemos concluir que el tiempo de maduración es importante para que el queso se torne de mejor calidad microbiológica. Por eso se debe respetar el tiempo mínimo de maduración, que según las reglas de uso es de tres meses.

Por otra parte, para realizar el aislamiento de los microorganismos lipolíticos, se descartaron aquellos quesos que tienen presencia de coliformes (indicador de presencia de patógenos), tal es el caso del queso C.C; el cual fue el único que presentó crecimiento de hongos (4.6×10^4 UFC/g), además de cuentas altas de mesófilos (1.1×10^8 UFC/g) y levaduras, lo que habla de mala calidad durante la elaboración o maduración del queso, ver Tabla 17. Por lo anterior, el queso C.C queda descartado del análisis.

Las cuentas microbiológicas muestran diferencias significativas entre los seis tipos de quesos, anteriormente se mencionó que el queso S.M.O. se descartó del análisis porque se descompuso; pero se alcanzó a realizar el análisis microbiológico (ver Tabla 17) y los datos arrojaron presencia de coliformes y una cuenta alta de mesófilos.

7.7. Detección de microorganismos lipolíticos.

7.7.1. Optimización de medios para la detección de actividad.

Se estandarizaron dos medios de detección de microorganismos lipolíticos, el Agar Tributirina y el Agar Rojo Neutro.

Los medios optimizados se probaron cultivando un microorganismo que ya se sabe tiene actividad lipolítica, *B. pumilus* cepa GMA1 el cuál se consideró el control positivo.

La elaboración del Agar Tributirina se realizó en el laboratorio, de acuerdo a la formulación estandarizada (ver Anexo 2), no comercial, donde se le agregó glucosa al 20% como componente adicional para facilitar el crecimiento de los microorganismos lipolíticos en el medio, ya que al aislarlos del queso (con baja humedad y alto contenido de sal) muchos pudieran estar estresados y necesitar un medio más rico para crecer con mayor facilidad. Para el medio en el que se crecieron levaduras el porcentaje de glucosa fue de 0.5%, mientras que el correspondiente para crecer bacterias fue del 0.1% de glucosa (ver Fig. 5 y 6). Las formulaciones estandarizadas se muestran en el Anexo 3.

Al probar los medios, también se incluyó un medio de Agar Tributirina sin glucosa, para verificar si la adición de glucosa ayudaba al crecimiento del microorganismo o no. Los resultados obtenidos fueron que el crecimiento en Agar Tributirina con glucosa fue más rápido que en el medio que carecía de glucosa, pues el crecimiento que se observó a las 24 horas fue mayor que en el que no tenía glucosa. Sin embargo, en los medios que carecían de glucosa presentaban menor crecimiento pero la aparición de halos grandes, en comparación con los otros medios, especialmente con el medio de levaduras que tenía más glucosa y que los halos tardaban en aparecer (más de 24 horas) aunque el crecimiento era mayor.

En conclusión, a mayor cantidad de glucosa agregada al medio de crecimiento, éste es más rápido, pero la aparición del halo se retarda. Así que se utilizó un medio de Agar Tributirina con glucosa al 0.1%, tanto para bacterias como para levaduras.

Para el Agar Rojo Neutro teníamos como formulación base Agar nutritivo, aceite de olivo al 1% e indicador rojo neutro.

Al preparar el medio se utilizó caldo nutritivo, agar, NaCl, aceite de oliva al 1% y Rojo Neutro (se probó al 0.005% y al 0.05%). Se mezclaron todos los componentes con ayuda de un homogenizador, y se observó que no se homogenizaba completamente y después de esterilizado, en los medios se observaban grandes glóbulos de grasa, por lo que se le agregó un emulsificante, Tween 80 al 0.01%, con el cual se logró desaparecer los glóbulos de grasa.

Como el Rojo Neutro es un indicador de pH, el medio se ajustó a pH neutro para que así cualquier vire del indicador (a rosa-rojo) fuera debido a la acidez por producción de ácidos grasos.

Se observó que en medios con Rojo Neutro al 0.005%, el color del medio se observaba anaranjado, obteniendo crecimiento de colonias rosadas apenas distinguibles. Al aumentar la concentración al 0.05%, el medio de cultivo ya se observaba rojo y crecimiento de colonias rojas, en este último se hizo más evidente la comparación de actividad entre las colonias, ya que, se visualizaban muy rojas las de mayor actividad y rosadas las de menor actividad (ver figuras 7 y 8), lo que con la primera formulación del medio era difícil de observar y por consecuencia, diferenciar. La formulación final se muestra en el Anexo 2.

También se observó que el medio de Agar Rojo Neutro estéril, tiene vida útil de 3 a 4 semanas, en refrigeración, y es sensible a la luz, pues el medio se decolora.



Fig. 5. Control positivo en Agar Tributirina para bacterias.



Fig. 6. Control positivo en Agar Tributirina para Levaduras.

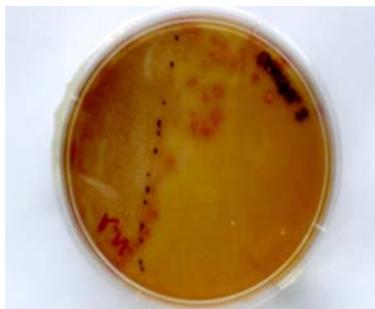


Fig.7. Control positivo *B. pumilus* en Agar Rojo Neutro al 0.005%.



Fig.8. Control positivo en Agar Rojo Neutro al 0.05%.

7.7.2. Aislamiento de microorganismos con actividad lipolítica.

Las cuentas microbiológicas y la detección de actividad lipolítica en los medios estandarizados se llevaron a cabo al mismo tiempo, por lo que, en la tabla 18 se resume el número de colonias aisladas de las seis muestras de queso.

Tabla 18. Número de colonias lipolíticas totales, registradas en los diferentes quesos.

Queso	Dilución	Medio	No. de colonias
E.V	<i>Dilución 10⁻²</i>	<i>Agar tributirina</i>	<i>1 y 2 Lev*</i>
C.I	<i>Dilución 10⁻⁴</i>	<i>Agar tributirina</i>	6
	<i>Dilución 10⁻⁴</i>	<i>Agar tributirina</i>	6
	<i>Dilución 10⁻⁴</i>	<i>Agar Rojo Neutro</i>	6
	<i>Dilución 10⁻⁴</i>	<i>Agar Rojo Neutro</i>	7
C.C	Dilución 10 ⁻⁴	Agar tributirina	10
	Dilución 10 ⁻⁴	Agar tributirina	4
	Dilución 10 ⁻⁴	Agar Rojo Neutro	7
	Dilución 10 ⁻⁴	Agar Rojo Neutro	2
	Dilución 10 ⁻⁵	Agar Rojo Neutro	1
C.II		No crecimiento	
S.M.O	Dilución 10 ⁻⁴	Agar Rojo Neutro	10
	Dilución 10 ⁻⁴	Agar tributirina	8
	Dilución 10 ⁻⁵	Agar Rojo Neutro	31
	Dilución 10 ⁻⁵	Agar tributirina	31
S.M.M	<i>Dilución 10⁻²</i>	<i>Agar Rojo Neutro</i>	18
	<i>Dilución 10⁻²</i>	<i>Agar tributirina</i>	25
	<i>Dilución 10⁻³</i>	<i>Agar Rojo Neutro</i>	1
	<i>Dilución 10⁻³</i>	<i>Agar tributirina</i>	8

*Levaduras que crecieron después de tres días.

Las colonias que se seleccionaron para el análisis son aquellas que presentaron mayor actividad lipolítica de entre todas (se presentan en cursivas en la Tabla 18), las demás quedaron descartadas.

Todas las colonias seleccionadas presentaron un olor intenso a grasa, característico del olor a queso o a patas, que se percibía al abrir las cajas de cada microorganismo, lo que indica que se producen compuestos volátiles que dan el olor al queso y reafirman la actividad lipolítica.

Del queso C.II no se pudieron aislar colonias lipolíticas, muy probablemente a causa de su bajo a_w . Mientras, que se observa que del queso C.C, se aislaron muchos microorganismos lipolíticos que formaban halos muy grandes (ver Fig. 9), que no serán tomados en cuenta para el análisis, ya que por su mala calidad se desconocería de dónde provienen y si estos pudieran ser patógenos.



Fig. 9. Colonias lipolíticas del queso (C.C).

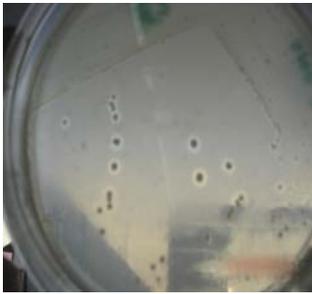
Por lo que al final sólo se contó la microbiota lipolítica de tres quesos: el E.V, C.I y S.M.M. De todas las colonias lipolíticas aisladas, sólo dos (del queso E.V), resultaron ser levaduras, las demás colonias fueron bacterias.

Todas las bacterias aisladas tenían un color entre blanco y crema, eran colonias lisas y redondas, pero variaban en cuanto a los tamaños de colonia.

Lo destacable es que las colonias lipolíticas aisladas del queso S.M.M eran las colonias más pequeñas de todas, pero crecían en abundancia. Mientras que el tamaño de las colonias de los otros quesos era mayor.

Finalmente, sólo se eligieron trece colonias de todas las obtenidas. El criterio de selección fue la presencia de la mayor actividad lipolítica, ya que sería extremadamente laborioso caracterizarlas a todas.

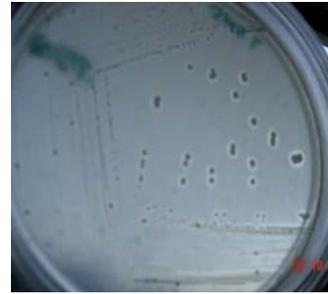
En la Figura 10 se muestran las imágenes de las trece colonias seleccionadas en medios de detección de actividad lipolítica de donde se aislaron. También se describen las características fenotípicas que se observaron de cada colonia.



Col 1. Colonias pequeñas lisas, redondas, opacas crema.



Col 2. Colonias pequeñas lisas, redondas, opacas color crema.



Col 3. Colonias pequeñas redondas, lisas, opacas crema.



Col 4. Colonias medianas lisas, redondas, opacas crema.



Col 5. Colonias grandes lisas, redondas, opacas amarillentas.



Col 6. Colonias lisas, opacas crema no uniformes y grandes.



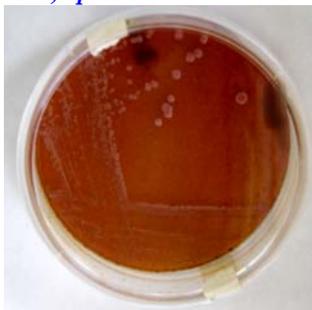
Col 7. Colonias redondas, lisas, opacas crema.



Col 8. Colonias redondas lisas, opacas crema.



Col 9. Colonias pequeñas, redondas, lisas, opacas rosas.



Col 11. Colonias redondas medianas, opacas rosas y lisas.



Col 12. Colonias lisas opacas crema, no uniformes extendidas.



Col 13. Colonias redondas lisas, opacas color crema.

Figura 10. Apariencia en placa de los microorganismos seleccionados, en medios lipolíticos.

También reaislamos todas las colonias en el medio contrario al que crecieron, para probar si crecían en ambos, esto es, las que crecieron en Agar Tributirina las sembramos en Agar Rojo Neutro y viceversa. Se observó que todas las colonias crecieron en todos los medios, así que tanto metabolizaron la tributirina (ácidos grasos de cadena corta) como el aceite de olivo (ácidos grasos de cadena larga).

7.7.3. Comparación de actividad lipolítica.

Para poder semi-cuantificar y comparar la actividad lipolítica de las trece colonias analizadas, se eligió el Agar Tributirina, pues es más factible medir el tamaño de halo y obtener diferencias numéricas. En cambio, en el Agar Rojo Neutro, aunque también se nota la diferencia de actividades en base al color, la comparación sería cualitativa y estaría basada sólo en la percepción del investigador

Así que para comparar la actividad lipolítica entre las trece colonias, utilizamos una caja con el medio Agar Tributirina cuadrículada, y medimos halos de actividad a las 24 y 48 horas. Se inoculó por picadura en el agar de manera uniforme (<0.2 mm de diámetro). Se incubaron a 37° C y a 4° C. En las figuras 11 y 12, y en las tablas 19 y 20 se muestran los resultados.

Tabla 19. Tamaño de las colonias y de halos de actividad lipolítica incubados a 37° c.

Colonia	37° C	Tamaño de colonia	<u>Ø halo a 48h</u> Ø colonia
	Halo a 48 h		
1	0.5mm	2.0mm	0.25
2	<0.5mm	1.0mm	~0.5
3	*	<1.0mm	N.D
4	2.0mm	1.5mm	1.33
5	2.5mm	7.0mm	0.35
6	6.0mm	1.2mm	5.0
7	1.2mm	1.0mm	1.2
8	7.0mm	1.5mm	4.6
9	1.5mm	<1.0mm	~1.5
10	<0.5mm	2.0mm	0.25
11	1.5mm	1.5mm	1
12	1.0mm	1.2mm	0.83
13	1.0mm	4.0mm	0.25

*Aparición de halo después de 48 horas.

Tabla 20. Tamaño de las colonias y de halos de actividad lipolítica incubados a 4° c.

Colonia	4° C	Tamaño de colonia	Ø halo a 48h Ø colonia
	Halo a 48 h		
1	1.0mm	1.7mm	0.58
2	0.5mm	1.0mm	0.5
3	*	<1.0mm	N.D
4	0.7mm	0.7mm	1.0
5	2.0mm	8.5mm	0.23
6	5.7mm	1.5mm	3.8
7	0.7mm	1.0mm	0.7
8	6.0mm	3.5mm	1.71
9	1.0mm	1.0mm	1.0
10	<0.5mm	3.0mm	~0.16
11	1.2mm	1.0mm	1.2
12	1.0mm	1.2mm	0.83
13	0.5mm	6.0mm	0.08

*Aparición de halo después de 48 horas.

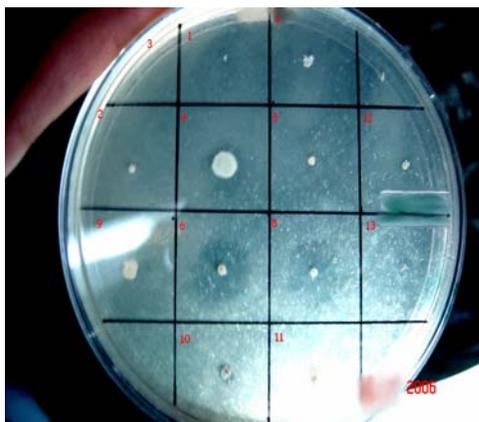


Fig. 11. Halos de actividad lipolítica.
incubados a 37° C.

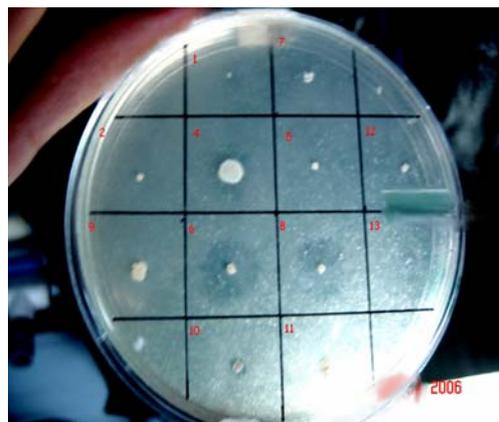


Fig. 12. Halos de actividad lipolítica.
incubados a 4° C.

Se observa que las colonias 6, 8 y 5 son las tres colonias con la mayor actividad, pues producen los halos más grandes, y presentan la misma actividad aún incubadas a temperatura de refrigeración (4° C). En general, las demás colonias también tienen actividad en refrigeración, lo que indica que podría transcurrir la lipólisis, y por lo tanto la maduración, a esa temperatura.

Pero la colonia 5 se diferencia de la 8 y la 6, pues tiene una buena actividad pero el tamaño de diámetro de la colonia es el más grande de todas las colonias (de 7 a 8mm.); en comparación

de la colonia 8 que tiene la mayor actividad y el crecimiento de la colonia es de apenas, de 1.5mm, al igual que la colonia 6. En estas últimas, hay más actividad con menos biomasa.

Las colonias aisladas del queso S.M.M son las que presentaron los halos de actividad más pequeños, pero las colonias eran también igual de pequeñas.

Hay otras colonias como la 13 donde los halos a penas son de 0.5mm, mientras que el diámetro de su colonia es de entre 4 y 6mm; aquí hay poca actividad y mucha biomasa. Lo mismo pasa con la colonia 10 y la 1. Las demás tienen el tamaño de halo casi de la misma medida que el diámetro de su colonia.

Entre levaduras, la 6 tiene mejor actividad, que la 12, pero el diámetro de sus colonias es semejante.

Las colonias que presentaron la mayor actividad tuvieron que ser reaisladas en un medio nuevo a las dos semanas, ya que consumieron el medio demasiado rápido a comparación de las demás, y también porque todas siguieron teniendo la misma actividad aún almacenadas en refrigeración.

7.8. Caracterización microscópica.

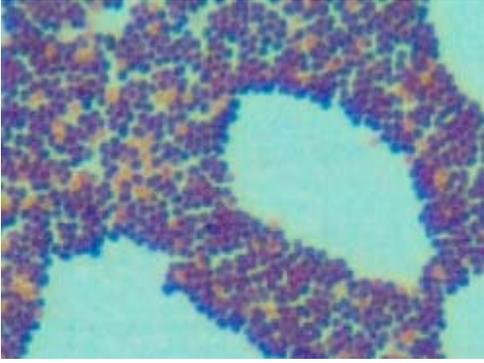
En las imágenes de la Figura 13 se observa la morfología microscópica de las colonias seleccionadas.

De las trece colonias solo dos son levaduras, la colonia 6 y la 12, las restantes son bacterias y todas son cocos gram (+) agrupados o en racimos, a excepción de la colonia 5, donde aparecen bacilos cortos gram (+), y la colonia proviene del queso (E.V) al igual que las dos levaduras (Tabla 21).

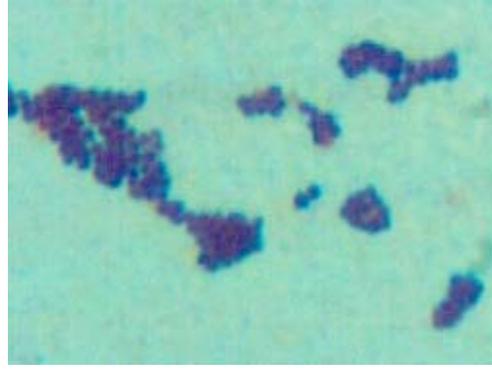
Todas las bacterias son gram positivas.

Y aunque las colonias lipolíticas del queso C.C, no se tomaron en cuenta, también se les realizó el Gram correspondiente, y en todas se obtuvieron cocos gram (+), agrupadas o en racimos.

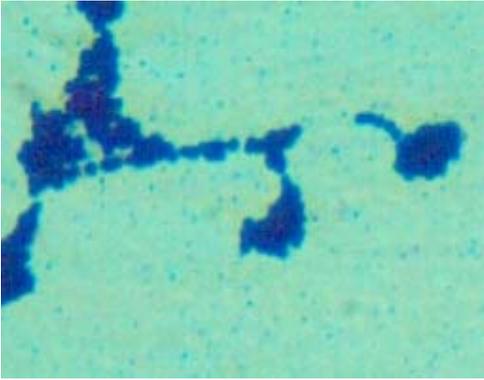
Así que, microscópicamente la mayor diversidad se presentó en el queso E.V.



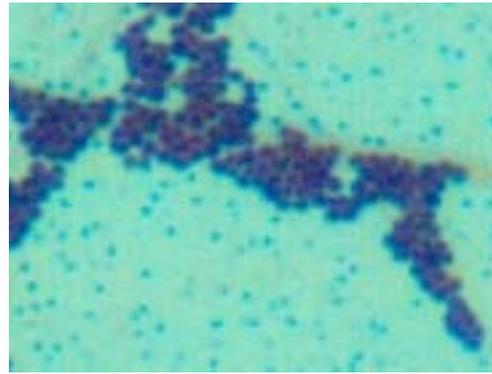
Colonia 1



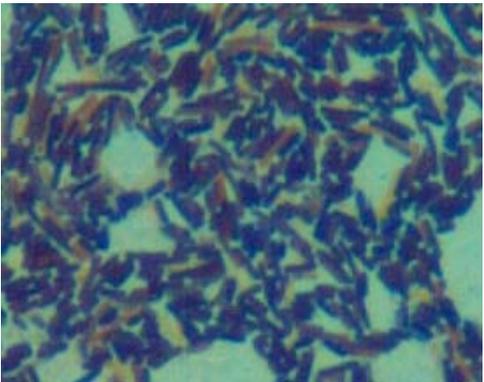
Colonia 2



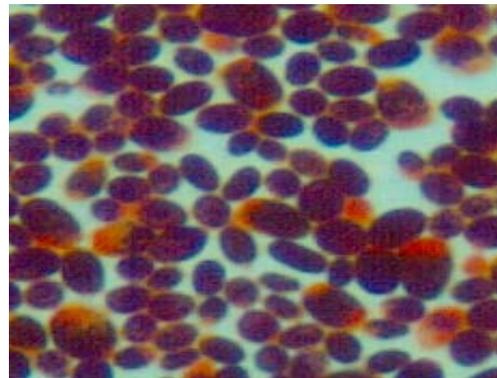
Colonia 3



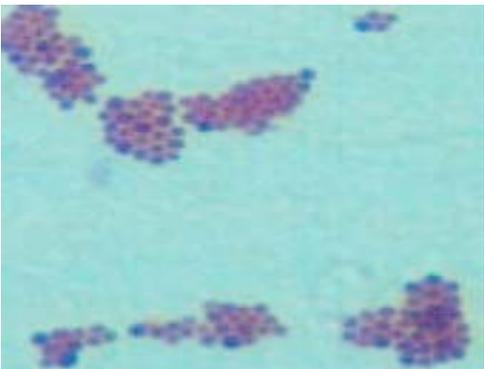
Colonia 4



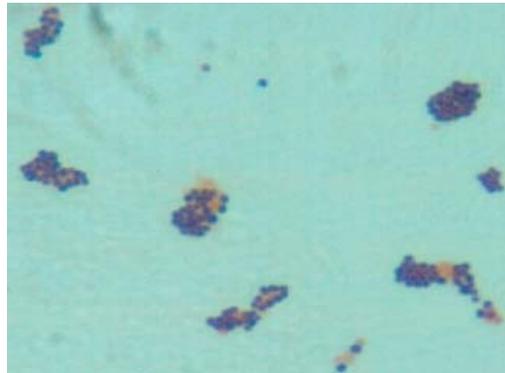
Colonia 5



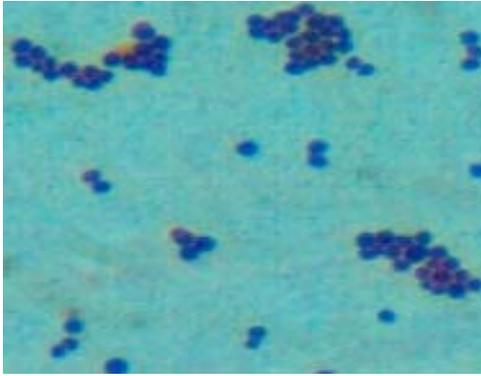
Colonia 6



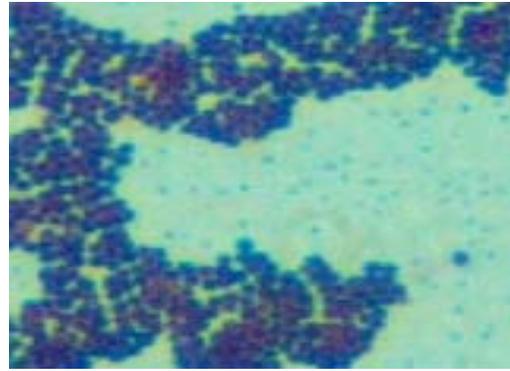
Colonia 7



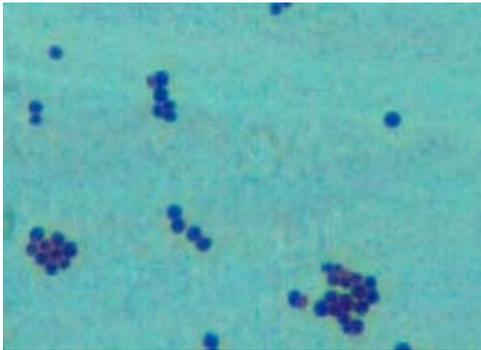
Colonia 8



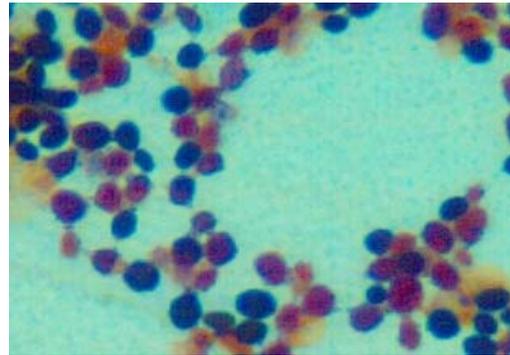
Colonia 9



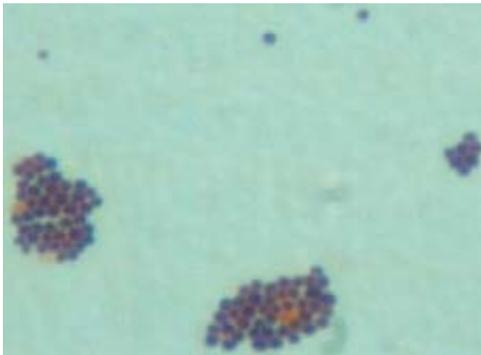
Colonia 10



Colonia 11



Colonia 12



Colonia 13

Figura 13 .Morfología microscópica de las trece colonias seleccionadas.

7.9. Prueba de la Catalasa.

De las trece colonias sólo las tres primeras, provenientes del queso de S.M.M, fueron catalasa negativa, las que podrían ser bacterias lácticas con actividad lipolítica; mientras, que las restantes que son catalasa positiva, no son bacterias lácticas. Los resultados se observan en la Tabla 21.

Tabla.21. Prueba de la Catalasa y Gram.

Col.	Queso de origen	Actividad catalasa	Gram
1	S.M.M	NEGATIVA	<i>Cocos gram (+) agrupados</i>
2	S.M. M	NEGATIVA	<i>Cocos gram (+) agrupados</i>
3	S.M.M	NEGATIVA	<i>Cocos gram (+) agrupados</i>
4	C.I	POSITIVA	<i>Cocos gram (+) agrupados</i>
5	E.V	POSITIVA	<i>Bacilos cortos Gram (+)</i>
6	E.V	POSITIVA	<i>Levadura</i>
7	C.I	POSITIVA	<i>Cocos gram (+) agrupados</i>
8	C.I	POSITIVA	<i>Cocos gram (+) agrupados</i>
9	C.I	POSITIVA	<i>Cocos gram (+) agrupados</i>
10	C.I	POSITIVA	<i>Cocos gram (+) agrupados</i>
11	C.I	POSITIVA	<i>Cocos gram (+) agrupados</i>
12	E.V	POSITIVA	<i>Levadura</i>
13	E.V	POSITIVA	<i>Cocos gram (+) agrupados</i>

7.10. Identificación por métodos moleculares.

7.10.1. Extracción de ADN.

Una vez que se eligieron las colonias con mayor actividad, se pretendió identificar por métodos moleculares a cada una. Como primer paso, se llevó a cabo el aislamiento de ADN de las trece colonias.

La extracción se realizó de forma satisfactoria con el método de fenol-cloroformo-isoamílico 25:24:1 (Anexos 3 y 4). Se obtuvieron para todas las colonias bandas visibles en los geles de agarosa al 1.5%, lo que nos confirmó que se extrajo ADN en suficiente cantidad y de buena calidad pues no se observó algún barrido que indicara degradación. Las bandas se muestran en la Figura 14.

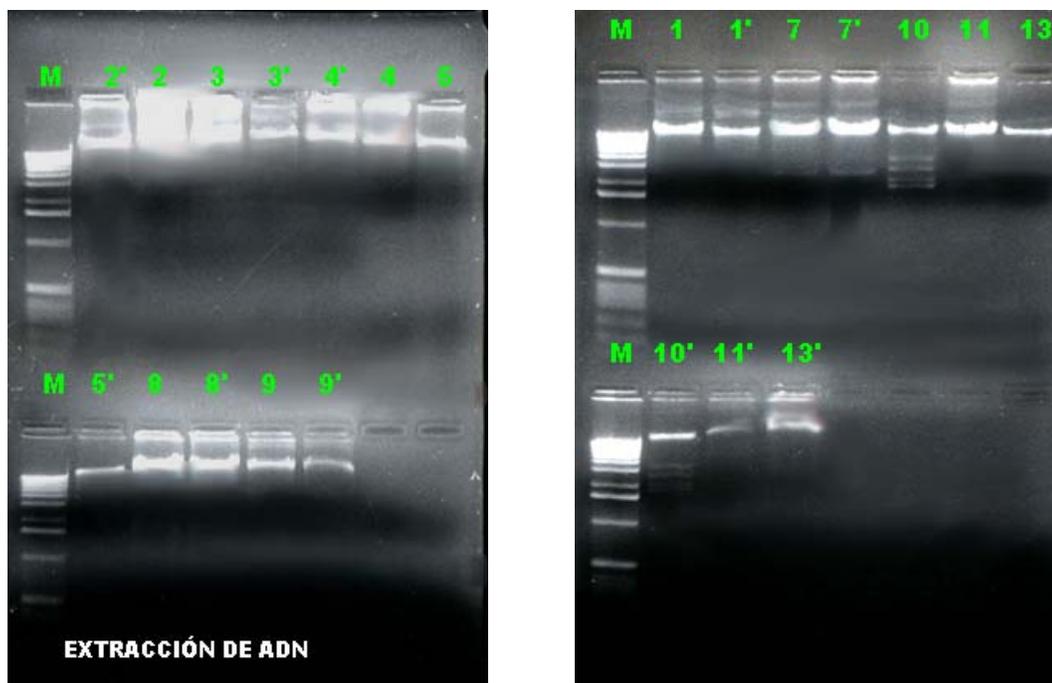


Fig. 14. Bandas de extracción de ADN en geles de agarosa al 1.5%, para todas bacterias.

La extracción de ADN se realizó sin ningún contratiempo en todos los casos, excepto con la levadura #12, ya que fue difícil resuspender al microorganismo en el buffer de extracción y tuvo que hacerse más drástico el tratamiento de ruptura celular (se aumentó el tiempo de agitación con las perlas de vidrio a 15 minutos) para poder obtener suficiente ADN.

Cuantificación de ADN

En la Tabla 22 se muestran los resultados de concentración de ADN y pureza del mismo para cada microorganismo. El análisis se realizó por duplicado.

Se observa que en la mayoría de los casos se obtuvo una pureza de ADN aceptable ($A_{260}/A_{280} > 1.7$), excepto en el caso de una extracción de ADN del microorganismo 11. No obstante, se utilizó este ADN como molde para la PCR.

El rendimiento de extracción fue muy variable, pero en casi todos los casos se obtuvo suficiente cantidad para la reacción de PCR. La excepción fue el microorganismo 12, que ya se comentó previamente, y donde en una extracción no fue exitosa. Pero lo que se extrajo fue más que suficiente para la realización de la PCR.

Tabla.22. Cuantificación de ADN.

muestra	260nm/280nm	[ADN] ng/μL	muestra	260nm/280nm	[ADN] ng/μL
1	1.87	186.3	1'	1.85	146.85
2	1.81	280.6	2'	1.87	249.88
3	1.82	256.6	3'	1.73	149.33
4	1.79	135.25	4'	1.70	161.7
5	1.905	217.4	5'	1.77	91.45
6	1.75	165.7	6'	1.68	112.7
7	1.60	113.3	7'	1.75	102.2
8	1.71	218.1	8'	1.78	136.75
9	1.63	85.3	9'	1.61	83.35
10	1.74	73.4	10'	1.67	67.8
11	1.41	387.75	11'	1.67	79.75
12	-	-	12'	1.79	130.5
13	1.64	42.6	13'	1.75	153.5

7.10.2. Productos de la reacción de PRC.

En la Figura número 15 se muestran, en los geles de agarosa, el producto de PCR de cada una de las colonias, en muestras cuádruples. En el caso de las bacterias. Se esperaba un producto de 250 pb con los cebadores 338F y 518R, mientras que para las levaduras se esperan bandas de un tamaño aproximado de 560 pb, con los cebadores NL1 y NL4. En ambos casos se obtuvieron los amplicones del tamaño esperado.

Para poder distinguir si se trata del mismo microorganismo, y como criterio de selección de los amplicones que se enviarían a secuenciar, se procedió a hacer un análisis de restricción de los amplicones (ARDRA).

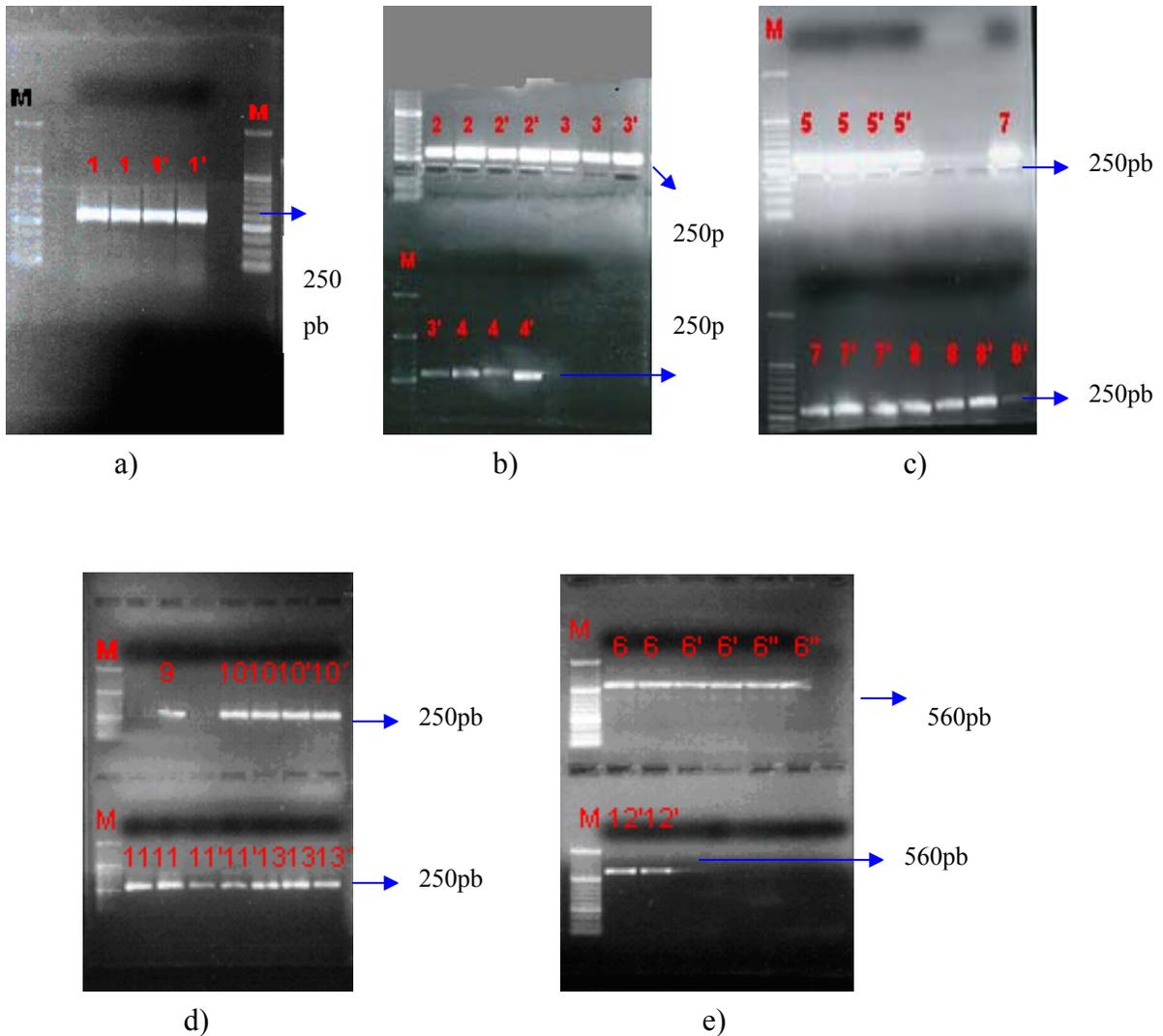


Fig. 15. Bandas de producto de PCR. a), b), c) y d) En bacterias, se obtuvieron bandas de 250 pb, la reacción se llevó a cabo cuatro veces para cada colonia. e) Bandas de producto de PCR para levaduras de 560 pb.

7.10.3. Análisis de restricción

Con el análisis de restricción se sabrá si las trece colonias elegidas son distintas entre sí, ya que con sólo con los resultados que hasta ahora se habían realizado (característica colonial, observación microscópica y prueba de catalasa) no sería posible descartar alguna.

Primeramente se tuvieron que elegir las enzimas de restricción que digirieran a los amplicones. Se probaron las que estaban disponibles en el laboratorio. En la Tabla 23 se reportan los resultados obtenidos para la digestión de dos amplicones que se eligieron al azar.

Al realizar la prueba con todas las enzimas se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 23. Resultados de la restricción con diferentes enzimas.

Endonucleasa de Restricción	Digestión a 37° por:	
	12 horas	24 horas
BglI	<i>No cortó</i>	<i>No cortó</i>
BglII	<i>No cortó</i>	<i>No cortó</i>
EcoRI	<i>No cortó</i>	<i>No cortó</i>
KpnI	<i>No cortó</i>	<i>No cortó</i>
PstI	<i>No cortó</i>	<i>No cortó</i>
Sall	<i>No cortó</i>	<i>No cortó</i>
Sau3A	<i>Si cortó</i>	<i>Si cortó</i>
HaeIII	<i>No cortó</i>	<i>No cortó</i>
HinfI	<i>Si cortó</i>	<i>Si cortó</i>

Los resultados muestran que sólo con las enzimas Sau3A y Hinf I, hubo digestión tanto a 12, como a 24 horas de tratamiento.

Posteriormente se trataron los amplicones de las trece colonias con éstas dos enzimas, a 37° C por 12 horas, y los resultados que se observaron fueron los siguientes:

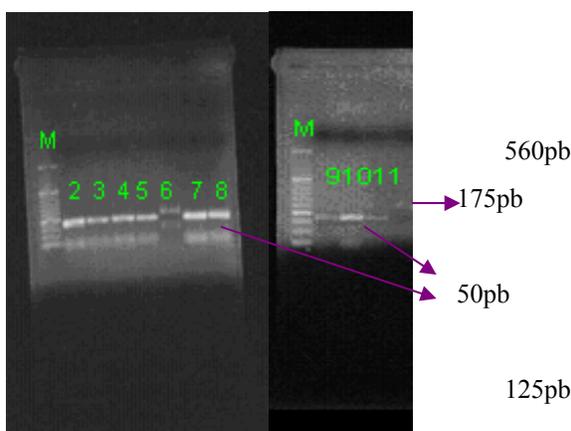


Fig. 16. Restricción con Hinf I

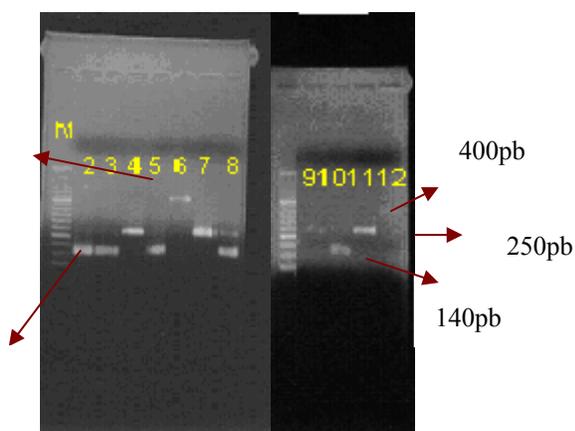


Fig. 17. Restricción con Sau3A.

Para todas las colonias que son bacterias, en la digestión con Hinf I se obtuvieron dos bandas, una de 175 pb y otra de 50 pb aproximadamente, en todos los casos.

Mientras que para la levadura 6 se obtuvo una banda de 140 pb, y se muestra que todavía hay producto de PCR no digerido que se marca en 250 pb. No se realizó el análisis con esta enzima para la levadura 12.

De acuerdo a estos resultados, con esta enzima sólo diferenciamos entre levaduras y bacterias. En la digestión con la enzima Sau3A se observa más diversidad de bandas entre las colonias, pues se muestran diferentes tamaños de bandas, pero algunas con similitud. Por ejemplo, en las bacterias 4, 7, 9 y 11 no hubo digestión, en los cuatro carriles se observa la misma banda de 250pb, del producto de PCR sin digerir. Esto nos indica que pudiera tratarse de colonias semejantes, pues no hubo diferencias en el patrón de bandas.

En la levadura 6, se observa la banda de 560pb del producto de PCR, por lo que no hubo digestión; pero con la levadura 12, se obtiene una banda de 400pb, por conclusión las levaduras son distintas entre sí.

En las colonias 1,2 y 3, se obtuvo una misma banda de 125pb con la digestión de Sau3A y también con Hinf I se obtuvieron las mismas bandas, por lo que muy probablemente estas colonias sean semejantes entre sí.

Con la colonias 5 y 10 sucede algo parecido, pues en las dos se observan bandas de 140pb. Solo la colonia 8 tiene una banda de 145pb, aproximadamente, con la enzima Sau3A, ésta es distinta a todas las demás bacterias, pues no se esta banda no es igual en tamaño a las demás obtenidas.

7.10.4. Criterios de selección.

Con el fin de seleccionar a los microorganismos diferentes, aparte del análisis de restricción se tomaron en cuenta otros parámetros como son el gram, morfología microscópica, la prueba de la catalasa y el tamaño de halo de actividad, obtenidos anteriormente. Todos los resultados se resumen en la Tabla 24.

Con el análisis de restricción se definió que las colonias 4, 7, 9 y 11 pueden ser iguales. Todas son bacterias, cocos gram (+) y catalasa positivas, lo único que las puede diferenciar es el tamaño de halo, las colonias 4 y 11 tienen un halo de 1.2mm, diferentes al halo de la colonia 7 que mide 1.0mm y al de la colonia 9 que tiene uno de 0.5mm.

Las colonias 1,2 y 3 también son iguales según el análisis de restricción, las tres son catalasa negativa, son bacterias y todas son cocos gram (+); la actividad es igual en la colonia 1 y 2, tienen un tamaño de halo de 0.5mm, aproximadamente, a diferencia de la colonia 3 que a las

24 horas todavía tenía aparición de halo, fue hasta las 48 horas cuando, apenas se observaba un ligero halo alrededor de la colonia (alrededor de 0.1mm).

Entre la colonia 5 y 10, de acuerdo al análisis de restricción, las agruparía como semejantes, pero la diferencia entre ellas es determinante: en la colonia 5 encontramos bacilos cortos gram (+) y en la colonia 10, cocos gram (+), por lo que se trata de microorganismos totalmente diferentes.

La colonia 8 ya se había considerado como diferente a todas las demás, desde el análisis de restricción, además que es la colonia con mayor actividad lipolítica, Al igual que las dos diferentes levaduras que tienen una muy buena actividad, en especial la colonia 6.

Solo seis colonias, diferentes entre sí, se mandaron a secuenciar y se eligieron las de mayor actividad lipolítica, que fueron la 5, 6, 7, 8, 11 y la 12.

Tabla. 24. Características de comparación entre las trece colonias lipolíticas

Colonia	Gram	Prueba de Catalasa	Cortes con Hinf I	Cortes con Sau3A	Tamaño de halo a 24hrs/37°C	
1	Cocos gram +	-	175, 50	125	<0.5mm	Bacteria
2	Cocos gram +	-	175, 50	125	<0.5mm	Bacteria
3	Cocos gram +	-	175, 50	125	Aún no	Bacteria
4	Cocos gram +	+	175, 50	250	1.2mm	Bacteria
5	Bacilos cortos gram +	+	175, 50	140	1.2mm	Bacteria
6	Levadura	+	250, 140	560	3.5mm	Levadura
7	Cocos gram +	+	175, 50	250	1.0mm	Bacteria
8	Cocos gram +	+	175, 50	145	3.0mm	Bacteria
9	Cocos gram +	+	175, 50	250	0.5mm	Bacteria
10	Cocos gram +	+	175, 50	140	<0.5mm	Bacteria
11	Cocos gram +	+	175, 50	250	1.2mm	Bacteria
12	Levadura	+	N.D	400	1.0mm	Levadura

N.D no determinado.

7.10.5. Resultados de la secuenciación de ADN.

Los productos de PCR purificados se enviaron a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular, de la UNAM. Las secuencias se muestran al final de los Anexos.

Las secuencias de cada microorganismo, se capturaron y enseguida se compararon con la base de datos del NCBI²³.

Las secuencias obtenidas de la región 16s rDNA y los resultados que mostró la base de datos del NCBI, se muestran en seguida (sólo se muestran los resultados con los porcentajes de identidad más altos). También se muestran los valores de expectancia, valores pequeños indican que esa es la especie más parecida.

Colonia: 12
Nombre: EV12
Primer: NL1

Resultados de identidad:

	% Identidad	Valor de espectancia
1. Candida zeylanoides 26s rRNA	99	0.0
2. <i>Candida zeylanoides</i>	99	0.0
3. <i>Candida krissi</i>	99	0.0
4. <i>Candida krissi</i>	99	0.0
5. <i>Candida zeylanoides</i>	99	0.0
6. <i>Candida santamariae</i> var. <i>Santamariae</i>	98	0.0

Los resultados para la levadura doce, indican que es *Candida zeylanoides*.

Esta levadura se ha reportado en humanos, carne, pescado y agua. Considerada un alergénico, relacionada con infecciones de la piel. No tóxica.¹⁰

También, ha sido aislada de productos crudos de pollo, carne y animales de granja.⁵

Después se nombra a *Candida krissi*, la cuál es fenotípicamente parecida a *Candida zeylanoides*, al igual que *Candida santamariae*.

Colonia: 6
Nombre: EV6
Primer: NL1

Resultados de identidad:

	% Identidad	Valor de espectancia
1. Yarrowia lipolytica cepa ATCC 18942 26s	100	5e-91
2. <i>Yarrowia lipolytica gene 26s rRNA</i>	100	5e-91
3. <i>Yarrowia lipolytica gene 26s rRNA, E122</i>	100	5e-91
4. <i>Yarrowia lipolytica gene 26s rRNA, CBS 599T</i>	100	5e-91
5. <i>Yarrowia lipolytica gene 26s rRNA</i>	100	5e-91
6. <i>Candida deformans gene 26rRNA partial</i>	99	1e-88

La levadura seis es *Yarrowia lipolítica*:

Esta levadura ha sido frecuentemente aislada de diferentes tipos de alimentos, como quesos y salsas o en aceites naturales. Estas levaduras secretan varias enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas, RNasas, etc.

La especie no es patógena. Es una levadura aerobia obligada, que puede usar hidrocarburos simples o varias grasas como fuentes de carbono.

Generalmente reconocida como segura GRAS, es utilizada para la producción de proteínas, ácido cítrico y compuestos de síntesis para saborizantes.

Y. lipolítica es una levadura que produce componentes de sabor en quesos.⁴⁶

Científicos en Italia (Gardini, R. Tofalo, 2005) realizaron un estudio, con el objetivo de caracterizar levaduras presentes en la maduración del queso Pecorino Crotonese, elaborado al sur de Italia. Entre todas las levaduras aisladas encontraron que *Yarrowia lipolítica*, era una levadura que predominaba en las etapas tardías o avanzadas de maduración; y obtuvieron lo siguiente: *Y. lipolítica* asimilaba el citrato y el lactato en presencia de NaCl, en una concentración de hasta el 7.5%, se comprobó que tenía gran actividad proteolítica y lipolítica, además, de la capacidad de catabolizar la tirosina produciendo un pigmento café. Por último, tiene el mas alto potencial biogénico descarboxilando ornitina, fenilalanina, tirosina y lisina.¹⁴ Además, *Candida deformans* fue previamente considerada sinónimo de *Y. lipolítica*.⁵

También se sabe que *Candida zeylanoides* y *Yarrowia lipolítica* han sido aisladas de productos crudos de pollo, carne, animales de granja.⁷ Y estas levaduras aisladas de pollo crudo se han probado para verificar que contribuyen a la producción de aroma en quesos.⁷

Colonia: 5
Nombre: EV5
Primer: 338F

Resultados de identidad:

	% Identidad	Valor de espectancia
1. Bacillus pumilus strain TF12	100	1e-81
2. <i>Bacillus pumilus strain F198-A08</i>	100	6e-81
3. <i>Fuel tank bacterium S8</i>	100	6e-81
4. <i>B. pumilus strain JH4</i>	100	6e-81
5. <i>B. pumilus strain JH31</i>	100	6e-81

La colonia cinco es *B.pumilus*⁴⁵, bacilos gram positivos. Se considera atractiva por sus actividades hidrolíticas (xilanolítica y proteolítica) y además de las características que presenta su lipasa.

Bacillus se ha caracterizado bioquímicamente⁴⁵ como:

Galactosa -

Catalasa +

Hidrólisis de caseína +

Uso de citrato +

Ureasa -

Lactosa +

Se reporta como responsable de toxi-infecciones cuando se encuentra en grandes concentraciones. Sirve como fungicida.

Se ha reportado su presencia en patés, quesos, y jugos de frutas. Ha sido aislada de mamíferos como las vacas.

Colonia: 7
Nombre: C17
Primer: 338F

Resultados de identidad:

	% Identidad	Valor de espectancia
1. Staphylococcus xylosus	100	1e-94
2. <i>Staphylococcus xylosus</i>	100	1e-94
3. <i>Staphylococcus sp. PDD-5b</i>	100	1e-94
4. <i>Staphylococcus sp.</i>	100	1e-94
5. <i>Staphylococcus xylosus strain Mali 7</i>	100	1e-94

La colonia siete podría ser *Staphylococcus xylosus*.

Esta bacteria tiene las siguientes características:

- Tiene actividad lipolítica
- Aerobios o anaerobios.
- Cocos gram (+)
- Coagulasa (-)
- Resistentes a la novobiocina.

Proviene de la piel de humanos y animales. Más común en animales.⁴⁴

Colonia: 8

Nombre: C18

Primer: 338F

Resultados del NCBI para la secuencia:

	% Identidad	Valor de espectancia
1. <i>Staphylococcus piscifermentans</i>	100	1e-85
2. <i>Staphylococcus piscifermentans</i>	100	1e-85
3. <i>Staphylococcus condimenti</i>	100	1e-85
4. <i>Staphylococcus piscifermentans</i>	100	1e-85
5. <i>Staphylococcus carnosus gene</i>	100	1e85
6. <i>Staphylococcus piscifermentans</i>	100	1e-85

En el caso de la colonia ocho, la especie más probable es *Staphylococcus piscifermentans*.

Se ha aislado de salsas o productos fermentados de pescado y salsas a base de soya. Son usadas solas o en combinación con otras cepas (como *S. xylosus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*) como cultivos iniciadores en tecnología de alimentos.³³

- Cocos gram (+), inmóviles, no esporulados, se agrupan de 2 en 2 ó de 4 en 4.
- Anaerobios ó aerobios
- Catalasa (+)
- Participan en el desarrollo de aroma en productos fermentados (salami).
- Se desconoce su hábitat normal.
- Soporta concentraciones de NaCl de entre 10-15%.

Previamente a *S. psifermentans* se había clasificado como perteneciente a especies de *Staphylococcus simulans*. Pero en los análisis recientes de secuencias de la región 16s rADN, los resultados indican que es filogenéticamente muy parecido a *Staphylococcus carnosus*.³³

También aparecen:

Staphylococcus carnosus

Aislados de salsas o productos fermentados de pescado, salsas a base de soya

Es filogenéticamente parecido a *Staphylococcus piscifermentans*.

- Cocos gram (+), inmóviles, no esporulados, pueden crecer aislados, en pares.
- Aero-anaerobios
- Catalasa (+)
- No sintetiza coagulasa.
- Soportan una concentración de NaCl al 15%.
- Contribuyen en el aroma.

Staphylococcus condimenti

- Aislados de salsas de soya
- Cocos gram(+)
- Catalasa (+)
- Anaerobios o aerobios
- No sintetiza coagulasa
- Soporta 15% de NaCl.

Estas colonias son parecidas entre sí, las cepas de *S. piscifermentans* y *S. carnosus* son similares mutuamente en sus características fenotípicas. Cepas de *S. condimenti* se han propuesto como nuevas especies incluidas en el grupo de *S. carnosus*.³³

A todas se les ha hallado en la elaboración de productos fermentados.

Colonia: 11

Nombre: C111

Primer: 338F

Resultados del NCBI para la secuencia:

	% Identidad	Valor de espectancia
1. <i>Staphylococcus sp. MG91</i>	99	2e-90
2. <i>Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus</i>	99	2e-90
3. <i>Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus</i>	99	2e-90
4. <i>Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus</i>	98	2e-90

La colonia once es *S. saprophyticus subs. saprophyticus* y se han reportado las siguientes características:

- Es catalasa (+)
- coagulasa (-)
- Gram (+)
- Fosfatasa (-)

- Ureasa(-)
- Lipasa (+)

No se conoce completamente su hábitat normal.

Es un patógeno responsable de infecciones urinarias no complicadas en mujeres. Y es responsable de uretritis en varones sexualmente activos. Puede producir pieluretritis.⁴³

También se ha aislados de vacas muertas y de puercos, así como en gente relacionada al procesamiento de carne y productos cárnicos.³⁵

Reconocido como patógeno en humanos junto con *S. epidermidis* y otras especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos.⁶

7.10.6. Alineamiento entre las especies de *Staphylococcus* halladas.

Se observó que las secuencias de estas últimas tres especies de *Staphylococcus*, halladas en el queso son muy parecidas, sólo difieren en algunas bases. Por lo que, se realizó un alineamiento entre las tres secuencias para detectar cuantas bases eran las que cambiaban entre una y otra. Se llevó a cabo un alineamiento de las tres secuencias con ayuda del programa Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW¹⁵, los resultados se muestran en la Figura 18.

Se observa que al alinear las tres colonias aparecen catorce sustituciones y una deleción, lo que indica que la diferencia es poca y que algún otro método de identificación de microorganismos tendría que ser muy sensible para detectar estas variaciones entre una especie de *Staphylococcus* y otra.

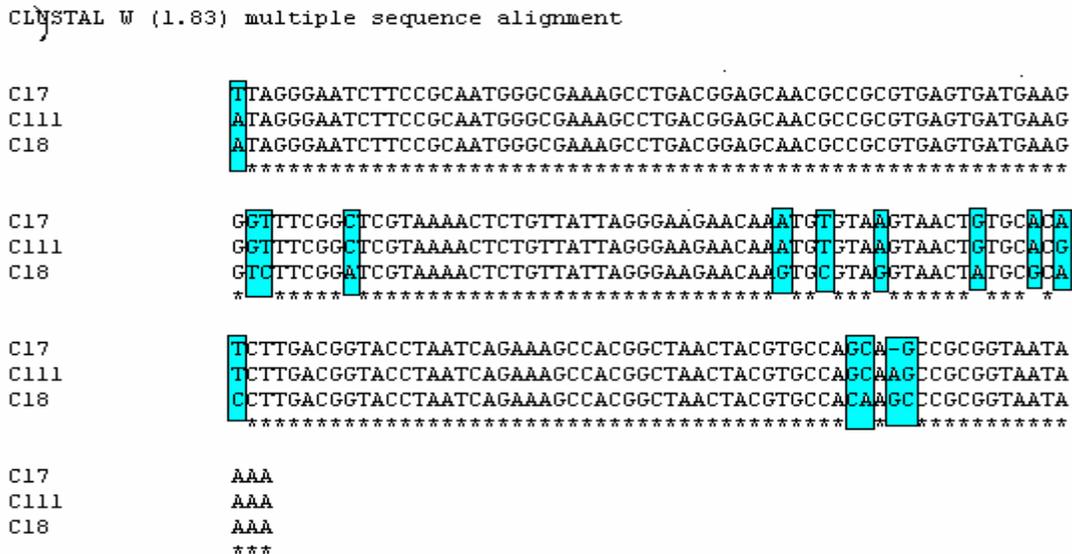


Figura 18. Alineamiento de las cepas de *Staphylococcus* identificadas. C17 (*S. xylosus*), C18 (*S. psifermentans*) y C111 (*S. saprophyticus subsp. saprophyticus*).

En la Figura 21 se encuentra el árbol filogenético del género de *Staphylococcus*⁴⁰, donde se observa que entre *S. xylosus* y *S. saprophyticus* hay mucha similitud, y marca un valor estimado de confianza del 94% entre ellos, lo que indica que la diferencia entre sus secuencias es mínima. Al realizar el alineamiento entre las secuencias de estas dos especies de *Staphylococcus* mostrada en la Figura 19, se encontró que sólo diferían por dos sustituciones y una deleción, lo que mostró que efectivamente hay una relación muy cerrada entre ellas. Por lo que el método de identificación utilizado es capaz de diferenciar entre *S. xylosus* y *S. saprophyticus*, aunque difieran por tres bases.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

C17      TAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
C111     ATAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
*****

C17      GGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTGCACA
C111     GGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTGCACG
*****

C17      TCTTGACGGTACCTAATCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAAGCCGCGGTAATA
C111     TCTTGACGGTACCTAATCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAAGCCGCGGTAATA
*****

C17      AAA
C111     AAA
***

```

Figura 19. Alineamiento de la secuencias de la colonia 7 (*S. xylosus*) con la colonia 11 (*S. saprophyticus* Subs. *Saprophyticus*).

Después, con el alineamiento del la colonia 7 y 8 mostrado en la Figura 20, se observaron 13 sustituciones y una deleción entre ambas, lo que nos indica una diferencia mayor entre estas especies, que se puede observar también en al Figura 21. Se ve claramente que *S. psifermentans* está situada muy lejos de *S. xylosus* y *S. saprophyticus*, dentro del árbol filogenético y muestra que son especies muy diferentes, aunque la diferencia entre sus secuencias sigue siendo de tan solo trece bases, de las 250 obtenidas en la secuencia del gen 16s rADN. En contraste, se observa que *S. psifermentans* está muy relacionada con la especie *S. carnosus*. con un valor estimado de identidad del 99% entre ambas.

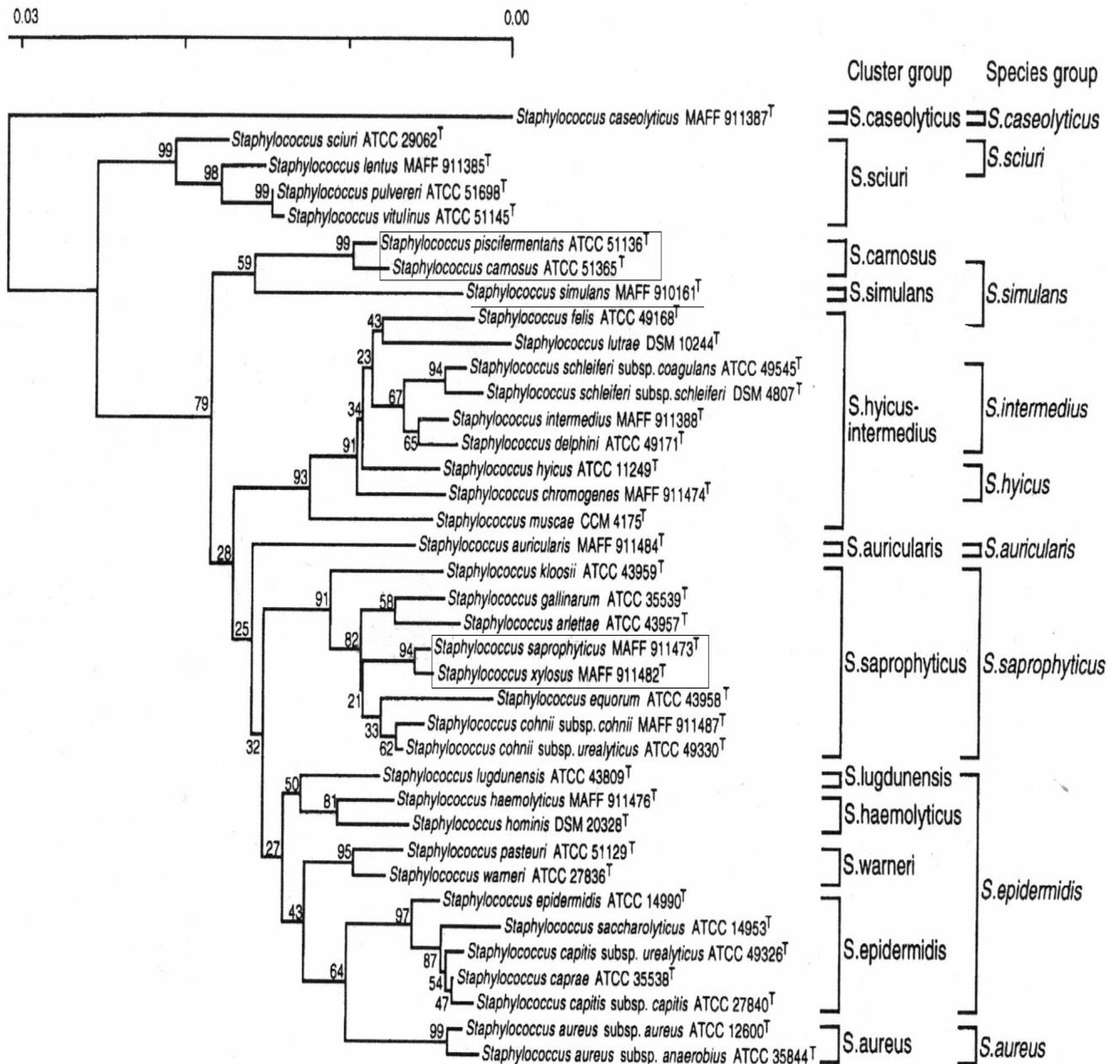


Figura 21. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16s rRNA, que muestra las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Staphylococcus*. Los números son los niveles de confianza estimados, expresados en porcentajes, y la escala de arriba indica el valor de la distancia evolutiva entre las secuencias.⁴⁰

7.11. Pruebas bioquímicas API

Las pruebas API para la identificación de los microorganismos se aplicaron sólo para las bacterias, ya que la galería de API para levaduras es muy limitada, sólo considera especies de *Candida* de interés en salud.

Con base en todas las características anteriores citadas para las colonias 7, 8 y 11, se utilizaron las galerías del API Staph especiales para estafilococos, micrococos y géneros relacionados. Mientras que para la colonia 5 (bacilos cortos) se utilizó la galería API 50 CHB/E especiales para *Bacillus* y otros microorganismos/ *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*.

Los resultados de las pruebas se introdujeron al programa APiLAB Plus (bioMérieux V.3.3.3) y arrojaron lo siguiente:

❖ Para la colonia 5

Las 49 pruebas que se realizan de las galerías 50 CH dieron como resultado de la identificación a las 24 horas, a *Bacillus pumilus* con todas las pruebas acertadas, pero con un perfil inaceptable, ya que se necesitaba otra galería, la API 20E (con otras 12 pruebas) para confirmar, pero no se realizó porque se carecía de ese material.

En el caso de las colonias 7, 8 y 11 las galerías constan de 21 pruebas de las cuales sólo se realizaron 20, no se realizó la última prueba que era la de resistencia a la lisostafina porque no se contaba con los reactivos, por lo que se colocó como resultado de la prueba un (?) y este se capturó en los resultados en el programa APiLAB. La determinación se realizó en dos condiciones: en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, pues se sabe que los microorganismos pueden crecer en las dos condiciones.

❖ Para la colonia 7

El resultado a las 24 horas, en condiciones de anaerobiosis, el programa arrojó como resultado de la identificación a *Staphylococcus xylosus* con un ID= 99.5% y una T= 0.37 y lo marca como buena identificación con dos pruebas en contra NIT y URE.

Mientras que el resultado, en condiciones de aerobiosis arroja la identificación de *Kocuria varians/rosea* con un I.D= 83.3 % y una T=0.25, y deja en segundo lugar a *Staphylococcus xylosus* como perfil inaceptable.

❖ Para la colonia 8

El resultado a las 24 horas, en condiciones de anaerobiosis, el programa arrojó como resultado de la identificación a *Staphylococcus simulans* con un ID= 88.8% y una T= 0.56 y lo marca como aceptable.

En la prueba en condiciones aerobias el resultado fue el mismo, aunque hay que tomar en cuenta que en la base de datos del APiLAB no se encuentra la especie de *S.psifermentans*.

❖ Para la colonia 11

El resultado a las 24 horas, en condiciones de anaerobiosis, el programa arrojó como resultado de la identificación a *Staphylococcus saprophyticus* con un ID= 90.1% y una T= 0.63, considerando la prueba de Lac (+), pero si la consideramos Lac (-), el resultado arroja como identificación a *Staphylococcus sciuri* con un I.D= 82% como aceptable y deja en segundo lugar a *Staphylococcus saprophyticus* con un I.D= 74.2%. Se tomaron estos dos resultados ya que esta prueba se consideró como confusa ya que el color no estaba bien definido.

El resultado, en condiciones de aerobiosis arroja la identificación de *Staphylococcus aureus* con un I.D= 92.9% y la define como buena identificación.

Los resultados de la identificación por API, coinciden con los que se obtuvieron en el análisis de las secuencias para cada microorganismo.

Pero durante la elaboración de la prueba comprobamos que los API, dejan muchas dudas en los resultados pues los colores de vire son inciertos, muchas de las pruebas en lugar de dar amarillo (positivo) ó rojo (negativo) se presentaban colores, como distintos tonos de naranja lo que no permite dar un resultado exacto para cada prueba, y esto provoca confusión y una mala identificación de un microorganismo que desconocemos.

Se observó que las pruebas daban mejor resultado cuando se llevaban a cabo en condiciones de anaerobiosis, al contrario de lo que indican las instrucciones de aplicación.

Anteriormente, se mostró la alta similitud entre las tres especies de *Staphylococcus* estudiadas, al realizar el alineamiento de sus secuencias, especialmente entre *S. xylosus* y *S. saprophyticus*. Por lo que se comprende que en las API haya una mayor dificultad para diferenciarlas sólo con base a pruebas bioquímicas, cuando hay diferencias de sólo tres bases entre sus secuencias de RNA 16S.

Por ejemplo, en la identificación de API para la colonia 8 (*S .psifermentans*), el resultado fue *S. simulans*, y en la Figura 21 se muestra que éste tiene un parecido con *S. psifermentans*,

pues marca entre ellos un nivel de confianza estimado del 59%, es la especie más próxima en similitud al grupo de *S. carnosus*, al que pertenece *S. psifermentans*. Ahora bien, se sabe que en la base de datos del APiLab no se encuentra la especie de *S. psifermentans* por lo que pudiera ser acertada la identificación de *S. simulans*, pero en la base de datos se encuentra *S. carnosus* y esta especie es más semejante a *S. psifermentans*. Por lo que el método API no tiene la suficiente sensibilidad para detectar la diferencia entre especies muy cercanas.

Por el contrario en la identificación para la colonia 11 (*S. saprophyticus*), el resultado en condiciones de anaerobiosis da *S. saprophyticus*, pero en condiciones de aerobiosis el resultado es *S. aureus*, y si observamos la figura 21, vemos que son especies que no están cercanamente relacionadas, aunque son relacionadas por ser especies que causan infecciones severas.

En la identificación de la colonia 7 (*S. xylosus*), el resultado en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis fue el mismo, solo que en esta última condición se detectó en segundo lugar, dando como primer resultado otro microorganismo (*Kocuria varians*, sinónimo de *Micrococcus varians*), que no está dentro del género de los *Staphylococcus*.

Por lo tanto, no se recomienda utilizar las pruebas API como técnica principal de identificación de un microorganismo, pues los resultados no son 100% confiables, pero brindan una idea cercana de la especie con la que se está trabajando.

En consecuencia, para este análisis se dejaron los resultados de los APIs en segundo término, y se identificó la secuencia de sus genes 16S.

Una vez identificados las seis colonias se conservaron en chaquiras, para sus usos convenientes a futuro (Anexo 7).

8. CONCLUSIONES:

a) Características de los quesos.

- Se observó que entre mayor es el tiempo de maduración de los quesos, disminuye el a_w .
- La cantidad de sal añadida afecta directamente al a_w del queso, independientemente del tiempo de maduración. Al agregar una cantidad mayor de cloruro de sodio, el a_w disminuye.
- Quesos con a_w bajos tienen menor crecimiento de microorganismos.
- La acidez aumenta en quesos con mayor tiempo de maduración, mientras que el pH disminuye.

b) Composición de los quesos.

- De todos los componentes del queso, las cantidades de grasa son las que más varían entre sí en los productos analizados. Se sabe que la variabilidad depende del tipo de ganado, por lo que es factible que los quesos tengan diferencias si todos los productores utilizan vacas de diferentes razas.
- Los quesos analizados pueden ser clasificados como auténticos con respecto a su composición proximal.

c) Microbiología de los quesos.

- Un mayor tiempo de maduración hace que disminuya la carga microbiana, por lo que probablemente la cantidad de microorganismos patógenos también disminuiría.
- Se observó que si se cumple con el tiempo mínimo de maduración se garantiza un queso de mejor calidad microbiológica. Pero en dos de los quesos analizados se encontró una mala calidad microbiológica, que indica falta de buenas prácticas durante su elaboración, maduración y/o comercialización, que se deben mejorar.
- No se lograron aislar hongos en la mayoría de los quesos.

d) Actividad lipolítica.

- El Agar Tributirina fue el medio más práctico para la detección de la actividad lipolítica de los microorganismos.
- La actividad lipolítica de todas las colonias no se ve afectada por su almacenamiento a 4° C.
- Al crecer los microorganismos en las cajas de medios lipolíticos, se percibe el olor a grasa de leche característico del queso, indicio de la producción de compuestos volátiles aromáticos.

e) Colonias aisladas.

- La mayoría de los microorganismos lipolíticos aislados fueron bacterias gram positivas, todos cocos agrupados, con excepción de un grupo en el que se observaron bacilos cortos.
- Sólo del queso E.V se aislaron levaduras con una gran actividad lipolítica.
- Del queso C.II, no se lograron aislar microorganismos lipolíticos, probablemente debido a su a_w bajo.
- Las seis colonias analizadas tienen actividad catalasa positiva, lo que indica que no son bacterias lácticas.

f) Identificación por secuencia del gen 16S.

- La secuencia de la región del 16s rADN mostró buena identificación de las seis colonias, es tan sensible que es capaz de distinguir especies que se diferencian por un par de bases en sus secuencias.
- Los microorganismos identificados son los siguientes:

Colonia	Especie	Identidad
5	<i>Bacillus pumilus</i>	100%
7	<i>Staphylococcus xylosus</i>	100%
8	<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	100%
11	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> Subs. <i>saprophyticus</i>	99%
6	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100%
12	<i>Candida zeylanoides</i>	99%

- De las seis colonias caracterizadas, aquellas con mayor actividad fueron *Staphylococcus psifermetans* y la levadura *Yarrowia lipolítica*.

g) Identificación por APIs

- La identificación de microorganismos por APIs es confusa y poco sensible, no distingue diferencia entre especies muy cercanas y varía de acuerdo a las condiciones de cultivo de cada microorganismo
- Resultados en condiciones anaerobias:
 - I. Colonia 5 *Bacillus pumilus* con perfil inaceptable
 - II. Colonia 7 *Staphylococcus xylosus* con buena identificación.
 - III. Colonia 8 *Staphylococcus simulans* con perfil aceptable.
 - IV. Colonia 11 *Staphylococcus saprophyticus Subs. Saprophyticuscon* con un perfil aceptable.
- El método de identificación con pruebas bioquímicas APIs no es tan sensible como el método de identificación por secuenciación de ADN. Pero este último método es bastante caro, lo que lo hace indisponible cuando se quiere identificar a muchos microorganismos juntos. En esos casos es muy práctico usar las pruebas bioquímicas APIs que dan resultados muy cercanos.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO 1

MEDIO DE DILUCIÓN

AGUA PEPTONADA 0.1%:

Formulación	Para 1 litro de medio
• Bacto-peptona	1g
• NaCl	8.5g
• Agua	1 litro

Elaboración. Se mezclan todos los componentes con el agua hasta disolver, se esterilizan en autoclave y se vacía.

9.2. ANEXO 2

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR TRIBUTIRINA (para bacterias):

Fórmula	Para 1 litro de medio
• Bacto-triptona	10g
• Extracto de levadura	5g
• Cloruro de Sodio	10g
• Tributirina	10ml
• Glucosa 20%	5ml
• Agar	15g
• Agua desionizada	1 litro

Elaboración:

1. Agregar la Bactotriptonna, el extracto de levadura, el cloruro de sodio, la Tributirina y disolver en agua desionizada. Ajustar el pH = **7.5**
2. Emulsificar con el ultraturax a la velocidad mínima, de 2 a 3 minutos. Agregar el agar y disolver.
3. Esterilizar en autoclave.
4. Enfriar y agregar la glucosa estéril. Disolver.
5. Distribuir en cajas.

AGAR TRIBUTIRINA (para Levaduras):

Fórmula	Para 1 litro de medio
• Extracto de Levadura	10g
• Peptona	20g
• Tributirina	10ml
• Glucosa 20%	25ml
• Agar	20g
• Agua	1 litro

Elaboración:

1. Agregar el extracto de levadura, peptona, la tributirina, y el agua destilada; emulsificar con el ultraturax a la velocidad mínima, de dos a tres minutos. Ajustar el pH = **6.5**
2. Después agregar el agar y disolver.
3. Esterilizar en autoclave.
4. Dejar enfriar y agregar la glucosa (previamente esterilizada).
5. Distribuir en cajas.

AGAR ROJO NEUTRO

Fórmula	Para 1 litro de medio
• Caldo nutritivo	8g
• Cloruro de Sodio	5g
• Aceite de Olivo	10ml
• Rojo neutro al 0.5%	10ml
• Tween 80	0.01%
• Agar	15g
• Agua	1 litro

Elaboración:

1. Disolver en agua destilada el caldo nutritivo, el Cloruro de Sodio y el Rojo neutro. Ajustar el pH = **7.4**
2. Después agregar el aceite de oliva, el tween 80 y emulsificar con el Ultraturax. Aproximadamente 10 minutos, a la velocidad mínima.
3. Agregar el agar
4. Esterilizar.
5. Distribuir en cajas.

CALDO YM:

Formulación	Para 1 litro de medio
• Glucosa	20g
• Extracto de Levadura	1g
• Peptona	5g
• Agua	1 Litro

Elaboración. Se mezclan todos los componentes con el agua hasta disolver, se esterilizan en autoclave y se vacía.

Este medio se utiliza para crecer levaduras.

9.3. ANEXO 3

EXTRACCIÓN DE ADN (para bacterias).

Método del fenol-cloroformo-isoamílico.

1. Tomar células de un cultivo puro, agregar 150 μ L del buffer PBS.
Agitar 5 minutos en vortex (hasta disolver totalmente, si es necesario ayudarse con una pipeta automática). Centrifugar a 14000rpm por 5 minutos.
Eliminar el sobrenadante (con esto se lleva acabo un lavado).
2. Agregar 150 μ L de PBS. Resuspender con ayuda de una pipeta, agitar.
3. Adicionar 20 μ g de Lisozima, agitar en vortex.
4. Incubar a 37 ° C por 30 minutos, agitar.
5. Adicionar 1.4 μ L de Proteinasa K (4mg/ml). Agitar.
6. Incubar en hielo por 5 min.
7. Adicionar 10 μ L de SDS al 10%, agitar.
8. Incubar a 37° C por 40 minutos.
9. Enfriar a T° ambiente. Agregar 200 μ L de NaCl 6M.
(la adición de SDS y NaCl, es para desestabilizar los agregados protéicos y conferir carga, respectivamente, lo cual hace eficiente la remoción de proteínas durante la extracción con fenol-cloroformo-isoamílico.
10. Adicionar 800 μ L de una solución de Fenol- Cloroformo-Isoamílico (25:24:1) de la marca SIGMA, en la campana. Agitar vigorosamente por 30 seg. (Remoción de Proteínas).
11. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C.
12. Recuperar la fase acuosa (la superior, que contiene el ADN) y transferir a un tubo eppendorf limpio, desechar fase orgánica (la inferior) .

13. Repetir la extracción (del paso 11-13), hasta que la interfase (proteínas) sea nula.
14. Transferir la fase acuosa (la superior) a un tubo eppendorf (1.5 mL) limpio.
15. Adicionar 1 mL de Etanol al 100% frío, invertir el tubo de 2 a 5 veces e incubar en el congelador 1 hora. De esta manera se favorece la precipitación del ADN.
16. Centrifugar a 14,000rpm por 10 minutos a 4° C (obtenemos todo el pellet).
17. Lavar el precipitado con 300 µL de Etanol al 75%, agitar.
18. Centrifugar a 14,000rpm por 2 minutos a 4° C.
19. Desechar el Etanol y dejar que se evapore el remanente a temperatura ambiente.
20. Resuspender el pellet en 100 µL del buffer TE.

(Nubel et al., 1999 y Ampe et al., 1999).

Purificación del ADN con RNasa :

- ❖ Agregar a los 100 µL de solución de ADN, 20 µL de RNAsa (1µg/ml).
- ❖ Incubar a 37° C por 30 minutos.
- ❖ Adicionar 100µL de NaCl 6M.
- ❖ Realizar una extracción con 400µL de una solución de Fenol- Cloroformo- Isoamílico (25:24:1) de la marca SIGMA.(para eliminar proteínas remanentes como la RNAsa).
- ❖ Centrifugar a 14,000rpm por 10 minutos a 4° C.
- ❖ Seguir el protocolo anterior, a partir del paso 14.

9.4. ANEXO 4

EXTRACCIÓN DE ADN (para levaduras).

Método del fenol-cloroformo-isoamílico.

1. Añadir al paquete celular 500 μ L de buffer de extracción y resuspender perfectamente con ayuda de una pipeta automática.
2. Agregar el equivalente a 200 μ L de perlas de vidrio lavadas en ácido y estériles de 400-600 micrones de la marca SIGMA. Agitar en el vortex a máxima velocidad por 3 min.
3. Incubar a 65° C por 1 hora en el termomixer (eppendorf). Agitar en el vortex a máxima velocidad por 3 min.
4. Centrifugar a 14,000rpm por 10 minutos a 4 ° C.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y estéril.
6. Adicionar 700 μ L de una solución de Fenol-Cloroformo-Isoamílico (25:24:1) de la marca SIGMA, agitar en vortex.
7. Centrifugar a 14,000rpm por 10 minutos a 4 ° C.
8. Recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y estéril, y realizar otra extracción (paso 5 y 6).
9. Una vez recuperado el sobrenadante añadir 500 μ L de Cloroformo, agitar suavemente.
10. Centrifugar a 14,000rpm por 5 minutos a 4 ° C.
11. Recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y estéril, y añadir 324 μ L de Isopropanol FRIO.
12. Mantener el tubo en congelación al menos por una hora (para precipitar el ADN).

13. Si el ADN no precipita todavía, adicionar 4 μ L de Acetato de amonio 3M e incubar 1 hora en congelación.
14. Centrifugar a 14,000rpm por 5 minutos a 4° C, para obtener el pellet.
15. Lavar el pellet con 1 mL de Etanol al 75%, adicionar lentamente por las paredes del tubo y agitar.
16. Centrifugar a 14,000rpm por 5 minutos a 4° C.
17. Resuspender el pellet en 100 μ L de agua desionizada estéril.
18. Incubar los tubos a 55° C durante 15 minutos en el termomixer (eppendorf).
19. Guardar en congelación el templado de ADN.

(Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, 1999).

Purificación del ADN con RNasa :

- ❖ Agregar 20 μ L de RNasa (1 μ g/ml), a los 100 μ L de solución de ADN.
- ❖ Incubar a 37° C por 45 minutos.
- ❖ Adicionar 4 μ L de Acetato de amonio 3M.
- ❖ Realizar una extracción con 400 μ L de una solución de Fenol- Cloroformo- Isoamílico (25:24:1) de la marca SIGMA. (para eliminar proteínas remanentes como la RNasa).
- ❖ Seguir el protocolo anterior, a partir del paso 9.

BUFFER DE EXTRACCIÓN:

Reactivos	Cantidad (ml)
1 M tris-HCl, pH =8.0	20
5 M NaCl	5
0.5 M EDTA, pH = 8.0	5
20% SDS	2.5
Agua destilada	1000

BUFFER PBS:

Para un litro se agregan :

- NaCl 8g.
- KCl 0.2g
- Fosfato monobásico de potasio 0.24g
- Fosfato dibásico 1.44g

Se ajusta s pH= 7.4 con HCl.

BUFFER TE :

10 mM Tris-Cl, pH = 8.0

1 mM EDTA, pH= 8.0

SOL. FENOL-CLOROFORMO-ISOAMÍLICO (25:24:1), marca Sigma-Aldrich.

PERLAS DE VIDRIO lavadas en ácido (425-600 µm, Sigma-Aldrich)

ENZIMAS UTILIZADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA.

- LISOZIMA. (lisozyme, Egge white. Research Organics Inc.)
- PROTEINASA K. (Boehringer Mannheim, 14.4 mg/ml)

9.5. ANEXO 5

PURIFICACIÓN DE PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN

Pasos de purificación para la utilización del kit de purificación: High Pure PCR Product Purification kit, de ROCHE.

Para cada 50 µl de reacción:

1. Transferir el producto de PCR a un tubo estéril de 1.5ml.
2. Añadir 500 µl del reactivo del reactivo Bindin Buffer. Mezclar perfectamente, se puede hacer uso de una pipeta automática.
3. Pasar a una columna y centrifugar a 13,000xg durante 1 minuto.
4. Tirar el eluido y añadir 500 µl del Wash Buffer [1x].
5. Centrifugar a 13,000xg durante 1 minuto.
6. Eliminar el eluido.
7. Añadir 200 µl del Wash Buffer.
8. Descartar el eluido y colocar un tubo nuevo de 1.5ml.
9. Añadir 50 µl de agua destilada, filtrada estéril. (si se va a secuenciar). Mezclar.
10. Centrifugar por 1 minuto. (Para bajar)

Producto de PCR purificado.

9.6. ANEXO 6

Resultados de pruebas API

API Staph. Anotar todas las conclusiones en la hoja de resultados.

TABLA DE IDENTIFICACIÓN

TEST	COMPONENTES ACTIVOS	CANT. (mg/cúp)	REACCIONES / ENZIMA	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
0	Sin sustrato		Testigo negativo	rojo	–
GLU	D-glucosa	1.56	Test. Positivo (D-glucosa)	Rojo	Amarilo
FRU	D-fructosa	1.4	Acidificación (D-fructosa)		
MNE	D-manosa	1.4	Acidificación (D-manosa)		
MAL	D-maltosa	1.4	Acidificación (D-maltosa)		
LAC	D-lactosa	1.4	Acidificación (D-lactosa)		
	(Origen bovino)				
TRE	D-trehalosa	1.32	Acidificación (D-trehalosa)		
MAN	D- manitol	1.36	Acidificación (D-manitol)		
XLT	Xilitol	1.4	Acidificación (xilitol)		
MEL	D-melibiosa	1.32	Acidificación (D-melibiosa)		
NIT	Nitrato de potasio	0.08	Reducción de nitrato a nitritos	Incoloro rosa claro	rojo
PAL	β -naftil fosfato	0.0244	Fosfatasa alcalina	Rojo	Amarillo
VP	Pirivato de sodio	1.904	Producción de acetil-metil- carbinol (Vogues Proskauer)	incoloro rosa claro	Violeta rosaceo
RAF	D-rafinosa	1.56	Acidificación (Rafinosa)	Rojo	Amarillo
XYL	D-xilosa	1.4	Acidificación (Xylosa)		
SAC	D-sacarosa	1.32	Acidificación (Sacarosa)		
MDG	Metil- α -D- glucopiranosida	1.28	Acidificación (Metil- α -D- glucopiranosida)		
NAG	N-acetil- glucosamina	1.28	Acidificación (N-acetil- glucosamina)		
<u>ADH</u>	L-arginina	1.904	Arginina Dihidrolasa	amarillo	Naranja- rojo
<u>URE</u>	Urea	0.76	Ureasa	amarillo	Rojo violeta

*Cuando MNE y XLT van precedidos o seguidos por ensayos positivos, la prueba naranja debería considerarse negativa.

Después de la incubación, los resultados de las reacciones de las siguientes pruebas se consiguen al agregar 1 gota de cada reactivo, y después se interpretan según la tabla de resultados anterior.

- Prueba VP: Reactivos VP 1 y VP 2. Esperar 10 minutos. Un color violeta-rosáceo indica una reacción positiva. Un color rosa pálido o rosa claro obtenido después de 10 minutos debe ser considerado como negativo.
- Prueba NIT: Reactivos NIT 1 y NIT 2. Esperar 10 minutos. Un color rojo indica una reacción positiva.
- Prueba PAL: Reactivos ZYM A y ZYM B. Esperar 10 minutos. Un color violeta indica una reacción positiva.

API CHB/E

Lectura de las galerías (consultar la ficha técnica de API 50 CH).

Filas de 0 a 19

Tubo	Ensayo	Componente activo	Cant. mg/cup	Tubo	Ensayo	Componente activo	Cant. (mg/cup.)
0		Testigo	1.64	10	GAL	D-Galactosa	1.4
1	GLY	Glicerol	1.44	11	GLU	D-glucosa	1.56
2	ERY	Eritritol	1.4	12	FRU	D-fructosa	1.4
3	DARA	D-arabinosa	1.4	13	MNE	D-mannosa	1.4
4	LARA	L-arabinosa	1.4	14	SBE	L-sorbosa	1.4
5	RIB	D- ribosa	1.4	15	RHA	L-rhamnosa	1.36
6	DXYL	D-xylosa	1.4	16	DUL	Dulcitol	1.36
7	LXYL	L-xylosa	1.4	17	INO	Inositol	1.4
8	ADO	D-adonitol	1.36	18	MAN	D-manitol	1.36
9	MDX	Metil-βD-xylopiranosida	1.28	19	SOR	D-sorbitol	1.36

Filas de 20 a 29

Tubo	Ensayo	Componente activo	Cant. (mg/cup.)
20	MDM	Metil- α D-Manopiranosida	1.28
21	MDG	Metil- α D-Glucopiranosida	1.28
22	NAG	N-acetilglucosamida	1.28
23	AMY	Amigdalina	1.08
24	ARB	Arbutina	1.08
25	ESC	Esculina Citrato férrico	1.16 0.152
26	SAL	Salicina	1.04
27	CEL	D-celobiosa	1.32
28	MAL	D-maltosa	1.4
29	LAC	D-lactosa	1.4

Filas de 30 a 39

Tubo	Ensayo	Componente activo	Cant. (mg/cup.)
30	MEL	D-melibiosa	1.32
31	SAC	D-sacarosa	1.32
32	TRE	D-trehalosa	1.32
33	INU	Inulina	1.28
34	MLZ	D-melezitosa	1.32
35	RAF	D-rafinosa	1.56
36	AMD	Almidón	1.28
37	GLYG	Glicógeno	1.28
38	XLT	Xilitol	1.4
39	GEN	Gentiobiosa	0.5

Filas de 40 a 49

Tubo	Ensayo	Componente activo	Cant. (mg/cup.)
40	TUR	D-turanosa	1.32
41	LYX	D-lixosa	1.4
42	TAG	D-tagatosa	1.4
43	DFUC	D-fucosa	1.28
44	LFUC	L-fucosa	1.28
45	DARL	D-arabitol	1.4
46	LARL	L-arabitol	1.4
47	GNT	Gluconato potásico	1.84
48	2KG	2-cetogluconato potásico	2.12
49	5KG	5-cetogluconato potásico	1.8

- La lectura de las galerías se realiza a los tiempos de incubación definidos (24H, 48H por ejemplo), dependiendo del microorganismo y del tipo de reacción estudiada.
- Interpretar cada ensayo como positivo (+) si vira amarillo, negativo (-) rojo, dudoso (?), y anotarlos en las hojas de resultados.

9.7. ANEXO 7

CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

Conservación en Chaquiras.

- Inocular 4ml de Caldo Nutritivo (estéril), tomando la asada de una colonia pura (preferentemente de un cultivo recién crecido), de la cepa que se desea conservar; en un tubo para centrifuga de 50ml.
- Incubar a 37° por 24 horas.
- Ya crecidos los microorganismos (observa turbidez en el tubo), medir la densidad óptica (D.O) a 600nm, de la siguiente forma:
Tomamos 0.1ml del medio inoculado y lo diluimos en 0.9ml de caldo nutritivo estéril, y la colocamos en una celda. A esta dilución se le mide la D.O (debe ser mayor de 0.5). Si no se obtiene esta D.O dejar incubar otras 24 horas hasta obtenerla.
- Una vez que alcanzamos la D.O adecuada, centrifugar a 10,000rpm por 15 minutos.
- Colocar el mosto de células obtenidas, en 2ml de caldo nutritivo con glicerol al 15% estéril. Homogenizar bien.
- Llenar con 0.6ml del medio (obtenido en el paso anterior) un vial que contenga de 10 a 5 chaquiras, previamente estériles. Realizar este paso dos veces más, de manera, que al final queden tres viales llenos.
- Eliminar el exceso de medio en cada vial, con ayuda de una pipeta pasteur estéril.
- Etiquetar los viales con el nombre de cada cepa y la fecha.
- Almacenar en el ultracongelador.

Secuencias de nucleótidos



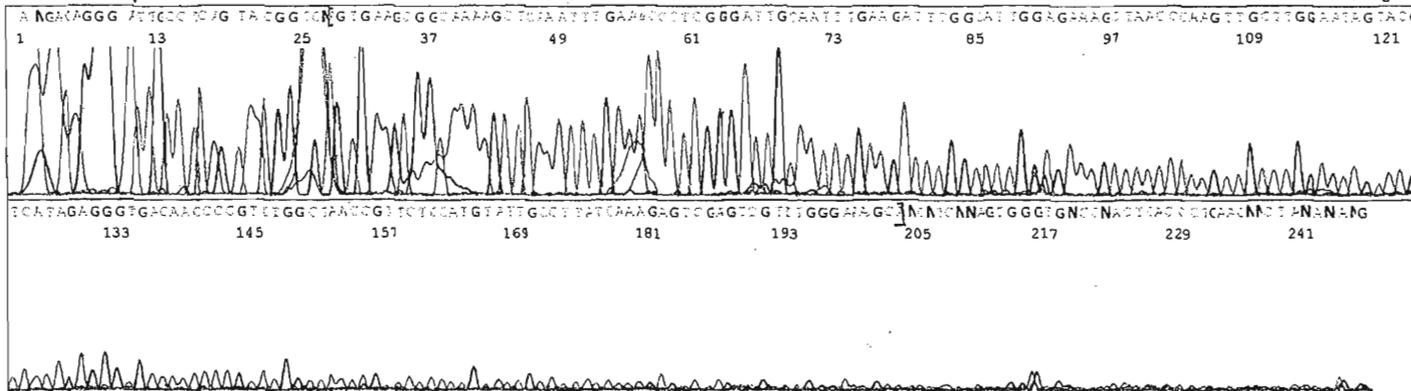
Signal G:45 A:51 T:38 C:34 AvSig:42
Basecaller-3100POP6SR.bcp
BC 1.5.1.0 Cap:8

EV6_NL1
16379

DT3100POP6(BDv3)v1.mob
Pts 670 to 3500 Pk1 Lcc:670

Version 5.1 HiSQV Bases:0 VERONICA GARCIA

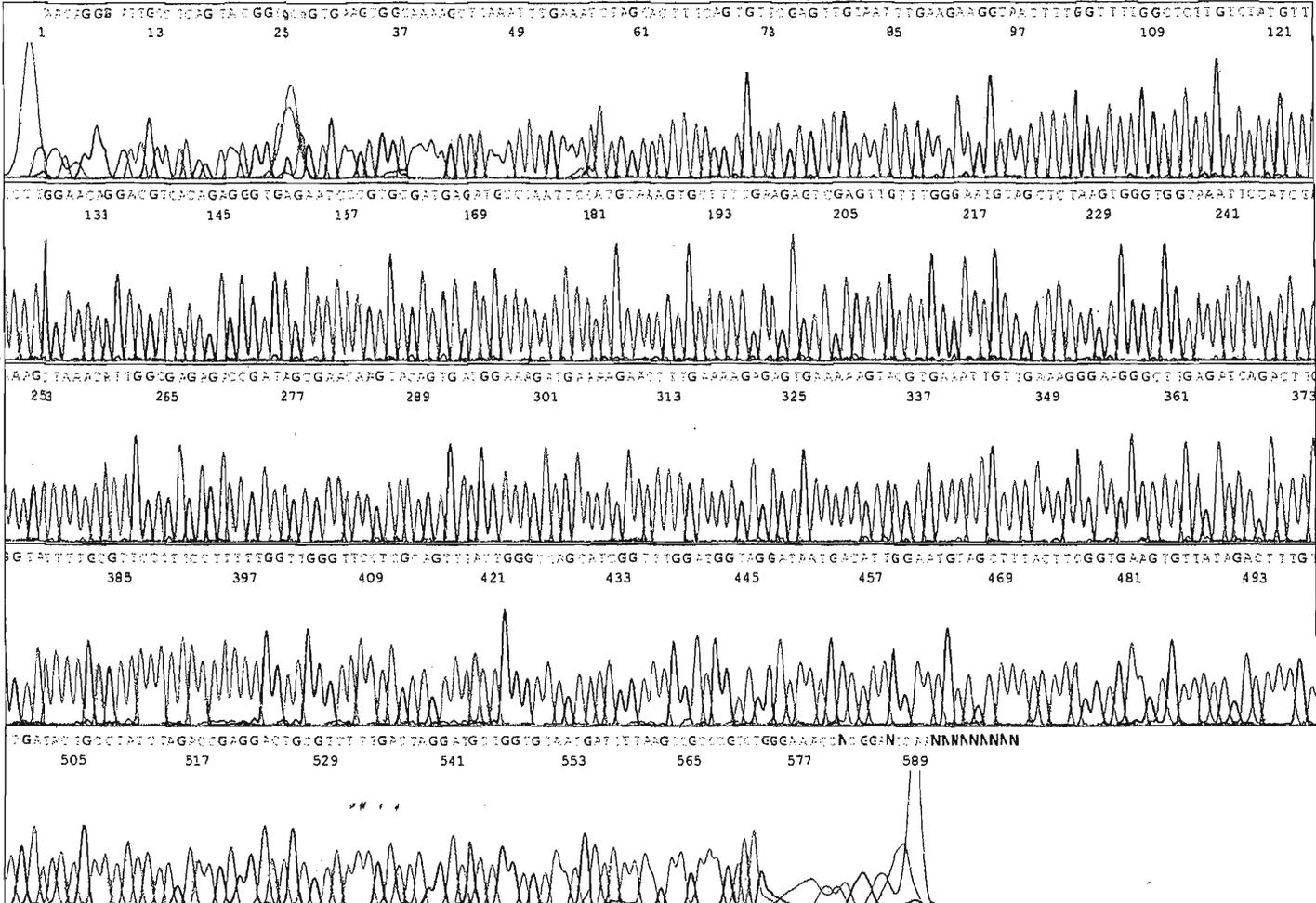
Inst Model/Name 3100/demo_3100
Jun 01,2006 03:26PM, CEST
Jun 01,2005 03:26PM, CEST
Spacing:11.63 Pts/Panel1500
Plate Name: Unassigned



SignalG:248 A:201 T:226 C:133 AvSig:202
Basecaller-3100POP69R.bcp
BC 1.1.1.0 Cap:10

DT3100POP6(BDv3)v1.mob
Pts 629 to 7200 Pk1 Loc:629

Version 5.1 HISQV Bases: 0 VERONICA GARCIA





EV5_338F
16375

Inst Model/Name 3100/demo_3100

May 30, 2006 07:35PM, CEST

Signal G:3168 A:2953 T:2540 C:2771 AvSig:2858

DT3100POP6(BDv3)jv1.mob

May 30, 2006 07:35PM, CEST

Basacaller-3100POP6SR.bcp

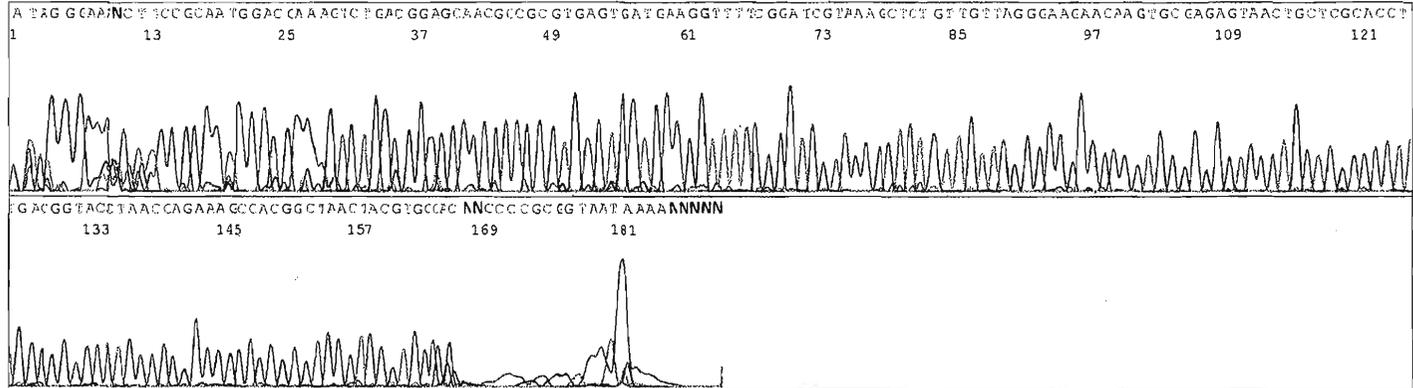
Pts 768 to 3000 Pk1 Loc:768

Spacing:11.5 Pts/Panel1500

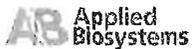
BC 1.5.1.0 Cap:8

Version 5.1 HISQV Bases: 0 VERONICA GARCIA

Plate Name: Unassigned



#



Signal G:827 A:788 T:574 C:591 AvSiz:695

Basecaller-3100POP6SR.bcp

BC 1.5.1.0 Cap:2

C17_338F

18376

DT3100POP6(BDv3)v1.mob

Pts 796 to 3100 Pk1 Loc:796

Version 5.1 HISQV Bases: 0 VERONICA GARCIA

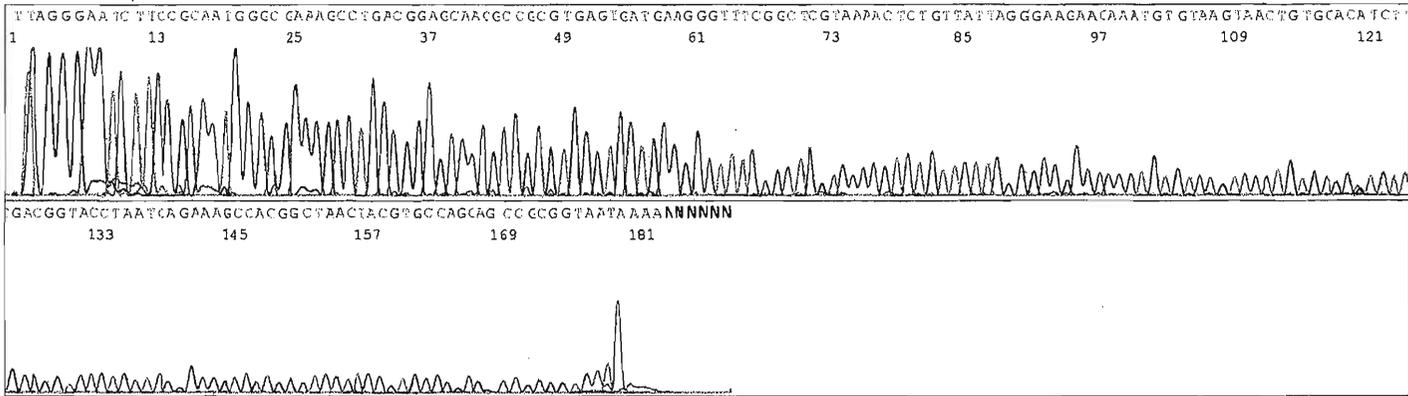
Inst Model/Name 3100/demo_3100

Jun 01,2006 03:26PM, CEST

Jun 01,2006 03:26PM, CEST

Spacing:11.9 Pts/Panel1500

Plate Name: Unassigned





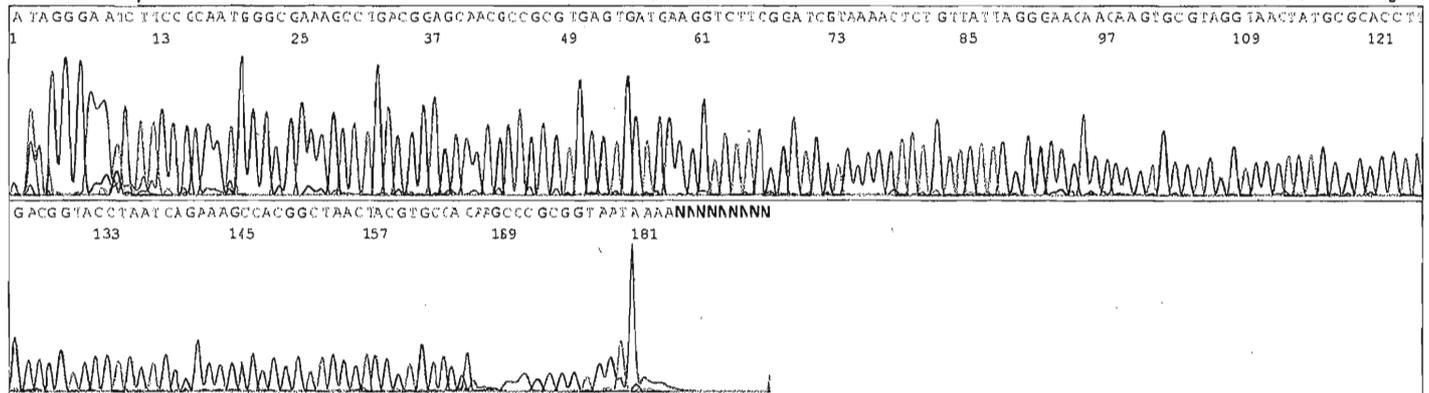
C18_338F
16377

Inst Model/Name 3100/demo_3100
Jun 01, 2006 03:26PM, CEST
Jun 01, 2006 03:26PM, CEST
Spacing: 11.76 Pts/Panel1500
Plate Name: Unassigned

Signal G:2112 A:2124 T:1604 C:1764 AvSig:1901
Basecaller-3100POP6SR.bcp
BC 1.5.1.0 Cap:4

DT3100POP6(BDv3)v1.mob
Pts 789 to 3100 Pk1 Loc:789

Version 5.1 HISQV Bases: 0 VERONICA GARCIA





C111_338F
16378

Inst Model/Name 3100/demo_3100

Jun 01, 2006 03:26PM, CEST

Signal G:1390 A:1022 T:850 C:823 AvSlg:1021

DT3100POP6(BDv3)v1.mob

Jun 01, 2006 03:26PM, CEST

Basecallr-3100POP6SR.bcp

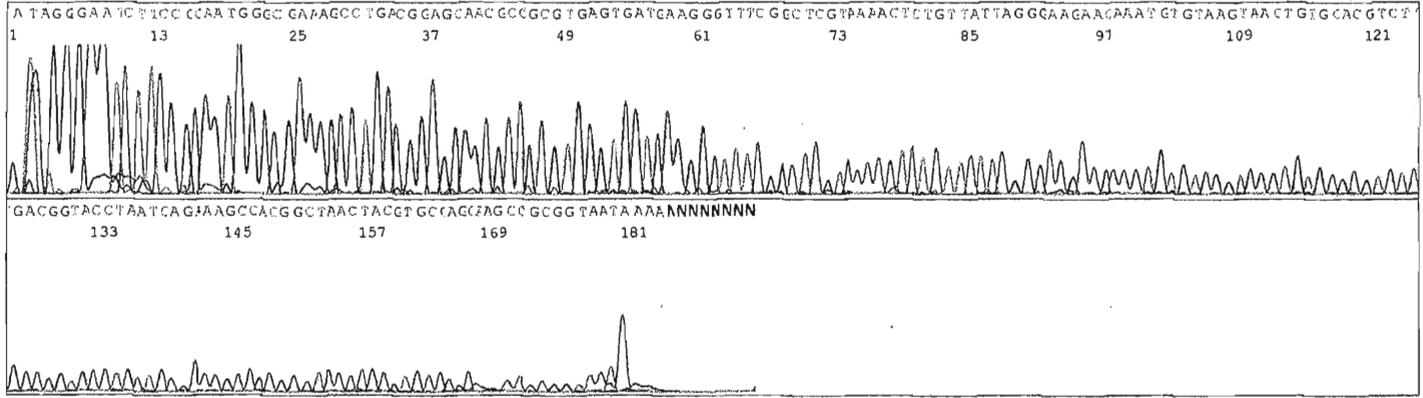
Pts 803 to 3100 Pk1 Loc:803

Spacing:11.76 Pts/Panel1500

BC 1.5.1.0 Cap:6

Version 5.1 HISQV Bases: 0 VERONICA GARCIA

Plate Name: Unassigned



10. BIBLIOGRAFÍA.

- ¹ **Albenzio M., Corbo, M. R., Rehman, S. U. (2001).** " *Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey*", International Journal of Food Microbiology (67)35-48.
- ² **Barajas A. Rubén, López B. Esteban, Morales C. Patricia. (2005).** "*Reglas de uso. Marca colectiva (Queso Cotija Región de Origen)*". Impreso en México.
- ³ **Becker K, Harmsen D, Mellmann A, Meier C, Schumann P, Georg P, and Von Eiff C. (2004).** "Development and Evaluation of a Quality-Controlled Ribosomal Sequence Database for 16S Ribosomal DNA-Based Identification of *Staphylococcus* Species". Journal of Clinical Microbiology, p. 4988-4995.
- ⁴ **Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan N. L. Cogan T. M. (2001).**" *Recent advances in cheese microbiology.*" International Dairy Journal (11) 259-274.
- ⁵ **[Bigev F](#), [Tuery K](#), [Bougard D](#), [Nicaud JM](#), [Moulin G](#). (2003).** "Identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression." France.
- ⁶ **Couto Isabel, Pereira Sandro, Miragaya Maria, Santos Ilda, and Lencastre. (2001).** "Identification of Clinical Staphylococcal Isolates from Humans by Internal Transcribed Spacer PCR". Journal of Clinical microbiology. pp3099-3103.
- ⁷ **Deak T., Chen J., Beuchat L. R. (2000).** "Molecular Characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* Isolated from Poultry". Disponible en línea <http://aem.asm.org/cgi/content/full/66/10/4340>
- ⁸ **Desarrollo teórico de temas.** "Enzimas de restricción". (Disponible en línea http://ejb.ucv.cl/gmunoz/genweb/genetica/frame/textos/4_2enzim_restric.htm)
- ⁹ **Díaz Gloria, Wachter Carmen (2003).** "Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados". Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol.45, No.1-2. pp30-40.
- ¹⁰ **Drenan R.E. Home Inspection. (2004).** Mold Glossary. "*Candida zeylanoides*". (Disponible en línea <http://www.redrennan.com/moldGlossary.html>)

- ¹¹ **Ercolini Danilo. (2003).** “*PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food*”. Journal of Microbiological Methods. 56, 297-314.
- ¹² **Entrala Carmen. (2000).** Técnicas de análisis del ADN en Genética Forense. “PCR”. Lab. De ADN forense, Dpo. De Medicina Legal. Universidad de Granada, España. (Disponible en línea <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/forensetec.htm>)
- ¹³ **Fox F. Patrick, Guinee P. Timothy, Cogan M. Timothy, Paul L.H. (2000)** *Fundamentals of Cheese Science*. An Aspen Publication. Impreso en Estados Unidos de América.
- ¹⁴ **Gardini F., Tofalo R., Belletti N., Iucci L. (2005).** “Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese”, Verona, Italy.
- ¹⁵ **GenomeNet.** Bioinformatics Center Institute for Chemical Research Kyoto University. (Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW). Disponible en línea <http://align.genome.jp/>
- ¹⁶ **Guilfoile Patrick (8/2002)** Técnicas de la biotecnología y su trasfondo. Un artículo original de Action Bioscience.org (disponible en línea <http://www.actionbioscience.org/esp/education/guilfoile.html>)
- ¹⁷ **Hernández, Verónica. (2006).** “Comparación de la composición química de diversas muestras de Queso Cotija”. Proyecto final de Labdea, Facultad de Química, UNAM.
- ¹⁸ **Manual de Análisis de Alimentos.** “Determinación de proteína cruda. Método de Kjeldahl”. Facultad de Química de la UNAM, Departamento de Alimentos.
- ¹⁹ **Manual de productos Lácteos.** “Determinación de grasa en quesos (Método de Gerber-Vangulik)”. Facultad de Química de la UNAM, Departamento de Alimentos.
- ²⁰ **Marilley L., Casey, M. G. (2003).** “*Flavors of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains*”, International Journal of Food Microbiology (xx) 1-21.
- ²¹ **Martin N., Berger C., Le Du C., H. E. Spinnler H. E. (2001).** “*Aroma Compound Production Cheese Curd by Coculturing with Selected Yeast and Bacteria*”. Journal Dairy Science.Francia.

²² **Muyzer, 1999.** “*DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems*”. Current Opinion in Microbiology. Vol. 2 pag. 317-322.

²³ **NCBI.** National Center for Biotechnology Information. (nucleotide-nucleotid BLAST). U. S. National Library of Medicine. Base de datos disponible en línea www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi

²⁴ **NMX-F-099-1970.** Norma Mexicana. Métodos de prueba para la determinación de pH en quesos procesados.

²⁵ **NMX-F-111-1984.** Norma Mexicana. Determinación de sólidos totales en queso.

²⁶ **NMX-F-206-1986.** Norma Mexicana. Determinación de acidez expresada como ácido láctico en leche en polvo.

²⁷ **NMX-F-701-COFOCALEC-2004.** Norma Mexicana. Sistema producto leche- Alimentos Lácteos. Determinación de cenizas en quesos. Método de prueba.

²⁸ **NOM-092-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

²⁹ **NOM-110-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras para su análisis microbiológico.

³⁰ **NOM-111-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

³¹ **NOM-112-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Determinación de bacterias coniformes. Técnica del número más probable.

³² **NOM-121-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.

³³ **Pantucek Roman, Sedlacek Ivo, Doskar Jirí y Rosypal Stanislav. (1999).** ”Complex genomic and phenotypic characterization of the related species *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans*”. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol 49, pp941-951.

- ³⁴ **Randazzo, C. L, Torriani, S., Antoon D. L, (2002)** “*Diversity Dinamics and Activity of bacterial Commiunites during production of an Artisanal Sillian cheese as Evaluated by 16s rRNA*”, Applied and Environmental Microbiology, 68(4)1882-1892.
- ³⁵ **Raz Raúl, Colodner Raul, and Calvin M. Kunin. (2005).** ”Who are you- *Staphylococcus saprophyticus*?”. BRIEF REPORT. Clinical Infectious Diseases; 40:896-8.
- ³⁶ **Rivas Angel (2004).** “*Queso Cotija y Chihuahua*”. Lácteos. Vol. 15.
- ³⁷ **Seeley W. Harry, Van Demark J. Paul. (1972).** “Microbes in action” Segunda edición. Ed.Freedman and Company.
- ³⁸ **Servicio de Separación Celular y Secuenciación.** Universidad de Zaragoza, España. Secuenciación de 16S rDNA para la identificación de microbacterias a nivel de especie. (disponible en línea <http://wzar.unizar.es/invest/sai/secuen/prestaci/ejemplo2.html>).
- ³⁹ ***S. psifermentans.*** Enciclopedia en línea,
- ⁴⁰ **Tatsufumi Takahashi, Itona Satoh and Naoya Kikuchi. (1999).** “Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis”. International Journal of Systematic Bacteriology. **49**, 725-728.
- ⁴¹ **Tessi, M.A (Procale), GRUPOS MICROBIANOS DE MAYOR RELEVANCIA EN LECHE CRUDA** (Extraído de "Calidad Bacteriológica de Leche Cruda de Vaca" (en línea, disponible http://www.agro.unlpam.edu.ar/lecheria/GRUPOS_RELEVANTES_EN_LECHE_CRUDA.htm).
- ⁴² **Vanderzant Carl, Don F. Splittstoesser. (1992).** Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Third Edition. Printed in the United States of America by American Public Health Association.
- ⁴³ **Wikipedia.** The free Encyclopedia. “*Staphylococcus saprophyticus subs. Saprophyticus*”. **Revista 04/2004.**
(Disponible en línea http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_saprophyticus)
- ⁴⁴ **Wikipedia.** The free Encyclopedia. “*Staphylococcus xylosus*”. (Disponible en línea http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_xylosus

⁴⁵ **Wong P. (2001)**. “Lipasa termoestable de *B. pumillus* GMA1: producción fermentativa y algunas propiedades”. Tesis de licenciatura. Fac. Química UNAM. pp.20-22.

⁴⁶ *Yarrowia lipolítica*. (Disponible en línea <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/84/10/2125>)