



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

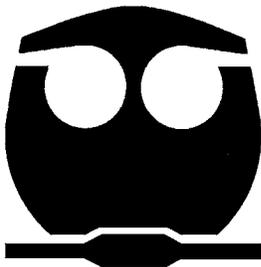
***“IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS
PROTEOLÍTICAS AISLADAS DE QUESO COTIJA,
UN ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y
FISICOQUÍMICO”***

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

NAYELI HERNÁNDEZ MEJÍA



México, DF

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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).

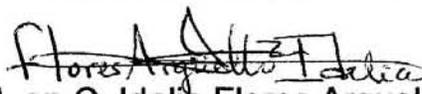
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

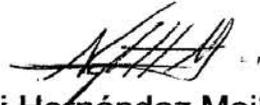
Jurado asignado:

Presidente	Profa. Mercedes Palao Rincón
Vocal	Profa. Aurora Irma Ortegón Ávila
Secretario	Profa. Maricarmen Quirasco Baruch
1er Suplente	Profa. Amelia Ma. De Gpe. Farrés González Saravia
2do Suplente	Prof. Francisco Ruiz Terán

Departamento de Alimentos y Biotecnología,
Conjunto E Laboratorio 312
Facultad de Química.

Asesor: 
Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Supervisor Técnico: 
M. en C. Idalia Flores Arguello

Sustentante: 
Nayeli Hernández Mejía

Este trabajo de investigación recibió apoyo de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), proyecto PAPIIT IN200705: “*Caracterización de la microbiota presente en quesos tradicionales mexicanos*”

***Dedico enteramente este trabajo a quien más me ha procurado en la vida,
mi madre: Andrea Mejía Salazar.***

Porque sin tu amor y apoyo infinitos, no sería la mujer que soy.

Con entera gratitud, hoy te expreso la monumental dicha que me causa ser tu hija. ¡Gracias mamita! Por ser mi ejemplo de vida, porque gracias a ti, he recibido todo el cariño, el bienestar y la educación que un hijo puede anhelar.

Te admiro infinitamente por el empeño y la dedicación con que realizas tu trabajo, por tus valores, por tu sabiduría, por tu entereza; sencillamente, porque eres una gran mujer.

Gracias por brindarme tan firmes cimientos, por tu protección, por tus cuidados, por ser la luz guía en mi camino; por tu incondicional ayuda para ver materializados mis deseos, inquietudes, aspiraciones, metas y pasiones, que también son tuyos; por compartir conmigo tan grandes momentos de alegría, por consolarme en los escasos instantes de tristeza; por darme siempre aliento y motivación en la bruma de la incertidumbre; por acompañarme en tantas noches de desvelo, por todo lo que me has dado a lo largo de mi vida.

¡Mil gracias! Te amo.

También dedico este trabajo:

A ti Padre, Juan Hernández Coronel, gracias por todo el afecto que me has ofrecido, por tu sustento, tus consejos y tus enseñanzas, por encaminarme todos estos años; porque desde niña me inculcaste que podría lograr lo que yo me propusiera. Por proporcionarme tantos momentos de júbilo en mi infancia y adolescencia. Por los ratos dedicados con paciencia en los que me ayudaste para poder cumplir con mis tareas y eventos. Por darme tu ejemplo al practicar la docencia con didáctica y esmero.

A mi hermana, Ayari, mi siempre compañera y confidente. Te amo, ¡siempre podrás contar conmigo!

A mi Abue, Ofelia Salazar, porque sé que me cuidas desde donde quiera que estés, porque eres mi ángel y mi lazo con Dios, porque gracias a ti, creo en Él y en su magnificencia. Gracias por tus acertadas recomendaciones, oraciones y todas tus bendiciones. Siempre vivirás en mis pensamientos y estarás en mi corazón.

A mi Familia, mis tías y tíos, Salus, Eva, Samantha, Jesús, Alberto y Alfonso, gracias por su cariño incondicional, sus atenciones, cuidados y por ser parte fundamental de mi educación. A mi prima querida Caro, ¡gracias por ser un pilar para nosotras! Porque admiro tus logros profesionales; a Luis porque siempre está dispuesto a auxiliar a la familia.

A mi mejor amiga, Miriam, por todos los momentos compartidos a lo largo de estos 14 años que llevamos de conocernos, por vivir y crecer conmigo, por tu compañía y apoyo moral en los tiempos difíciles, por las alegres y cansadas noches de baile, por las interminables charlas, por el desahogo y ánimo causados por desamores, accidentes, problemas e inconformidades de la vida. Gracias por estar ahí sin importar el porque ni para que.

A mis amigos y amigas de la ENP # 2, Cid, Manolo, Miguel, Fernando, Jonatan y Francisco, Rosalba, Jessica y Paola. Por la perdurable amistad, por compartir conmigo el paso de la vida desde la adolescencia a la juventud y la madurez. A pesar del vaivén de acercamientos y distanciamientos, seguimos unidos por los irrepetibles momentos compartidos en la Prepa, en las fiestas y reuniones.

A mis amigas y amigos de la Facultad de Química, Lina Raquel, Ely, Lily, Karis, Lupis, Iliana, Tito, Juan, Toño, Mike, Temo, Jorge, Héctor y demás colegas que compartieron conmigo las aulas, laboratorios, pasillos y "Quemas de Batas". Por los días que pasamos anhelando un rato de sueño, comida o diversión; por el compañerismo mutuo. Deseo que aunque pasen los años, nos reunamos felizmente recordando nuestras vivencias en la Fac.

A los chicos especiales en mi vida, Leonardo, Julio y Luis, están presentes en mí, porque vivimos la dicha del enamoramiento y la amistad antes y después de cada historia compartida. Guardo gratos recuerdos en mi pensamiento y en el corazón.

A mis entrañables amigas de la danza y amigos del baile, Angélica R., Lina., Maricarmen. Marco M. y Miguel A., por ser participes de mi gran pasión.

Al Lic. Gabriel Torres por su apoyo para mi superación profesional y personal, gracias por tus consejos y ánimos en los momentos difíciles que pasé después de mis accidentes y por brindarme la confianza para iniciar mis proyectos artísticos.

A mis "profes" queridos que compartieron conmigo desinteresadamente sus conocimientos, Maestra Carmen Vite, Germán, Alex y Oscar porque forman parte importante de etapas de mi vida, porque contribuyeron a la formación de mi carácter, personalidad y de alguna forma marcaron notablemente mi existencia.

***Quiero agradecer a todas las personas que han contribuido tanto en mi formación profesional, como personal. Agradezco primordialmente a la Institución que me forjó desde mi educación secundaria, a mi alma máter:
La UNAM.***

Agradezco especialmente a la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, por el interés y la dedicación con la que siempre dirigió este proyecto, por sus enseñanzas, estímulos, consejos, apoyo, motivación, paciencia y entusiasmo durante estos dos años. Por encauzar mis ideas y planteamientos y por disipar mis dudas.

A la M en C Idalia Flóres Argüello por su guía, atención, asesoramiento y sugerencias para mejorar el trabajo de investigación, y sobretodo, por la amena compañía durante las largas horas de trabajo experimental.

Me complace profundamente haber tenido la oportunidad de formar parte de la actividad de investigación que se desarrolla en el laboratorio 312. Agradezco a la Dra. Amelia Farrés y a la Dra. Amanda Gálvez por las fructíferas aportaciones brindadas durante los seminarios, gracias por compartir sus vastos conocimientos. A la M en C Sandra Pérez porque sus indicaciones y supervisiones durante mi estancia en el laboratorio, contribuyeron a la formación de mi temple. Es preciso mencionar, que el trabajo y convivencia ahí experimentados, han sido hasta hoy, de los elementos más valiosos en mi formación como Química de Alimentos.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 312: Abraham, Raúl, Bere, Vero G, Verito, Paloma, Amanda, Paty, Cindy, Linda, Vanesa, Caro, Denise, Adriana, Gaby, Norma, Katya, Aidee, Ángeles, Israel, Carmen, Armando, Mario, Florencia, Mirna y Karina. Gracias por su compañía, colaboración, consejos, sugerencias y los conocimientos compartidos a lo largo de este proyecto, desde la información y contribuciones en el desarrollo experimental de esta tesis, hasta la lluvia de ideas para mejorar mis presentaciones y carteles.

*A mis mentoras de la Microbiología de Alimentos, las profesoras:
M en C Mercedes Palao y QFB Aurora Ortégón, muchas gracias por sus observaciones y correcciones y por brindarme su confianza en el camino de la enseñanza. A la QFB Martha Giles, por su permanente disposición de compartir sus conocimientos y experiencias conmigo, ¡gracias por tu amistad! Y a la Dra. Carmen Wachter, por sus enseñanzas, su apoyo, su generosa ayuda y amabilidad, desde mi formación como estudiante, hasta mi transición al maravilloso mundo de la docencia. ¡Gracias por todo! Les ofrezco todo mi respeto y admiración.*

“IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PROTEOLÍTICAS AISLADAS DE QUESO COTIJA, UN ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y FISICOQUÍMICO”

Índice

	Pág.
I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	
El Queso	5
Clasificación de los quesos mexicanos	6
El queso Cotija	9
Importancia de la microbiota del queso	12
III. ANTECEDENTES	
Elaboración del queso Cotija	13
Características del Cotija Región de Origen	17
Generalidades de los microorganismos presentes en quesos	18
El proceso proteolítico en el queso	19
Factores que afectan el crecimiento microbiano	22
Microorganismos presentes en la leche	25
IV. JUSTIFICACIÓN	26
V. HIPÓTESIS	26
VI. OBJETIVOS	27
VII. METODOLOGÍA Y MUESTRAS	28
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Análisis fisicoquímico y Análisis Químico Proximal	30
2. Análisis Microbiológico	37
3. Aislamiento de microorganismos proteolíticos	39
4. Comparación de la actividad proteolítica	42
5. Identificación de los microorganismos proteolíticos mediante técnicas moleculares (ARDRA)	43

	Pág.
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1. Análisis fisicoquímico y Análisis Químico Proximal	
Actividad acuosa (a_w)	50
pH y Acidez	51
Humedad	52
Grasa	53
Proteína	54
Cenizas	55
Resultados analíticos globales	56
2. Análisis microbiológico	62
3. Aislamiento de microorganismos proteolíticos	66
Resultados de la cuantificación de microorganismos proteolíticos	67
Imágenes de las colonias proteolíticas aisladas de quesos rendidos	68
Características de las colonias proteolíticas aisladas	69
Imágenes de las colonias proteolíticas purificadas	70
4. Comparación de la actividad proteolítica	72
Imágenes de la comparación de la actividad proteolítica	75
5. Identificación de las bacterias proteolíticas seleccionadas mediante técnicas moleculares	
Extracción del ADN	77
Cuantificación del ADN	79
Reacción de PCR	81
Digestión del producto de PCR con enzimas de restricción	82
Características usadas como criterio de selección para secuenciación	85
Secuenciación del ADN	86
Bacterias proteolíticas identificadas	88
Identificación y características de las bacterias proteolíticas aisladas de quesos Cotija	101
X. CONCLUSIONES	103
XI. ANEXOS	
1. Selección y preparación del medio proteolítico	105
2. Reactivos y medios para la extracción de ADN	108
3. Procedimiento para la purificación de los productos de PCR	110
4. Valores de las mediciones realizadas para la comparación de la actividad proteolítica	111
5. Cálculos de la concentración de ADN para la reacción de PCR	114
6. Secuencias de nucleótidos	115
7. Índice de Tablas, Figuras y Gráficos	122
XII. BIBLIOGRAFIA	124

I. RESUMEN

El queso Cotija, mundialmente reconocido, es peculiar por su elevado contenido de sal, baja humedad, sabor seco y fuerte, y por ser de una pasta prensada, madurada y desmoronable. Se elabora de manera tradicional en los estados de Michoacán y Jalisco con leche cruda de vaca. Al producirse todavía de manera artesanal y sin estandarización de condiciones de elaboración, es de esperarse que presente variabilidad en cuanto a su composición química y microbiana. La proteólisis es un proceso bioquímico importante en la maduración, ya que contribuye directamente al sabor del queso al liberar péptidos y aminoácidos, además es la principal responsable de cambios de textura.

En el presente trabajo se realizó el estudio de seis quesos Cotija en diferente estado de maduración y provenientes de diferentes productores con el fin de realizar el análisis microbiológico general, y el aislamiento y la identificación de microorganismos proteolíticos que pudieran ser responsables de los procesos degradativos de las proteínas durante la maduración del producto.

El estudio se complementó con el Análisis Químico Proximal y las determinaciones de a_w , pH y acidez para comprender mejor el medio en el que se encuentran los microorganismos en estudio.

Se adecuó el medio selectivo para visualizar la actividad proteolítica: Agar Calcio-Caseinato adicionado con 0.5% de leche descremada, en el cual se aislaron las colonias con dicha actividad. Se observó la actividad proteolítica debido a la formación de halos translúcidos formados por la proteólisis ocasionada por los microorganismos capaces de degradar las proteínas del medio.

De las muestras analizadas que presentaron la mejor calidad microbiológica (NMP <4 coliformes totales/g), se aislaron 90 colonias con actividad proteolítica en Agar Calcio-Caseinato, de las cuales 16 presentaron la mayor actividad, la cual se observó midiendo la relación de diámetro

halo/diámetro colonia en el medio selectivo. De éstas, se amplificó la región V3 del ARNr 16S y por Análisis de Restricción de DNA ribosomal amplificado (ARDRA), prueba de catalasa y observación morfológica y microscópica, se seleccionaron a las bacterias “diferentes”, cuyos amplicones se secuenciaron y compararon con la base de datos (BLAST).

Se observó que, como consecuencia de la actividad metabólica de los microorganismos durante la maduración, hay un aumento de acidez y disminución en el pH; también se va perdiendo humedad con lo que se concentra la cantidad de sal (por lo tanto el a_w disminuye), limitando así el crecimiento microbiano. También se observó que el tiempo de maduración es indirectamente proporcional a la carga de microorganismos indicadores.

El análisis de los resultados sugiere que sí hubo una variabilidad del producto en cuanto a sus componentes nutricionales con respecto al productor y sobre todo con respecto al estado de maduración pero en este último aspecto sobresalió más la variabilidad del producto en cuanto a su carga microbiana.

Se aislaron e identificaron bacterias proteolíticas del género *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*; en la mayoría de los casos se obtuvieron identidades >97%. Esto se explica puesto que bacterias del género *Bacillus* se han reportado presentes en el medio ambiente propio de las granjas, y sus esporas en alimento para ganado, heces y en ubres de animales. Por otra parte, los *Staphylococcus* son microorganismos acidófilos y halotolerantes, lo que corresponde a los resultados de los análisis químicos efectuados sobre los quesos. Es importante mencionar que sólo se pudo aislar una bacteria láctica (*Enterococcus faecalis*) y aunque está reportado en la literatura que las bacterias ácido lácticas no poseen mucha actividad proteolítica y lipolítica esta cepa si presentó cierta actividad proteolítica, tal como lo menciona Pouch Downes.

Se aislaron los siguientes microorganismos:

Bacillus megaterium, *Bacillus flexus*, *Bacillus licheniformis* o *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus mojavensis*, *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri*, *rodentium* o *carnaticus* y *Enterococcus faecalis*.

II. INTRODUCCIÓN

El Queso es una mezcla de proteínas, grasa y otros componentes lácteos, es decir, la concentración de los sólidos de la leche; que se obtiene por el fenómeno de coagulación de las caseínas de la misma, y por la acidificación y deshidratación de la cuajada.

Es el nombre genérico para un grupo de alimentos fermentados a base de leche; existen más de 500 variedades en el mundo. Algunos autores, mencionan más de 1000 tipos diferentes (Fox, 1987). La conversión de leche a queso ha sido probablemente la manera más efectiva de almacenamiento de la leche de forma sólida, en la que cambios físicos, químicos y microbiológicos juegan una parte importante en el proceso de formación del queso (Robinson 1990).

No hay conocimiento exacto del origen de la fabricación del queso sin embargo hay registros en Sánscrito por los Sumerios 4000 años A.C. (Robinson 1990). “En México, el queso empezó a elaborarse en la época de la colonia, cuando los conquistadores españoles trajeron los primeros hatos de ganado criollo. Pronto se desarrollaron zonas de fuerte actividad ganadera como los Altos de Jalisco, que desde antaño ha estado vinculada a la actividad productora de queso.”¹

La gran variedad de este producto se explica por dos hechos esenciales:

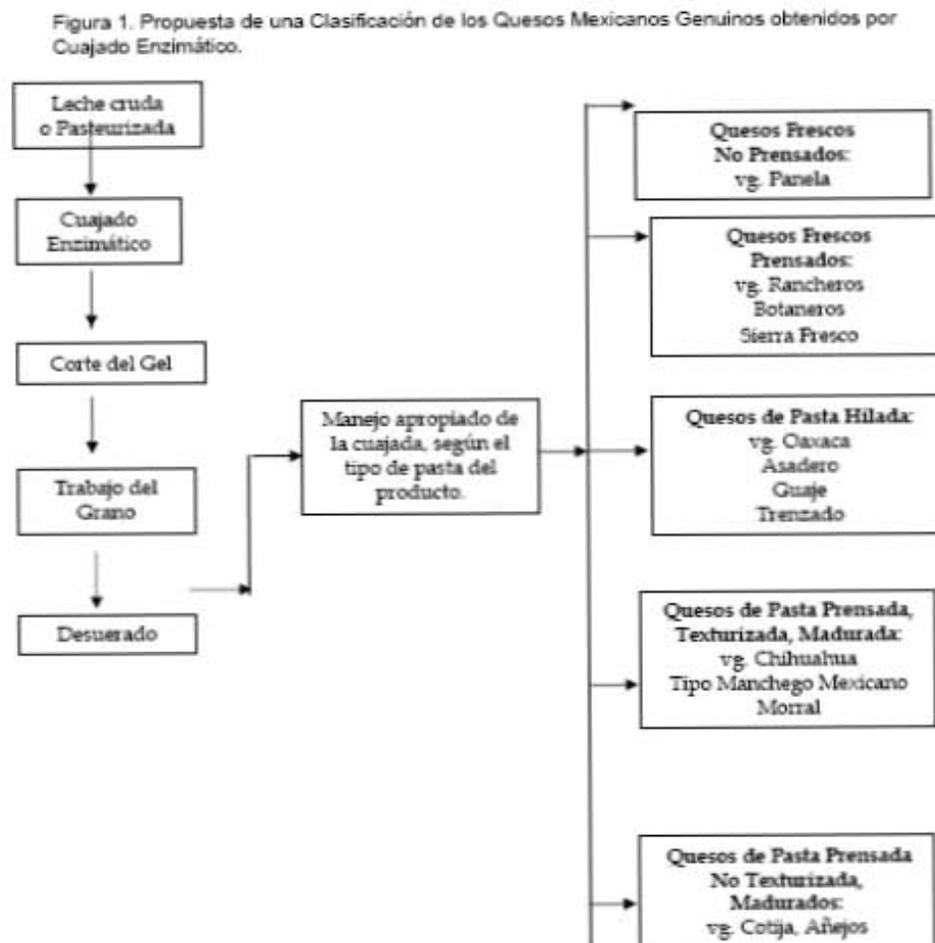
- *Por la naturaleza de la leche.* Las pequeñas diferencias en la composición, además de las existentes entre leches obtenidas de ganado de razas diferentes, repercuten en las propiedades del queso.
- *Las formas de preparación.* Presentan una gran diversidad, cuyos límites son difíciles de fijar y tienen influencia sobre la estructura del queso, la cual depende de la forma de coagulación, del desarrollo de la acidez dada por la fermentación primaria ocasionada por los microorganismos iniciadores, de la cantidad de agua retenida, del contenido de materia grasa, del grado de proteólisis, y de algunas fermentaciones secundarias: proteólisis y lipólisis (Alais, 1976).

¹ Juárez, Ma. Teresa, Quesos mexicanos toda una tradición, 2006, Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/reportajes/quesos/quesos.htm> Acceso en: 08/01/07

Clasificación de los quesos mexicanos

Los diversos criterios de clasificación, con base en distintos rasgos de calidad, hacen complicada una clasificación universalmente aceptada de los quesos. Se puede considerar su textura, la vida de anaquel, el contenido de humedad, el tipo de agentes maduradores (bacterias y/o mohos), la concentración de calcio en la pasta, etcétera (Villegas de Gante, 2004).

Una propuesta de clasificación de varios tipos de quesos mexicanos genuinos (naturales), y su secuencia general de fabricación se encuentra en la Figura 1. (Villegas 2004)



En el estudio realizado por Cervantes Escoto y Villegas de Gante en el que se estudian los quesos genuinos mexicanos, éstos se clasificaron de acuerdo al área de producción, formato, peso y tipo de pasta, según aparece en el Cuadro 1. (Cervantes y col. 2006)

Cuadro 1 Algunas características básicas de los quesos genuinos mexicanos

NOMBRE DEL QUESO	ÁREA DE PRODUCCIÓN	FORMATO Y PESO	TIPO DE PASTA
OAXACA (QUESO DE BOLA, QUESILLO, QUESO DE HEBRA)	Prácticamente en todo el país	Desde 25g aprox. (Chiapas) forma de "Bola" o madeja; hasta más de 1kg;	Hilada
CHIHUAHUA	Originalmente en Chihuahua, Durango, Coahuila, Zacatecas. Actualmente en diversos estados del país.	Cilíndrico-plano y prisma rectangular; desde 5kg aprox. hasta cerca de 10 kg.	Prensada no cocida o ligeramente cocida
MANCHEGO MEXICANO	Varios estados del país	Cilíndrico-plano, y prisma rectangular; desde 1kg hasta 5kg aprox.	Prensada, no cocida, a veces ligeramente lavada
PANELA	Varios estados del país, principalmente la zona templada	Troncocónico-plano, diferente peso, v.g. 0.5 – 5 kg aprox.	Fresca y blanda
ASADERO	Algunos estados del norte (v.g. Chihuahua, Durango) y centro	Discooidal-delgado en el norte del país, y prismático-rectangular, más frecuentemente	Hilada
COTIJA (REGIÓN DE ORIGEN)	Sierra de Jalmich (Jalisco y Michoacán)	Gran formato, cilíndrico; 20 kg aprox.	Semidura, dura, prensada, madurada (mayor a 3 meses)
MOLIDO (DE ARO, RANCHERO)	Varios estados del país	Pequeño cilíndrico-plano; 250 kg - más de 1kg	Blanda, no prensada, fresca
SIERRA	El Bajío y varios estados del centro del país	Cilíndrico; más de 2 kg	Semidura, prensada
ADOBERA	Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Querétaro, Hidalgo	Prismático-rectangular; 500g – 1 kg	Prensada, molida, cheddarizada
CREMA TROPICAL	Chiapas y Tabasco	Pequeño, cilíndrico-plano y prismático-rectangular; 250kg – 1 kg	Blanda, prensada, altamente demineralizada y descalcificada
QUESO DE SAL	Chiapas (particularmente la costa)	Pequeño-cilíndrico y prismático-rectangular; 250kg – más de 1 kg	Blanda, no prensada o ligeramente prensada

CONTINUACIÓN CUADRO 1

Algunas características básicas de los quesos ...

NOMBRE DEL QUESO	ÁREA DE PRODUCCIÓN	FORMATO Y PESO	TIPO DE PASTA
RANCHERO VERACRUZ	Centro de Veracruz	Cilíndrico y prismático-rectangular; de 250 g – 20 kg	Blanda, prensada
DE CINCHO	Morelos	Cilíndrico; más de 2 kg	Blanda prensada
GUAJE (DE BOLA)	Huasteca Potosina	Pequeño, en forma de “basto” o guaje; 250 g – más de 1kg	Hilada
CHAPINGO	Chapingo, Estado de México	Cilíndrico; 4 – 5 kg	Semidura, prensada
DE HOJA	Centro de Veracruz	Pequeño, cilíndrico; 250 g aprox.	Autoprensada
DE PORO	Zona de los Ríos, Tabasco	Pequeño, prismático-rectangular, plano; 250-1000 g	Blanda, prensada ligeramente
QUESO DE BOLA DE OCOSINGO	Ocosingo, Chiapas	Esférico; 500 – 1000 g	Blanda o semidura, según la edad. No prensada
DE MORRAL	Hidalgo, Puebla, Estado de México, Jalisco	Almohada; 2 - 5 kg	Semidura, prensada
DE EPAZOTE	Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Estado de México	Cilíndrico; 500 – 2 kg	Pasta firme, tajable, prensada
DE RUEDA	Tlacolulan, Veracruz y municipios aledaños	Cilíndrico muy plano, pequeño; 10.5 cm de diám; 2.4 de altura. Otros tamaños	Pasta firme, tajable, ligeramente prensada
TRENZADO	Veracruz (Huasteca), Oaxaca	En forma de Trenza con dos cordones	Firme, hilada
MOLIDO Y CREMOSO DE OAXACA	Centro de Oaxaca	Cilíndrico o prismático-rectangular, 1 – 2 kg	Blanda y semidura, ligeramente granulada, prensada ligeramente
SOPERO	Tabasco	Prismático-rectangular; 500g – 1 kg	Blanda, tajable o prensado
REQUESÓN	Mayoría de los estados de México	amorfo	Blanda, como masa de maíz
JOCOQUE (JOCOQUI)	Jalisco, Michoacán, Nayarit y otros estados del centro	Floculento	La Cuajada isoelectrica de la leche, un poco desuerada, batida y ligeramente salada

El Queso Cotija

El queso Cotija nombrado así por la ciudad de Cotija de la Paz en el estado de Michoacán, es uno de los quesos mexicanos genuinos más conocidos de México. Este queso es uno de los pocos quesos mexicanos de sabor y olor fuertes, en particular, el sabor proviene por ser perfectamente añejado y por ser un queso muy salado, ya que se acostumbra añejarlo hasta que está casi completamente seco (concentrando así el sabor salado).

La función principal de este queso dentro de la comida mexicana, es la de ser desmenuzado y servir de complemento y salazón para muchos platillos diferentes. Aunque cuando todavía está fresco, puede ser consumido como un queso de mesa cualquiera, acompañando en general pastas, platillos y aderezos de ensalada. También se le ha nombrado "el parmesano mexicano". En su forma más fresca es de textura seca similar al feta griego (aunque se elabora con leche de vaca en lugar de leche de cabra).

El queso Cotija (Figura 2.1), es un queso de pasta no cocida, dura, seca, desmoronable, salada, ácida y madurada que se elabora con leche cruda de vaca, entera o ligeramente descremada, de ganado criollo de doble propósito, es decir de razas pardo suizo-cebú, Holstein-cebú, alimentado por libre pastoreo dentro de un área delimitada. Este queso presenta una forma cilíndrica de gran formato y peso, cuando está bien madurado aparenta un color blanco-amarillento agradable y posee un sabor pronunciado, seco y fuerte.

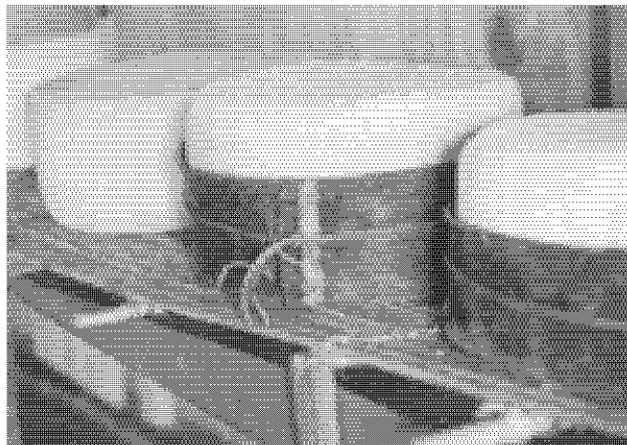


Figura 2.1 Queso Cotija

Las comunidades productoras (Figura 2.2) del ancestral queso (desde hace 400 años que se elabora) se localizan en las inmediaciones de los estados de Jalisco y Michoacán (Sierra de JalMich), en jurisdicción de los municipios de Santa María del Oro, Jalisco, sur de Tocumbo 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 (Álvarez y col. 2005).

El periodo de elaboración del queso Cotija se restringe a los meses de junio a noviembre (época de lluvias) puesto que hay un aumento de vegetación y por lo mismo una mayor producción, aunque durante todo el año ocurre el proceso de maduración.

Se estima que actualmente alrededor de 4000 personas se dedican a la producción, y que se elaboran alrededor de 400 toneladas/año del lácteo. Las piezas se venden de 80 a 150 pesos por kilo. (El Sol de Morelia, 2007)

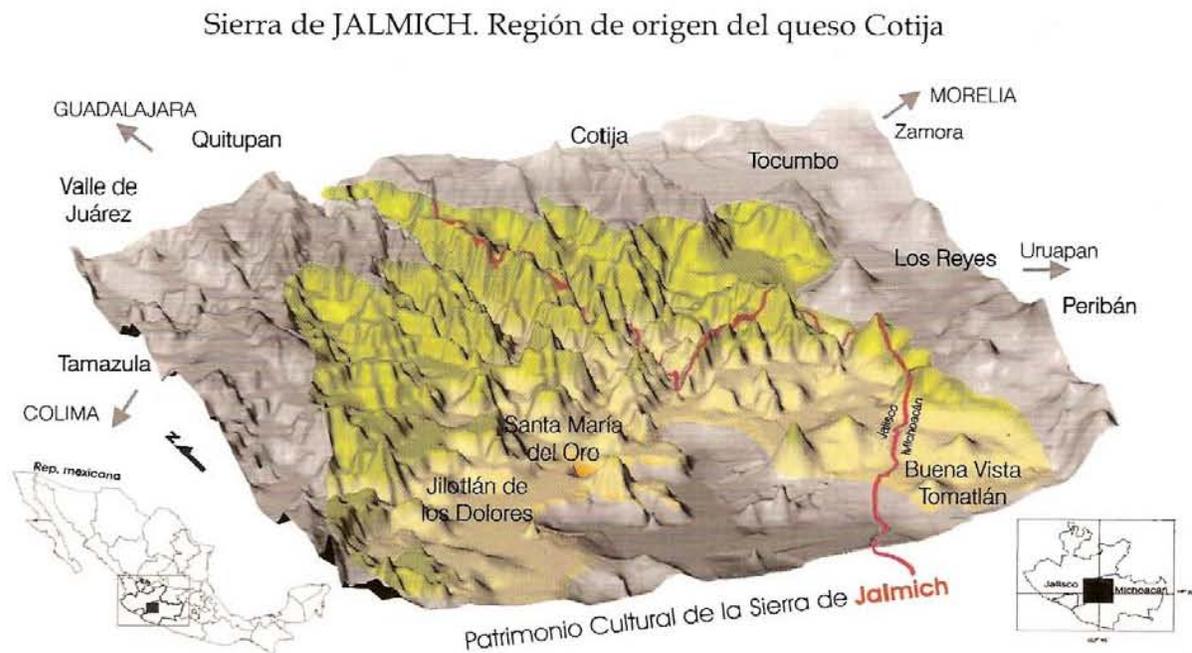


Figura 2.2 Localización de las comunidades productoras

El queso Cotija es elaborado mediante diversas prácticas de manufactura, según el estado, la región o el propio quesero. Los factores geográficos físicos determinantes de la zona productora incluyen la topografía y el clima, traducidos en ciertos parámetros de temperatura ambiental y precipitación pluvial anual, lo que permite un rango de humedad relativa específica que se relaciona con las características del queso elaborado y añejado en dicha región. Los lugares en donde se produce este derivado lácteo se caracterizan por situarse en laderas templadas, de transición climática muy plegada y con escalonamientos altitudinales, que van desde los pies del monte que se eleva a partir del valle de Tierra Caliente. Se ubica entre los 700 y 1700 msnm aprox.; se registra una precipitación media anual entre 900 mm al sur y 1200 mm en los otros puntos cardinales. La Temperatura media anual va de los 25°C al sur, a los 20°C en los otros tres puntos cardinales. (Álvarez y col. 2005)

El 7 de marzo de 2005 los miembros de La Asociación Regional de Productores de Queso Cotija obtuvieron del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) la Marca Colectiva del queso Cotija Región de Origen. La Marca Colectiva representa una protección oficial y con ella una ventaja competitiva del producto en el mercado, dando garantía de autenticidad y calidad a los consumidores y un sobreprecio a los fabricantes justificado por las especificidades geográficas y culturales incorporadas en el producto por las condiciones precarias en que se elabora, por el apego a determinadas normas de calidad y por la preservación del medio ambiente. (Álvarez y col. 2005)

Actualmente se están impulsando proyectos de investigación, desarrollo y mejoramiento tecnológico, a fin de obtener la Denominación de Origen para el tradicional queso Cotija, con el objetivo de alcanzar mayores mercados en el país y el extranjero; lo que implicaría que sus características sensoriales son únicas y resultado de las condiciones ambientales locales relacionadas con su producción. Con la certificación los exportadores mexicanos se beneficiarían al enviar sus productos al extranjero, ya que obtendrían ventajas arancelarias si las mercancías se acompañan del llamado certificado de Denominación de Origen; y el producto sería considerado únicamente de México, ya que dicho documento es otorgado a los productos que cumplen con requisitos de transformación o elaboración de las normas de origen.

El Gobierno del estado de Michoacán firmó un convenio con Comercio Justo para abrir el mercado en la comunidad europea y en otras partes del mundo, cosa que beneficiará de manera directa a los más de 4 mil productores que se dedican a la elaboración de este queso. (El Sol de Morelia, 2007)

Es importante mencionar que el queso Cotija, fue reconocido ente 500 participantes como el mejor Queso Extranjero del Año 2006, en Cremona, Italia; durante el campeonato mundial, dedicado a este derivado de la leche. Cabe resaltar, que al evento asistieron alrededor de 300 mil personas. Eloy Vargas Arreola, Secretario de Desarrollo Económico del estado de Michoacán, dijo que en aquel concurso, se evaluó la calidad de quesos de todo el mundo, y destacaron aquéllos provenientes de países reconocidos internacionalmente por su tradicional producción de este alimento, como fue el caso de: Francia, Austria, España e Italia. (La Jornada 2006)

Importancia de la Microbiota del queso

Los microorganismos son un componente esencial de todas las variedades naturales de quesos y juegan un papel importante durante la fabricación y maduración del mismo. Durante este proceso ocurren interacciones complejas entre los componentes individuales de la microbiota del queso, las cuales se ven afectadas también por los factores ambientales. (Beresford y col. 2001).

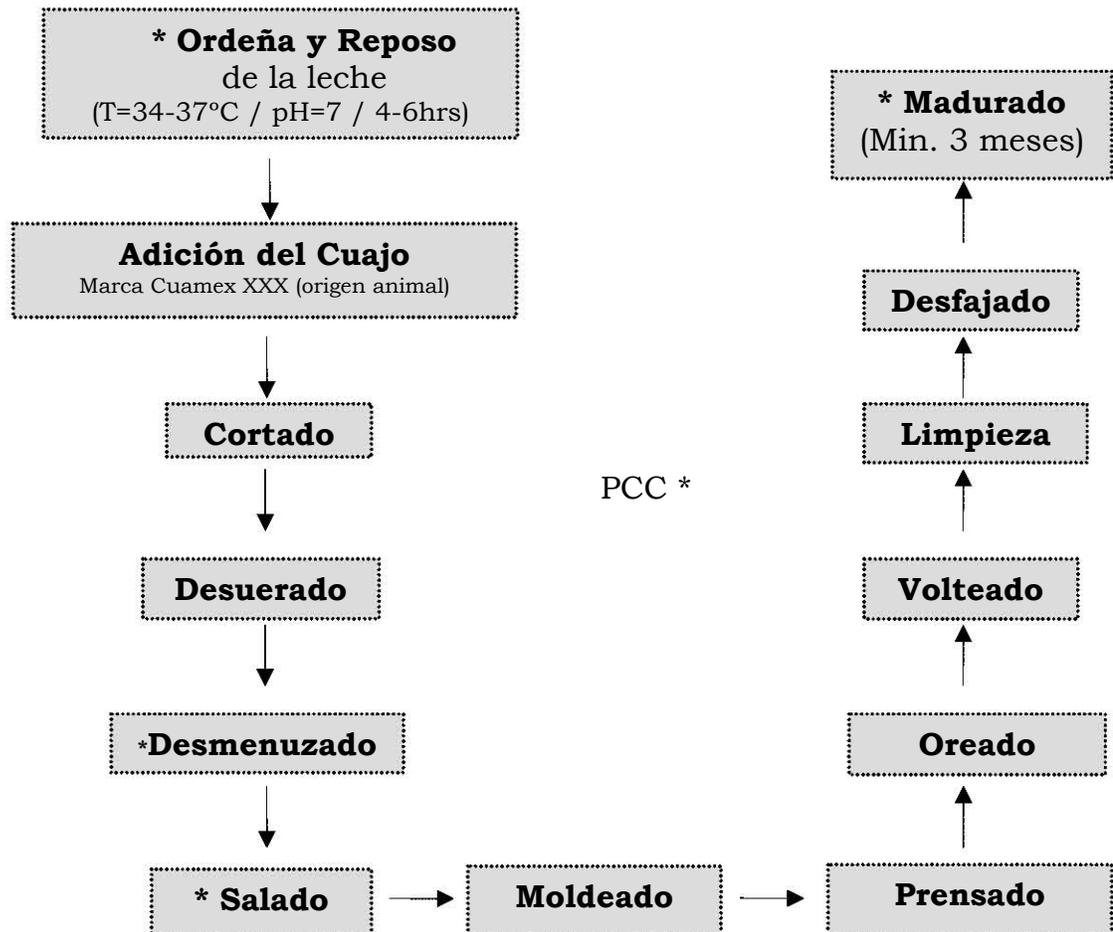
Durante la maduración del queso, el cultivo iniciador -si es utilizado-, junto con la microbiota secundaria promueven una serie compleja de reacciones bioquímicas que son vitales para el desarrollo apropiado del sabor y textura del producto.

Puesto que el queso Cotija es elaborado con leche cruda y no hay inoculación de cultivo iniciador, ni ningún tratamiento térmico durante el proceso de su elaboración, la microbiota presente en éste será la de la leche y aquellos microorganismos del ambiente que pudieran llegar a él, por lo que éstos serán los responsables de las características sensoriales de dicho producto.

III. ANTECEDENTES

Elaboración del queso Cotija

En la actualidad no existe un Cotija estandarizado que sea referencia o prototipo de los quesos de su especie elaborados en el país. Inclusive, ni siquiera se halla una norma técnica oficial que se aplique en el ámbito nacional. El diagrama de bloques que aquí se presenta, se elaboró con base en la literatura y en la observación, recabadas conforme a la experiencia del grupo de trabajo del laboratorio 312 de la Facultad de Química de la UNAM; en dicho diagrama destacan las operaciones unitarias del proceso de manufactura del queso Cotija.



*PCC = Puntos Críticos de Control

Figura 3.1 Proceso general de elaboración del Queso Cotija

A continuación se explican los pasos más sobresalientes en el diagrama de bloques del proceso de manufactura del Queso Cotija (Figura 3.1) (Álvarez y col. 2005) y (Santos y Villegas 1997)

La recepción de la leche bronca (cruda), se realiza comúnmente entre 4 y 6 horas después de la ordeña; por ello, es común que la leche ya presente cierto grado de acidez natural incipiente. La calidad bromatológica de la leche debe mantener un mínimo de 3.7% de grasa y 3% de proteína. Podrá ser desgrasada manualmente según la costumbre, mas no deberá llevarse a cabo esta técnica mecánicamente.

Antes de utilizar la leche para elaborar el queso, ésta se pasa por cedazos limpios (trapos esterilizados) para retener cualquier materia extraña y se deja reposar en un recipiente de acero inoxidable previamente aseado, aunque algunos productores utilizan contenedores de plástico. Para la fijación de la temperatura de coagulación, en la mayoría de las queserías cotijeras, no se calienta la leche, pues al momento de su llegada, posee una temperatura cercana a los 35°C.

El cuajado se efectúa empleando cuajo natural (sustancia contenida en la última de las cuatro cavidades del estómago de los rumiantes, que sirve para cuajar la leche) extraído de dichos animales jóvenes, o en su defecto, se puede utilizar cuajo comercial de origen animal (no microbiano, en ocasiones de la marca Cuamex XXX). Está establecido que se adiciona 10 mL del cuajo por cada 100 mL de leche; pero su dosificación no es precisa debido a que se aplica con “tapaderitas” o de acuerdo a la costumbre del productor. Como consecuencia de las cantidades de cuajo no controladas, se utilizan tiempos y puntos de coagulación variables. La operación de cuajado se efectúa usualmente en tinas metálicas de una sola pared (las cuales no pueden ser calentadas por vapor). En la actualidad, no es raro encontrar queserías en las que esta técnica la llevan a cabo en tambos de plástico u otros recipientes.

Después de incorporar el cuajo, con la ayuda de una pala de madera se reparte uniformemente en todo el cuerpo de la leche, pudiendo acompañarse de una parte de la sal total añadida, según la costumbre. La consistencia de la cuajada se prueba cruzándola con una cuchara antes de proceder al cortado.

El cortado, por lo general se realiza con palas de madera o cuchillos. Se ha visto que en ciertos casos, esta operación es muy eficiente puesto que se obtiene un suero color verde-amarillento translúcido; lo cual indica que habrá un mayor rendimiento en la producción, en otros casos, cuando hay un cortado tosco, repercute en pérdidas de material caseínico en forma de “finos”, situación que trasciende hasta el rendimiento y la calidad final del producto.

El desuerado se practica retirando el suero sobrante de la cuajada previamente asentada, por medio de sifoneo, drenado, por cedazos, pasando la cuajada manualmente a otra mesa, por colador interpuesto y por retiro del suero con baldes; a veces se descrema.

En ocasiones hay un “manteado”, el cual se realiza utilizando una bolsa de algodón o de plástico, tiene por objetivo desuerar la cuajada por expresión y autocompresión; esta operación se efectúa entre 10 y 20 min. Una vez separada la cuajada del suero, se deja escurrir en un recipiente que podrá ser de madera apropiado o de acero inoxidable.

El desmenuzado y salado, son operaciones simultáneas que por lo general se hacen en artesas (recipientes), bateas (bandejas o vasijas para lavar) y mesas de madera o de acero inoxidable de forma manual. El salado, en especial es una operación vital para el producto, la sal deberá ser de mar (de grano), obtenida mediante proceso artesanal para que tenga la consistencia necesaria para su incorporación. Los quesos tropicales normalmente son salados (contienen regularmente entre 4 y 5% de sal, en base húmeda), sin embargo, la dosificación de la sal no se realiza de manera precisa.

El moldeado conlleva a que la masa salada –queso fresco- se moldee o se deje reposar sobre la artesa, para que al día siguiente se incorpore una cantidad equivalente del primer amasado y así tener la cantidad suficiente para llenar el aro (cincho, cinturón o fajo del diámetro específico) cubierto en su interior con dos bandas de ixtle (fibra de maguey) con las que se envuelve la masa, las que confieren en conjunto la forma y el volumen de pasta, que a su vez, habrá de dar lugar a las piezas con la presentación tradicional cilíndrica de alrededor de 20 kg.

El prensado tiene por objeto eliminar el suero intersticial de la masa del queso; se realiza generalmente empleando lajas o lozas prismático-rectangulares de concreto reforzado, de entre 50 y 90kg aprox. durante 18-24 horas. La pieza de queso se voltea sobre su propia cara al concluir el período. Algunas queserías cuentan con prensas de tornillo. A partir de esta etapa se considera que inicia la vida de cada pieza.

Durante el oreado, la pasta ya prensada se mantiene fajada para que no pierda el formato cilíndrico tradicional del queso Cotija Región de Origen; se voltea sobre su cara diariamente hasta que deja de escurrir suero (“hasta que se orea”) durante 15 días a temperatura ambiente (entre 20 y 40 °C) o hasta que adquiriera la firmeza necesaria para que cada pieza pueda ser manipulada.

El desfajado del queso (al quitarle el aro) se lleva a cabo cuando la consistencia es adecuada, pero se continúa volteándolo, alternando la cara expuesta al medio diariamente durante los tres primeros meses de su vida.

La maduración empieza, en realidad, desde el momento del oreo, a temperatura ambiente, en pocos casos, en la cámara de refrigeración, ya que la mayoría de los productores de queso Cotija auténtico, no cuentan con cámaras de refrigeración, por lo tanto, mantienen el producto en el lugar más fresco disponible. La superficie del queso se limpia “soba” durante los tres primeros meses de su elaboración, con un trapo limpio, suave pero que no desprenda hilos o materia extraña que pueda poner en riesgo la calidad del producto. El queso se limpia y se voltea cada tercer o cuarto día durante este período. (Álvarez y col. 2005) y (Santos y Villegas 1997)

El queso Cotija, genuino, debe ser un producto madurado largamente, durante varios meses, al menos 100 días, según el artículo 360 del Código Sanitario. (Santos y Villegas 1997)

Los queseros locales han observado que el queso madurado con un mínimo de 3 meses se encuentra en condiciones adecuadas para su consumo.

Características del queso Cotija Región de Origen (Álvarez y col. 2005)

El queso deberá producirse de manera natural, es decir, a partir de leche entera, sin la adición de compuestos químicos (pesticidas, fertilizantes, detergentes, etc.) o análogos de leche u otros ingredientes que no sean sal y cuajo; solamente podrán ser añadidos cultivos microbianos que refuercen la inocuidad del producto. El queso deberá estar libre de cualquier microorganismo patógeno.

Tabla 3.1 Composición básica del queso Cotija Región de Origen

Humedad máxima	36 %
Grasa mínima	23 %
Proteína mínima	25 %

El queso Cotija deberá tener un mínimo de tres meses de maduración dentro del área geográfica que protege esta marca, considerando el inicio de su vida a partir del retiro de la prensa, para garantizar su inocuidad y calidad antes de enviar el producto al mercado.

Mantendrá su presentación tradicional cilíndrica, de gran formato, cuyas dimensiones en promedio son 40cm de diámetro y 18cm de altura, con peso alrededor de 20 Kg, correspondientes al tamaño y peso más comunes.

Los tipos de queso Cotija Región de Origen (Álvarez y col. 2005)

El queso Cotija Región de Origen podrá subclasificarse comercialmente:

- Por su tiempo de añejamiento:
 - a) Añejo, cuando un queso tenga de tres a seis meses de vida.
 - b) Rendido, cuando el queso tenga más de seis meses de vida.

- Por su consistencia y características al corte:
 - a) de Tajo, aquel que al corte no se desmorona, las paredes del corte se mantienen en su posición, debido a su menor contenido de sal y mayor contenido de grasa sobre el total de la materia seca;
 - b) de Grano, se desmorona al corte, por su mayor contenido de sal y mayor contenido de grasa sobre el total de la materia seca;
 - c) de Medio Tajo o de Medio Grano, condición intermedia entre Tajo y Grano.

- Por el nombre de su rancho, el de su familia, o cualquier otro signo distintivo.

El queso protegido por las Reglas de uso, Marca Colectiva Queso Cotija región de Origen (MR) deberá acompañarse siempre de la etiqueta distintiva que especifica su composición, mes y año de producción (para deducir la edad), cumplir con lo que establece la norma nacional para etiquetado. Además podrá indicar en su superficie, mediante una palabra, signo, marca o fierro de herrar del productor, su procedencia específica.

Generalidades de los microorganismos presentes en quesos

Los microorganismos de las variedades naturales de queso pueden ser divididos en dos grupos principales: los iniciadores y la microbiota secundaria.

La microbiota del iniciador; *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* son algunos de los utilizados individualmente o en varias combinaciones, dependiendo de la variedad del queso, son responsables de la acidez desarrollada durante la producción del queso (Beresford 2001).

Los iniciadores pueden ser mezclas de cepas definidas o, como en el caso de muchos quesos fabricados por métodos tradicionales, integradas por mezclas indefinidas de cepas que se agregan al principio de la fabricación o están naturalmente presentes en la leche.

La microbiota secundaria se compone de mezclas complejas de bacterias ácido lácticas (BAL) no iniciadoras, levaduras y hongos; generalmente se asocian específicamente a variedades particulares de quesos. En muchas variedades de éstos, la acción de la microbiota secundaria contribuye significativamente a las características específicas de esa variedad en particular. La microbiota secundaria se puede agregar como cultivos definidos, pero en muchas situaciones se compone de los microorganismos que llegan al queso, ya sea de los ingredientes o del ambiente. (Beresford 2001)

La presencia de cultivos iniciadores no es suficiente para explicar la formación de sabores presentes en quesos fabricados a base de leche cruda, sin embargo la microbiota nativa juega un papel muy importante. De hecho los lactobacilos facultativos heterofermentativos son regularmente encontrados a bajas concentraciones en leche, pero se han hallado concentraciones alrededor de 10^8 UFC/g en quesos tipo Suizo. (Marilley 2003)

El proceso proteolítico en el queso

De los tres principales eventos bioquímicos (glucólisis, lipólisis y proteólisis) que ocurren durante la maduración de los quesos, la proteólisis es la más compleja y a vista de muchos investigadores, la más importante. Es el factor principal responsable de los cambios de textura -en propiedades de fuerza, elasticidad, cohesividad, fracturabilidad, adhesividad, emulsificación, etc.- y da la mayor contribución al sabor y aroma del queso. Desafortunadamente, algunos péptidos pequeños son amargos, y si están presentes en concentraciones significativas, contribuirán a un sabor amargo, un defecto común en quesos. (Fox y col. 2000)

La principal proteinasa presente en la leche es la plasmina, la cuál contribuye a la proteólisis en todas las variedades de quesos que se han estudiado, debido a la formación de γ -caseínas. Está asociada con las micelas de caseína en leche y es incorporada a la cuajada. Su actividad en quesos es estimulada por niveles bajos de sal (NaCl), hasta un máx. de 2%, pero es inhibida por concentraciones mayores, aunque algo de actividad permanece a 8% NaCl. (Fox y col. 2000)

En la Figura 3.2 se ilustra el proceso proteolítico que se lleva a cabo durante la maduración del queso, en el que las caseínas son atacadas por proteinasas para dar lugar a péptidos, que a su vez, son sustrato de proteinasas y peptidasas dando como productos a los péptidos y aminoácidos que por medio de reacciones químicas darán lugar a los compuestos que contribuyen en las características sensoriales del queso madurado.

La proteólisis contribuye directamente al sabor del queso al liberar péptidos y aminoácidos. Los aminoácidos son sustratos para reacciones de transaminación, deshidrogenación, descarboxilación y reducción, produciendo una gran variedad de compuestos de sabor como ácido fenilacético, feniletanol, p-cresol, metil tiol, dimetil disulfuro, 2 y 3-metil butirato, 2 y 3-metil butanal, 3-metil butanol, 3-metil butanona, 2-metil propionato y 2-metil-1-propanal. (Marilley 2003)

Especies proteolíticas son comunes entre los géneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Proteus*, también hay levaduras y hongos proteolíticos. Los microorganismos que llevan a cabo la hidrólisis de proteínas y la fermentación ácida son llamados ácido-proteolíticos, ejemplos de éstos son: *Enterococcus faecalis* y *Micrococcus caseolyticus*. (Pouch Downes 2001)

Proceso proteolítico durante la maduración del queso

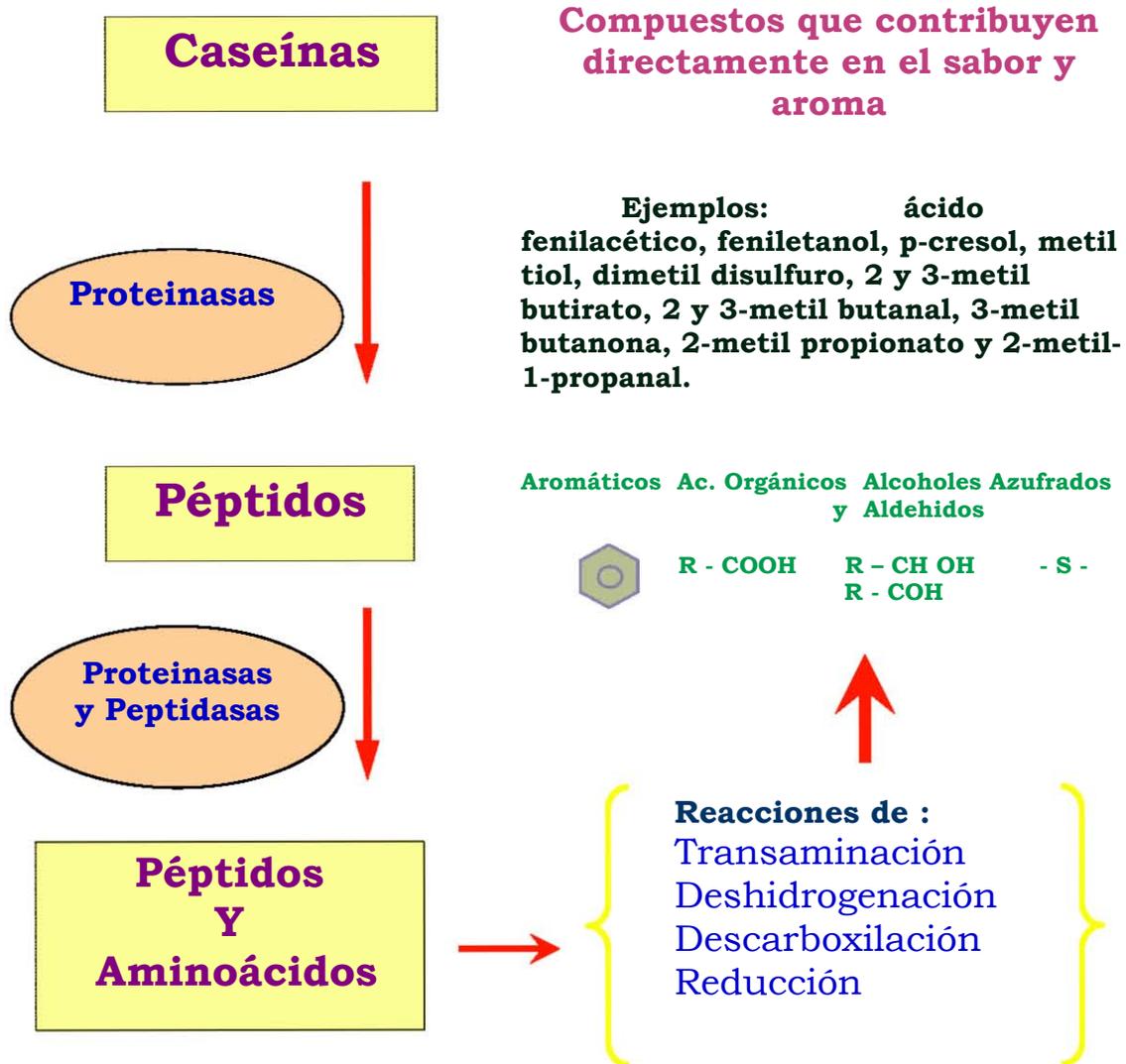


Figura 3.2 Proceso proteolítico que se lleva a cabo durante la maduración del queso

Factores que afectan el crecimiento microbiano en quesos

Humedad

Todos los microorganismos requieren agua para su crecimiento y uno de los métodos más efectivos para controlarlo es reduciendo el agua disponible, ya sea por deshidratación o por adición de solutos solubles en agua como la sal. Un incremento en el contenido de humedad aumenta la susceptibilidad del producto a contaminarse (Beresford 2001).

Actividad acuosa

La actividad acuosa (a_w) es directamente proporcional al contenido de humedad del queso e inversamente proporcional a la concentración de sal (NaCl) y otros compuestos de bajo peso molecular (Esteban & Marcos, 1989). La actividad acuosa (a_w) es un concepto termodinámico definido como la relación entre la presión de vapor del agua presente en un sistema (p) y la del agua pura (p_0) a la misma temperatura:

$$a_w = p / p_0 \quad 0 \leq a_w \leq 1$$

(Beresford 2001)

El a_w nos da una idea de la disponibilidad del agua en el alimento para promover el crecimiento microbiano, las reacciones enzimáticas, el deterioro químico, etc. Por lo que en los quesos con mayor humedad es mayor la cantidad de agua disponible para que ocurran en él las reacciones enzimáticas y químicas generadas por los microorganismos presentes.

Otros compuestos aparte de la sal (NaCl) incluyendo el ácido láctico y otros ácidos, aminoácidos, péptidos muy pequeños y fosfato de calcio (de la leche), contribuyen a la disminución del a_w , especialmente en quesos extra madurados. (Fox y col. 2000)

Durante las primeras etapas de la fabricación de los quesos el a_w es aprox. 0.99, lo que promueve el crecimiento y a actividad de los microorganismos; sin embargo durante el salado y el madurado el a_w disminuye a valores hasta de 0.8, valores menores a los que soportan la mayoría de las bacterias. Es por eso que el a_w contribuye al control de la actividad metabólica y multiplicación microbiana. (Beresford 2001)

La disminución del a_w durante la maduración de los quesos ocurre debido a la pérdida de agua por evaporación, salado y la hidrólisis de proteínas que pasan a péptidos y aminoácidos; y de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos, ya que la hidrólisis de cada péptido o enlace éster requiere de una molécula de agua. La actividad enzimática también se ve afectada fuertemente por la actividad acuosa. (Beresford 2001)

La actividad acuosa además de estar relacionada directamente con el contenido de humedad, también está relacionada de manera inversa con el contenido de sal, es por eso que diversos autores proponen calcular el valor de a_w mediante ecuaciones empíricas en donde influyen factores de composición (contenido de agua, NaCl, cenizas, nitrógeno no proteico, etc.). La expresión que relaciona el contenido de NaCl y el agua presente en el queso es: (Saurel 2004)

$$a_w = 0.997 - 0.604 * X_{\text{NaCl}} \quad R^2 = 0.980$$

Donde

$$X_{\text{NaCl}} = \text{kg NaCl} / \text{kg agua}$$

Salado

La sal (NaCl) incrementa la presión osmótica de la fase acuosa de los alimentos, causando deshidratación de las células bacterianas y matándolas, o al menos disminuyendo su crecimiento. Reportes indican que la actividad acuosa de la mayoría de los quesos no es lo suficientemente baja para prevenir el crecimiento de hongos y levaduras, pero junto con la disminución del pH es suficientemente efectivo para controlar el crecimiento bacteriano. La distribución y concentración de sal en los quesos:

- a) inhibe o retarda el crecimiento microbiano, incluyendo a los microorganismos patógenos, por lo que aumenta la inocuidad del queso;
- b) inhibe la actividad enzimática;
- c) afecta la sinéresis de la cuajada al expulsar el suero y reducir la humedad;
- d) causa cambios en las proteínas del queso lo que afecta a la textura, solubilidad proteica y probablemente también en su conformación;
- e) ocasiona cambios en el sabor directamente e indirectamente vía su influencia en los microorganismos y las enzimas. (Fox y col. 2000)

La sal tiene una contribución positiva al sabor del queso ya que la mayoría de los consumidores aprecian un sabor salado en los alimentos, aunque en altos niveles provoca efectos nutricionales indeseables.

Potencial de Hidrógeno (pH) y Ácidos orgánicos

El valor de pH óptimo para el crecimiento de la mayoría de las bacterias está alrededor del neutro y el crecimiento es pobre la mayoría de las veces a valores de pH <5. Debido a la acumulación de ácidos orgánicos, la cuajada después de su obtención tiene un pH entre 4.5 - 5.3, estos valores tan bajos no permiten la sobrevivencia de las especies ácido sensitivas. El verdadero efecto inhibidor del crecimiento microbiano es la forma no disociada del ácido orgánico. Los principales ácidos orgánicos encontrados en quesos son: láctico, acético y propiónico que tienen valores de pK_a 's de 3.08, 4.75 y 4.87, respectivamente. El ácido láctico es el que se encuentra presente en mayor concentración en la cuajada, aunque el ácido propiónico es el que causa la mayor parte del efecto inhibidor. (Beresford 2001)

Temperatura de maduración

Los microorganismos relacionados con la manufactura de los quesos son tanto mesofílicos como termofílicos, teniendo una temperatura óptima de $\sim 30^\circ\text{C}$ ó 42°C , respectivamente. En la selección de la temperatura a la cual el queso es madurado existe un compromiso entre la necesidad de promover las reacciones de maduración y controlar el crecimiento de la microbiota secundaria deseable, así como la necesidad de prevenir la propagación de los microorganismos patógenos y de descomposición. (Beresford 2001)

Potencial Redox

El potencial de oxido-reducción o redox (E_h) es una medida de la habilidad de un sistema químico/biológico para oxidar (perder electrones) o reducir (ganar electrones). Un estado oxidado o reducido es indicado por un valor en mV positivo o negativo, respectivamente. El E_h de la leche es $\sim +150$ mV, mientras que el del queso es ~ -250 mV. El mecanismo exacto de reducción que sufre el queso no ha sido completamente establecido, pero probablemente se relacione a la fermentación del ácido láctico y la reducción de pequeñas cantidades de oxígeno a

agua (en la leche). Como consecuencia de estas reacciones, el interior del queso es un sistema esencialmente anaeróbico, que sólo soportaran aquellos microorganismos anaerobios obligados o facultativos. (Beresford 2001)

El E_h del queso es uno de los factores determinantes en los tipos de microorganismos presentes, por lo tanto, aerobios obligados como *Pseudomonas*, *Brevivacterium*, *Micrococcus* spp y algunas especies de *Bacillus* (puesto que la mayoría son facultativas) no podrán crecer en el interior del queso. Las bacterias que se desarrollan en la superficie del queso son predominantemente aerobias obligadas. (Beresford 2001)

Microorganismos presentes en la leche

Los microorganismos presentes en la leche cruda de vaca son aquellos que se encuentran presentes en las ubres, utensilios y líneas; bajo apropiadas condiciones de manejo y almacenamiento, la microbiota predominante está formada por Gram positivos. La leche cruda mantenida a temperaturas de refrigeración por varios días presenta bacterias de los siguientes géneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, así como miembros de al menos uno del grupo coliforme. En condiciones de altas temperaturas se han encontrado cepas termodúricas, principalmente estreptococos, lactobacilos y esporulados del género *Bacillus* y *Clostridium*. (Jay 2000)

Se ha visto que la leche cruda representa un medio muy conveniente para el crecimiento de bacterias y es por eso que su calidad dependerá de la microbiota presente. Bacterias del género *Bacillus* sp. y sus esporas, comúnmente presentes en quesos juegan un papel muy importante en los productos lácteos. (Scheldemann y col. 2005)

IV. JUSTIFICACIÓN

El sabor (gusto y aroma) en los quesos es resultado de la actividad metabólica de los microorganismos en los mismos, principalmente por glicólisis, lipólisis y proteólisis. En la proteólisis (vista por investigadores como la más compleja) se degradan las proteínas a péptidos y aminoácidos, los cuales por reacciones químicas producen los compuestos que contribuyen directamente en el sabor y textura característicos generados en los quesos.

Puesto que aún no se han estudiado a los microorganismos proeolíticos presentes en el queso Cotija y dada la importancia del metabolismo de las proteínas en el mismo, la identificación de los microorganismos capaces de degradar las proteínas presentes en el producto, será un acercamiento al estudio del ecosistema que representa el queso.

V. HIPÓTESIS

Debido a que el queso Cotija tiene características organolépticas muy peculiares, y dado que algunos compuestos de sabor y olor son originados por proteólisis, se podrán encontrar microorganismos con actividad proteolítica elevada, responsable de la generación de dichos compuestos.

Si el queso Cotija se produce todavía de manera artesanal y sin estandarización, entonces se esperará que presente variabilidad en cuanto a su composición química y microbiana.

VI. OBJETIVOS

Objetivo General:

Analizar microbiológica y fisicoquímicamente varias muestras de queso Cotija, y aislar e identificar cepas proteolíticas que pudieran ser responsables de los procesos degradativos de las proteínas durante la maduración del producto.

Objetivos Particulares:

- Estudiar y comparar seis muestras de queso Cotija provenientes de los estados de Michoacán y Jalisco, de diferente productor y estado de maduración, respecto a:
 - La realización del Análisis Químico Proximal y la medición de pH, a_w y % de acidez.
 - La cuantificación de los microorganismos indicadores.
- Aislar microorganismos proteolíticos a través de la utilización de un medio sólido que evidencie tal actividad enzimática.
- Seleccionar, purificar y caracterizar morfológicamente a los microorganismos que presenten mayor actividad proteolítica.
- Identificar mediante técnicas moleculares dichas cepas.

VII. METODOLOGÍA



Figura 7.1

Diagrama general de la metodología

MUESTRAS DE QUESO COTIJA

Tabla 7.1 Muestras de Queso Cotija provenientes de Tocumbo, Michoacán (M) y Quitupan, Jalisco(J)

#	Clave	Estado de maduración	Tiempo de maduración (meses)
1 _J	F	Oreado	≤3
2 _J	IO	Añejo	3 - 6
3 _M	TO	Añejo	3 - 6
4 _J	Q	Rendido	≥ 6
5 _M	P	Rendido	≥ 6
6 _M	TM	Rendido	≥ 6

Origen de las muestras de Queso Cotija

Las muestras al momento de su estudio llevaban ya un período aproximado de 3-6 meses en ultracongelación posterior a su compra en los establecimientos. Para que se llevara una descongelación lenta y así no afectar la estructura fisicoquímica y microbiológica del mismo se colocaron las piezas de queso Cotija en el congelador del refrigerador durante 2 días y luego en el refrigerador durante su estudio.

Preparación de las muestras para el análisis fisicoquímico y AQP:

En la campana de flujo laminar y mediante un espátula estéril se cortaron pedazos de las piezas de queso Cotija tomándolos de forma aleatoria y se colocaron en bolsas de plástico con sello marca "Ziploc" etiquetadas previamente con los datos de cada muestra, de tal forma que pesaran aproximadamente 90g cada uno. Posteriormente se desmoronaron y homogeneizaron cada una de las muestras separadas para este estudio. Durante el análisis se mantuvieron en refrigeración a una temperatura aproximada de 4°C.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL

a_w

Se llevó a cabo en el medidor para a_w "Rotronic" Instrument corp., Aw quick. Censor a_w VCrotronic. Previo a la medición de las muestras se calibró el aparato con soluciones de a_w conocido:

NaCl	a_w	teórico: 0.76	experimental: 0.755
K ₂ SO ₄	a_w	teórico: 0.97	experimental: 0.942

Procedimiento: Se colocaron alrededor de 5g de muestra de queso Cotija dentro de una cápsula de plástico provista de un censor para a_w y la lectura se realizó directamente en dicho aparato. La medición se realizó por triplicado.

Determinación de pH y Acidez en base al ácido láctico

Se realizó una primera determinación de acuerdo:

- a la Norma Mexicana NMX-F-206-1986 alimentos - lácteos - determinación de acidez expresada como ácido láctico en leche en polvo; y
- a la Norma Mexicana NMX-F-099-1970 método de prueba para la determinación de pH en quesos procesados.

Sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados puesto que no era posible llegar a un punto de viraje debido a que los pequeños grumos de queso remanentes en la solución interferían en la coloración y la grasa del queso interfería en la lectura del potenciómetro. Así que se hizo un diseño experimental que permitiera establecer la metodología adecuada para la determinación de acidez y pH. Para la determinación de esta última, se realizaron modificaciones a la técnica descrita por el AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para adecuarla al queso Cotija. Los resultados obtenidos del diseño experimental permitieron establecer la metodología adecuada para la determinación de Acidez y pH.

Diseño Experimental para la determinación de acidez mediante titulación ácido-base (en base al ácido láctico)

Se probaron distintas condiciones de:

- Agua destilada (ajustada o no a pH 7) y a diferentes temperaturas ($T_{amb.}$ y a 40 ± 2 °C).
- Agitación a diferentes tiempos (15, 30 y 60 min.), temperaturas ($T_{amb.}$ y a 40 ± 5 °C) y revoluciones por min. (175 y 250 rpm).
- Utilizando en vez de agitación el Homogenizador (marca IKA, ULTRATURRA).
- Cantidad de gasa para filtrar la solución.

Los reactivos que se usaron fueron grado analítico y se utilizó agua destilada.

- Solución de hidróxido de sodio (NaOH 0.1 N marca HYCEL).
- Indicador de fenoftaleína en solución alcohólica al 1%.

Equipo utilizado.- Potenciómetro Beckman modelo 34 e Incubadora lab-line Instruments inc. LAB. LINE ORBIT ENVIRON SHAKER No. Serie 3527.

Procedimiento optimizado

- 1.- Se colocaron 9g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se adicionaron 100 mL de agua destilada ajustada en el momento de la determinación a $pH 7 \pm 0.2$ a 40 ± 2 °C.
- 2.- Se agitó el matraz con el agua y la muestra a 250 rpm. Durante 15 min. a una temperatura ≤ 30 °C.
- 3.- La solución del matraz se filtró a través de una gasa de modo que no pasaran los grumos ni los glóbulos de grasa del queso.
- 4.- Al filtrado se le realizó la medición del pH potenciométricamente (calibrado previamente con soluciones Buffer pH 7, pH 4 y pH 10).
- 5.- Del filtrado se tomó una alícuota de 25 mL y se colocó en un matraz de 250 mL al cual se le adicionaron 0.5 mL del indicador fenoftaleína al 1% en solución alcohólica al 70%.
- 6.- Se tituló la alícuota (adicionada con fenoftaleína) con NaOH 0.1 N hasta un punto de vire a rosa pálido o tenue que persistió por 15 segundos.
- 7.- El % de Acidez expresada como ácido láctico se calculó con la siguiente ecuación:

$$A = \frac{V \times N \times 90}{M \times 1000} \times 100$$

Donde:

A = Acidez expresada en ácido láctico en por ciento.

V = Volumen en mililitros de hidróxido de sodio consumido.

N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

90 = Equivalente del ácido láctico.

M = Peso en gramos de la muestra de leche en polvo.

Humedad

Se efectuó a través del método de horno a vacío de acuerdo al Manual de metodologías de Análisis de Alimentos, Facultad de Química.

Procedimiento

Se pesó aproximadamente 2g de muestra en un pesafiltro con tapa (previamente pesado después de ponerlo a peso constante 2 hrs. a 130 °C aprox.) Se secó la muestra por aproximadamente 12 hrs. a 70 °C y una presión de 12KPa. Se retiró del horno, se tapó y dejó enfriar en el desecador. Se pesó la muestra seca y se tomó el valor obtenido a peso constante.

Los resultados se reportarán como % de humedad, por secado en horno a vacío a 70 ± 1 °C.

Grasa

Se realizó de acuerdo al Proyecto de Norma PROY-NMX-F-710-COFOCALEC-2004. Sistema Producto de leche - Alimento - Alimentos lácteos - Determinación de grasa en Quesos. Método de prueba.

Los reactivos que se usaron fueron grado analítico y se utilizó agua destilada.

- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) de densidad 1.530 g/mL a 288 K (15° C) que corresponde a 61.72 a 62.63 % m/m.

- Alcohol isoamílico o amílico libre de grasa y de densidad 0.88 g/mL a 288 K (15° C) que corresponde al 98% v/v.

NOTA: Tanto el ácido sulfúrico como el alcohol isoamílico se sometieron a una prueba en blanco antes de usarse: Se colocó en un butirómetro 11 mL de agua, 10 mL de ácido sulfúrico y 1 mL de

alcohol isoamílico, se centrifugó durante 3 min. y se observó después de 24 hrs. en reposo que no tuviera ningún residuo de grasa visible en la superficie.

Materiales, Aparatos y Equipo

- Pipeta volumétrica de 1.0, 10 y 11 mL.
- Butirómetros de Gerber - Van Gulik para quesos. Marca Dr. N Gerber Original. Butiromètre de fromage Van Gulik escala 0-40% con tapones de hule.
- Centrífuga para butirómetro Gerber
- Baño de agua que pueda mantener la temperatura regulable de $338\text{ K} \pm 1\text{ K}$ ($65^\circ\text{ C} \pm 1^\circ\text{ C}$)

Procedimiento

1. Se pesaron directamente en la copa del butirómetro 3 g de queso, y se colocó la copa con la muestra de queso dentro del butirómetro.
2. Por la abertura superior del butirómetro, se agregaron 10 mL de ácido sulfúrico o la cantidad suficiente de éste, de tal manera que recubriera todo el queso.
3. Se tapó la abertura y se colocó en baño de agua a 338 K (65° C) por 30 minutos manteniendo el nivel por arriba de la escala del butirómetro, se agitó cuidadosamente 2 ó 3 veces durante ese lapso, para disolver todas las partículas de queso.
4. Se agregó 1mL de alcohol isoamílico y se agitó por lo menos durante 3 seg.
5. Se terminó de llenar el butirómetro con ácido sulfúrico, hasta que el volumen llegó a aproximadamente tres cuartas partes de la columna graduada.
6. Se tapó la abertura superior del butirómetro y se mezcló por inversión antes de volver a meterlo al baño de agua por 5 minutos.
7. Se retiró el butirómetro del baño maría y se centrifugó durante 10 minutos.
8. Se volvió a meter el butirómetro al baño de agua a 65° C y se dejó ahí 5 minutos.
9. Se retiró el butirómetro del baño y se alzó verticalmente hasta que el menisco de la columna de grasa estuviera al nivel de los ojos. Se ajustó la columna de grasa presionando el tapón cuidadosamente hasta colocar los límites de la columna de grasa dentro de la escala, haciendo coincidir la parte inferior de la misma columna con una de las divisiones de la escala del butirómetro. La diferencia entre esta división y la correspondiente al

menisco de la parte superior de la columna de grasa, indicó el contenido de grasa en el queso expresado en %m/m.

Proteína

La determinación se realizó en base a la Norma Mexicana NMX-F-098-1976. Determinación de proteínas en quesos. Método de Kjeldahl.

Los reactivos que se usaron fueron grado analítico y se utilizó agua destilada.

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 98%
- Pastillas digestoras Kjeltabs (1 por muestra)
- NaOH 1:1 Solución acuosa concentrada de hidróxido de sodio (NaOH al 40%) (BAKER)
- Ácido bórico al 4% (BAKER)
- Verde Bromocresol al 0.1 % en etanol al 70%
- Ácido clorhídrico 0.1 N (HYCEL).

Material:

- Tubos digestores, guantes de asbesto y gradilla para tubos digestores.
- Matraces Erlenmeyer de 125 y 250 mL
- Pipetas graduadas de 5, 10 y 25 mL y Probeta de 25 mL
- Bureta de 50 mL, soporte universal y pinzas para bureta

Equipo : MicroKjeldahl TECATOR Kjeltec System 1002 Distilon unit 72UD3230

Procedimiento

1. Se pesaron 0.2 g de muestra sobre papel parafilm, se formó un paquetito del papel con la muestra y se colocó en el tubo digestor (previamente marcado).
2. Se colocó el tubo digestor con la muestra en el aparato digestor y se les adicionó una pastilla digestora y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
3. Se tapó el tubo con las tapa del aparato digestor conectado al vacío.

4. Se prendió el vacío y el aparato digestor iniciando a una temperatura ligera y luego aumentándola para evitar proyecciones de la muestra. Hasta llegar a una temperatura aprox. de 350-385 °C
5. Se vigilaron los tubos periódicamente y el tiempo de digestión fue aquel necesario en que tardaran las muestras en quedar todas de color amarillo canario.
6. Se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente retirándolos de la parrilla y colocándolos en la gradilla metálica.
7. Ya fríos los tubos se destilaron uno por uno con NaOH 1:1, cuidando de embonarlos perfectamente en el destilador.
8. El producto destilado se recibió en un matraz Erlenmeyer de 125 mL al cuál se le colocó previamente 50 mL de ácido bórico al 4% y se le adicionó con pipeta pasteur 12 gotas del indicador. La destilación se detuvo hasta obtener alrededor de 115 mL de destilado de coloración azul claro.
9. El contenido del matraz se tituló con HCl 0.1 N hasta un punto de vire amarillo claro.
10. Se anotó el volumen de HCl gastado para titular tanto el blanco (cuadrado de papel parafilm) como el de las muestras problema y se realizaron los cálculos necesarios.

Cálculos

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{P}$$

Donde:

V = Mililitros de ácido clorhídrico valorado utilizados en la titulación.

N = Normalidad de la solución valorada de HCL

P = Peso de la muestra

Se calculó el % de proteínas multiplicando el por ciento de nitrógeno por el factor 6.38

Cenizas

Se realizó de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-F-701-COFOCALEC-2004. Sistema Producto Leche- Alimentos -Lácteos. Determinación de Cenizas en quesos. Método de Prueba.

Materiales, Reactivos (grado analítico) y Equipo

- Agua destilada y desionizada
- Ácido nítrico concentrado HNO_3
- Crisoles de porcelana y pinzas para crisol
- Desecador con desecante (silica gel) libre de humedad
- Mufla con control de temperatura
- Placa caliente con control de temperatura
- Mechero Fisher

Procedimiento

1. Se colocó el crisol dentro de la mufla a $550^\circ\text{C} \pm 25^\circ\text{C}$ durante 20 min., transcurrido este tiempo se dejaron enfriar dentro del desecador hasta que alcanzaron la temperatura ambiente.
2. Se determinó el peso del crisol en la balanza analítica hasta obtener el peso constante del mismo y este se registró.
3. Se pesó en el crisol $3\text{g} \pm 1\text{g}$ de muestra y se anotó el peso del crisol con la muestra.
4. Se colocó el crisol con la muestra sobre la placa caliente y se quemó la muestra muy lentamente hasta su carbonización total evitando que la muestra se proyectara.
5. Se colocó el crisol dentro de la mufla y se efectuó la calcinación completa de la muestra a $550^\circ\text{C} \pm 25^\circ\text{C}$ durante 2 horas.
6. Se verificó que las cenizas estuvieran blancas o ligeramente grisáceas pero como había la presencia de puntos negros se sacó el crisol de la mufla y colocó dentro del desecador hasta que alcanzaron la temperatura ambiente.
7. Se agregaron 2 a 3 gotas de agua desionizada y se evaporó lentamente colocando el crisol sobre la parrilla de calentamiento.
8. Se colocó nuevamente el crisol dentro de la mufla a $550^\circ\text{C} \pm 25^\circ\text{C}$ durante 30 min.
9. Obtenidas las cenizas las cenizas de color blanco o gris se sacó el crisol de la mufla, se dejó enfriar dentro del desecador hasta que alcanzó la temperatura ambiente.
10. Se pesó el crisol con las cenizas y registró el peso. El contenido de cenizas en queso se obtiene como la cantidad de cenizas expresadas en % en peso.

Cálculos

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{C - A}{B} \times 100$$

Donde:

C = Peso del crisol con cenizas (en g)

A = Peso del crisol vacío a peso constante (en g)

B = Peso de la muestra (en g)

Carbohidratos totales

Se determinaron por diferencia asumiendo que el 100% es la suma del % de humedad, grasa, proteína, cenizas y carbohidratos totales en los cuales se incluye la cantidad de fibra cruda que tuvieron las muestras de queso Cotija; debido a que se esperaba una baja cantidad de éstos y para continuar con el estudio puesto que el aspecto bromatológico no era el punto central del estudio.

Sólidos Totales

Se calcularon por diferencia a la cantidad de humedad de las muestras para visualizar la cantidad de materia seca que contenían.

2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se prepararon los medios necesarios para la cuantificación de los tres grupos de microorganismos indicadores y el aislamiento de microorganismos proteolíticos. Todo el material utilizado para análisis microbiológico fue previamente esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 min. (exceptuando la leche descremada para el agar Calcio Caseinato), tanto puntas como material de vidrio, se usó agua destilada para la disolución de los medios y cajas de petri de plástico estériles. La manipulación del trabajo microbiológico fue llevada a cabo en campana de flujo laminar previamente limpiada y desinfectada.

Mesófilos aerobios

Agar Cuenta Estándar (ACE) preparado para la técnica de extensión superficial en placa. Se suspendió el polvo Agar para Métodos Estándar marca BIOXON en agua destilada, se mezcló perfectamente calentando con agitación frecuente y se hirvió durante 1 min. con agitación hasta disolución completa, luego se esterilizó y se dejó enfriar hasta una temperatura alrededor de los 40°C previo al vaciado en cajas petri (entre 12 y 15 mL cada una).

Coliformes Totales

Medios de cultivo líquido para el método de Número Más Probable (NMP).

Para preparar el medio de cultivo para la Prueba Presuntiva -Caldo Lauril Sulfato de sodio (CLSNa)- se disolvió el polvo (marca Bioxon) en agua, se distribuyó en tubos de ensaye con campana Durham en porciones de 9 mL, con tapones, y se esterizaron. Para preparar el medio de cultivo para la Prueba Confirmativa - Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante (CLBVB) se pesó el polvo (caldo BRILA-Bouillon marca Merck) y se disolvió en agua destilada, el medio se colocó en tubos de ensaye con campanas Durham y tapones que se esterizaron.

Hongos y Levaduras

Agar Papa Dextrosa (APD) preparado para la técnica de extensión superficial en placa. Se suspendió el polvo marca Bioxon en agua destilada, se mezcló y calentó con agitación, luego se dejó hervir durante 1 min. hasta disolución completa y se esterilizó. El pH se ajustó a 3.5 ± 0.1 al momento de verter el medio en las placas (15-20 mL de medio a cada una) agregando ácido tartárico al 10% previamente esterilizado (14 mL/L) al medio fundido y enfriado a 45°C.

Se utilizó Agua Peptonada al 0.1% como diluyente en las muestras.

Para preparar 100 mL de agua peptonada se disolvieron 0.1g de peptona y 0.85g de NaCl en 100mL de agua destilada, se ajustó el medio a pH 7 y se esterilizó. Así mismo se preparó agua peptonada para distribuirse en tubos de ensaye con 9 mL cada uno con tapones y se esterizaron.

3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROTEOLÍTICOS

Se utilizó Agar Calcio-Caseinato adicionado con 5g/L de leche descremada en polvo disuelta en agua destilada y esterilizada a 121°C durante 5 min. (ACC) preparado para la técnica de extensión superficial en placa para el aislamiento, las resiembras para la purificación de las colonias y la comparación de la actividad proteolítica.

Para la selección del medio de aislamiento de microorganismos proteolíticos y preparación del medio sólido agar Calcio Caseinato con leche descremada (ACC) ver ANEXO 1.

En este medio la caseína es degradada por los microorganismos proteolíticos y como consecuencia se producen halos de aclaramiento alrededor de las colonias en el medio de cultivo, que en caso contrario tendría aspecto turbio.

Tabla 8.1 Composición del Agar Calcio-Caseinato

Componente	g/L
Peptona de carne	4.0
Extracto de carne	2.0
Peptona de caseína	2.0
Caseinato de calcio	3.5
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.2
Citrato de K ₃ • H ₂ O	0.35
Na ₂ HPO ₄	0.105
KH ₂ PO ₄	0.035
NaCl	5.0
Agar	13.0

**Metodología para la cuantificación de los microorganismos Indicadores y el
aislamiento de microorganismos proteolíticos**

La preparación de las muestras y diluciones se realizaron de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994.

1. En la campana de flujo laminar se pesaron 10g de queso Cotija con una espátula estéril en una bolsa estéril para Stomacher de forma que ésta fuera una muestra representativa, es decir, se tomó de forma aleatoria de la pieza de queso, y a la muestra se le adicionaron 90 mL de agua peptonada estéril al 0.1% (Dilución 10^{-1}). Inmediatamente se homogeneizó la muestra en el Stomacher a una velocidad media durante 60 seg.
2. Se realizaron diluciones decimales hasta una dilución 10^{-6} en tubos conteniendo 9 mL del mismo diluyente, las alícuotas fueron tomadas con pipeta automática, cambiando las puntas entre cada dilución y agitando los tubos en el vortex entre cada una. Para realizar una cuantificación más confiable se realizaron 2 series de diluciones (A y B).
3. Para los medios líquidos: CLSNa y CLBVB del NMP se transfirió 1 mL de cada dilución - con punta estéril. Para los medios sólidos: ACE, APD y ACC se transfirieron 150 μ L de cada dilución -con punta estéril- a las cajas petri con agar y se esparcieron por medio de varillas de vidrio colocadas en solución alcohólica, flameadas al mechero y enfriadas a temperatura ambiente en cada ocasión. Se inocularon dos cajas por dilución de cada una de las series.
4. Cada medio se incubó a las condiciones previstas para cada tipo de microorganismo y se realizó la cuantificación de acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas.

Condiciones de Incubación

- ◆ Mesófilos Aerobios (NOM-092-SSA1-1994) : $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 48 ± 2 hrs.
- ◆ Coliformes totales por NMP (NOM-112-SSA1-1944):
CLSNa.- $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 ± 2 hrs. En caso de turbidez y formación de gas en la campana (tubo positivo) se inoculó por triplicado 1mL en los tubos con CLBVB e incubaron a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 ± 2 hrs. Se consideraron tubos positivos aquellos con turbidez en el medio y formación de gas en la campana Durham.
- ◆ Hongos y levaduras (NOM-111-SSA1-1944): $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, cuantificación después de 3, 4 y 5 días.
- ◆ Microorganismos proteolíticos: $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48-72 hrs. Se contaron las colonias con halo claro alrededor.

DIAGRAMA DEL ANALISIS MICROBIOLÓGICO

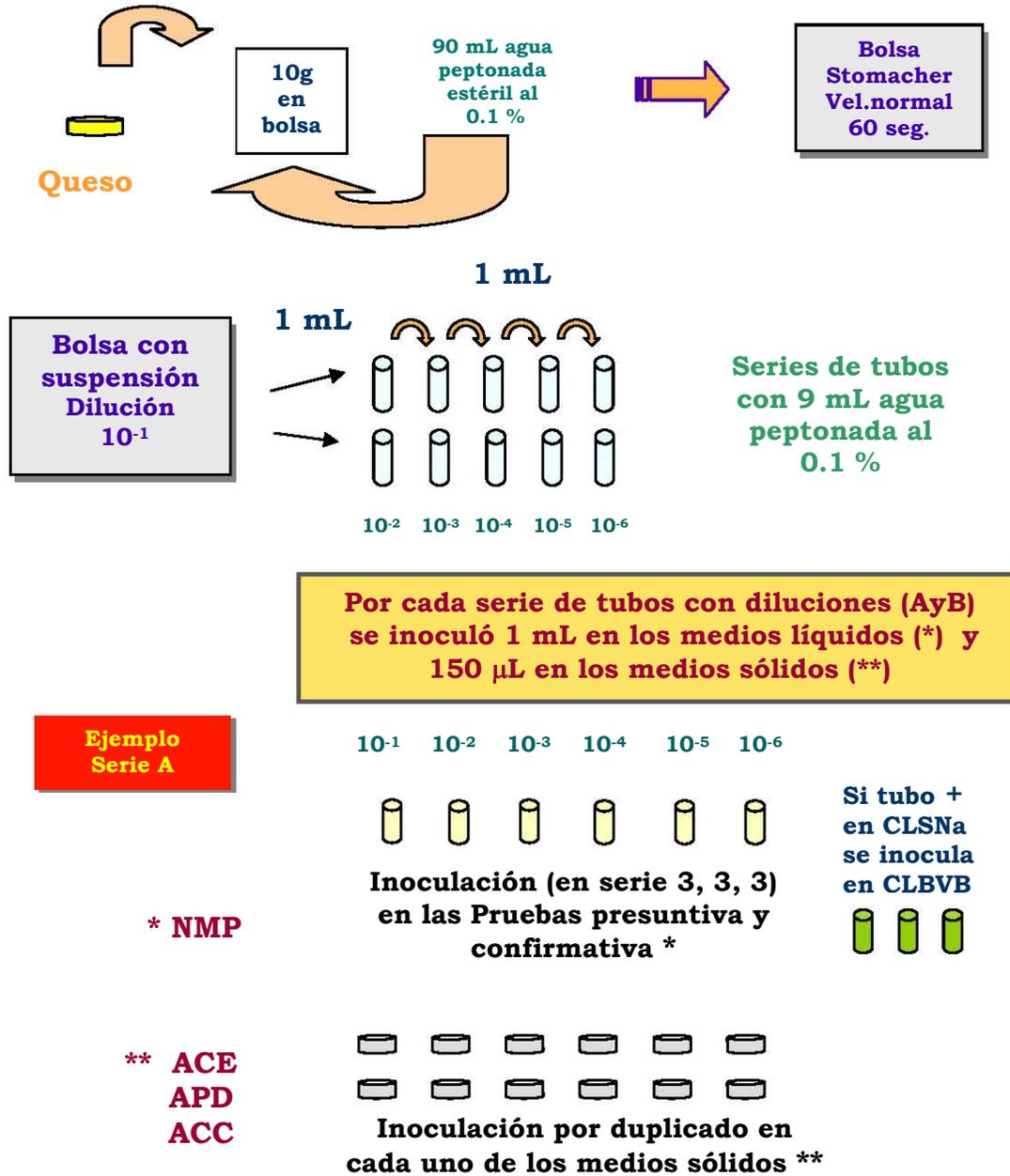


Figura 8.1 Diagrama para el análisis microbiológico y el aislamiento de los microorganismos proteolíticos (para cada una de las muestras)

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA, PRUEBA DE CATALASA Y PURIFICACIÓN DE LAS COLONIAS PROTEOLÍTICAS

- Para la observación microscópica se realizó la tinción de Gram de acuerdo a la técnica reportada en el manual de prácticas de Microbiología General de la Facultad de Química.
- Para la prueba de la catalasa se adicionaron un par de gotas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 % a una colonia pura y aislada con 18-24 hrs. de incubación. Si se observaron burbujas se reportó como prueba positiva.
- La purificación de las colonias aisladas en el medio ACC, se realizó mediante resiembras en el mismo medio, observando al microscopio uniformidad microscópica del cultivo.

4. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LAS COLONIAS EN AGAR CALCIO CASEINATO

De las colonias proteolíticas aisladas y purificadas en ACC se tomó una pequeña cantidad de colonia por medio de una punción con un palillo de madera (sin pico para estandarizar la superficie de la colonia a tomar) previamente estéril y se sembró tocando la superficie del agar.

Se prepararon dos variantes del medio agar Calcio Caseinato, uno adicionado con 5 g/L y el otro con 7.5 g/L de leche descremada en polvo. Luego se realizó la medición del diámetro del halo formado y del diámetro de la colonia después del transcurso de 24, 48 y 72 horas de incubación a 30 ° C y a 37 ° C.

Se determinó la relación de la actividad observada realizando la división del diámetro del halo entre el diámetro de la colonia.

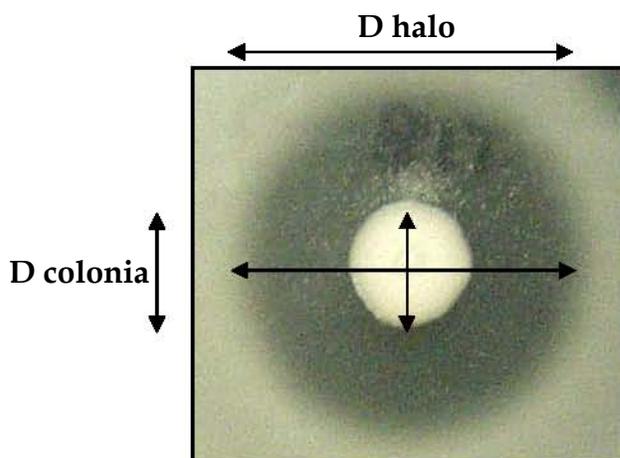


Figura 8.2 Medición del diámetro del halo y la colonia.

5. IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PROTEOLÍTICOS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES (ARDRA)

El ARDRA o Análisis de Restricción de DNA Ribosomal Amplificado, se basa en la obtención de fragmentos de rDNA's mediante la amplificación por PCR usando cebadores universales, el producto se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos se analizan en geles de agarosa. (Díaz Ruiz y Wachter Rodarte 2003)

Se empleó agua destilada, filtrada (por equipo Millipore) y esterilizada en todos los casos, así como material (puntas, tubos eppendorf, tubos falcon, etc.) y reactivos previamente esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min. Reactivos y medios para la identificación de microorganismos en ANEXO 2.

Obtención del paquete celular

1. En un tubo de centrifuga de 50 mL conteniendo 10 mL de medio de cultivo líquido (caldo nutritivo o caldo APT (para bacterias Gram+ y catalasa-) se inoculó el microorganismo raspando una colonia con una punta y se incubó a 30°C centrifugándolo a 200rpm durante 18-24 horas o hasta observar turbidez en el medio.
2. Se centrifugó el tubo a 15 000rpm durante 10 min. a 4°C.
3. Se lavó dos veces el pellet obtenido con 10mL de solución salina, agitando en vortex y centrifugando entre cada uno de los lavados.
4. Se decantó inmediatamente el sobrenadante para la obtención del paquete celular.
5. Al pellet se le adicionó dos veces 0.5mL de Buffer PBS para trasferirlo a un tubo eppendorf de 2mL. El tubo se mantuvo en refrigeración hasta su tratamiento.

Extracción del ADN con solución de Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico

1. Al tubo eppendorf con la suspensión del paquete celular se le adicionaron 150 μ L de Buffer PBS y se agitó en vortex hasta una total resuspensión. Se centrifugó a 14 000rpm durante 2.5 min. y a 7000rpm durante 2.5 min. a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se repitió la operación con otros 150 μ L de Buffer PBS.
2. El pellet se resuspendió agitándolo en vortex y se le dio un spin en la centrífuga para bajar el contenido de las paredes del tubo.
3. Se le adicionó lizozima con la punta de una espátula y se incubó a 850rpm durante 15 min. a 37°C en el Thermomix.
4. Se adicionaron 20 μ L de RNAsa y se incubó a 37°C centrifugando a 300 rpm por 30 min.
5. Se agitó en vortex para resuspensión y se adicionaron 1.4 μ L de Proteinasa K agitando en vortex nuevamente el tubo eppendorf boca arriba y boca abajo, incubando 5 min. en hielo.
6. Se adicionaron 10 μ L de solución SDS al 10%, se agitó en vortex y se incubó a 37°C por 40 min. a 600rpm.
7. Al tubo eppendorf se le adicionaron 200 μ L de solución NaCl 6M.
8. Se adicionaron 2 volúmenes (800 μ L) de solución Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó en vortex vigorosamente durante medio min.
9. Se centrifugó por 10 min. a 4°C y 15 000rpm.
10. Se separó la fase superior del tubo (alrededor de 500 μ L) y se colocó en otro tubo eppendorf estéril al cual se le adicionaron nuevamente 2 volúmenes de solución Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (25:24:1), repitiendo el paso anterior.
11. A la fase superior colocada en otro tubo se le adicionó 1mL de Etanol al 100% frío (2 volúmenes), se invirtió 3-5 veces y se incubó 1 hr. en congelación.
12. El tubo se centrifugó a 4°C, centrifugando a 14 000rpm por 10 min., se le eliminó el sobrenadante y se le adicionaron 300 μ L de Etanol al 75% frío.
13. Se agitó en vortex y se centrifugó durante 2 min. centrifugando a 14 000rpm y temperatura ambiente. Se eliminó el etanol y se dejó secar completamente.
14. El pellet obtenido se resuspendió con 100 μ L de buffer TE.

Determinación de la pureza y concentración del ADN

Para la determinación de la pureza se realizó la medición de absorbancias a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro de UV (perkin Elmer); con el programa LambdaBio se determinó la relación A_{260}/A_{280} nm, y finalmente se analizó el barrido de 200 - 300 nm para observar un pico a 260nm. Se consideró la pureza requerida cuando el valor de la relación A_{260}/A_{280} nm, se encontró en una relación >1.8 . Las diluciones necesarias para la lectura se hicieron con agua filtrada, destilada y estéril.

La determinación de la concentración se hizo mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] = (A_{260\text{nm}}) (\text{Factor de ADN de doble cadena}) (\text{Factor de dilución})$$

Donde

Donde:

$$[\text{ADN}] = \text{Concentración de ADN en } \mu\text{g/mL o ng/}\mu\text{L.}$$

A_{260} = Absorbancia determinada a 260 nm.

$$\text{Factor de ADN de doble cadena} = 50 \mu\text{g ADN / mL} = 50 \text{ ng ADN / } \mu\text{L}$$

$$\text{Factor de dilución} = \text{Volumen}_{\text{total en el tubo}} (\mu\text{L}) / \text{Volumen}_{\text{ADN extraído}} (\mu\text{L}) \text{ -alícuota-}$$

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó la PCR para la amplificación de la región V3 del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal.

Tabla 8.2 Secuencias de los cebadores empleados (Ampe et al., 1999)

Cebadores	Secuencia 5 - 3	Posición	Orientación
AGC 338F	NA ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	357 - 338	Directa
B518R	NA ATT ACC GCG GCT GCT GG	534 - 518	Reversa

Tabla 8.3 Protocolo empleado en la PCR

<i>Reactivo</i>	<i>Conc. inicial</i>	<i>Conc. final</i>	<i>Volumen (μL) para 25 μL de rx</i>
Buffer de PCR	10X	1X	2.5
MgCl₂	50 mM	2.5 mM	1.25
dNTP's 100mM	2.5 mM	0.2 mM	2
Cebador 338F	10 μM	0.4 μM	1
Cebador 518R	10 μM	0.4 μM	1
templado de ADN	10 ng/ μL	100 ng /25 μL rx	10
Taq polimerasa	2.5 UI/rx	2 UI	0.8
Agua	-----	-----	Cbp.25 μL

Orden de adición:

1. Agua
2. Master mix *
3. Templado de ADN *
4. Taq polimerasa *

* Orden de adición para la Master mix:

1. Buffer de PCR
2. MgCl₂
3. dNTP's
4. Cebadores

* Nota: Permanece en hielo hasta su adición.

Los tubos permanecieron en hielo hasta antes de colocar en el termociclador.

La manipulación para realizar la PCR se llevó a cabo en la campana de flujo laminar para trabajar Biología Molecular.

Tabla 8.4 Condiciones de la reacción de PCR para amplificar la región V3 del gen ARNr 16S. (Muyzer *et al.*, 1999)

<i>No. de ciclos</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo (min.)</i>
1	94	5
20	94	1
	65	1
	72	3
10	94	1
	55	1
	72	3
1	72	10

Digestión del producto de PCR con enzimas de restricción

Se siguió el protocolo recomendado para la digestión de productos de PCR directamente después de su amplificación de acuerdo a cada Enzima. En general el orden de adición fué:

1. Agua (libre de nucleasas) 8 μ L
2. Producto de PCR (aprox. 1 μ g de ADN) 8 μ L
3. Buffer 2 μ L
4. Enzima * 2 μ L

El volumen de enzima es el recomendado para preparaciones a concentraciones estándar (10 U/ μ L). Después de mezclarse se dio un spin y se incubaron a 37°C / 24 hrs.

Tabla 8.5 Enzimas de restricción

<i>Enzima</i>	<i>Sitio de corte</i>	<i>Enzima</i>	<i>Sitio de corte</i>
Hinf	G ↓ ANTC	PstI	CTGCA ↓ G
BglII	GCCNNNN ↓ NGGC	BsuRI	GG ↓ CC
SmaI	CCC ↓ GGG	MboI	↓ GATC

Nota: N = G, A, T o C.

Purificación de los productos de PCR para su secuenciación

Se siguió la metodología descrita por el kit de purificación de Applied Science (Roche): “High Pure PCR Product Purification Kit” ANEXO 3.

Electroforesis Sumergida

Mediante esta técnica se observaron los fragmentos de ADN, productos de PCR y fragmentos de la digestión con enzimas de restricción.

- Se preparó Buffer TAE 1X a partir de una concentración 10X, utilizando agua desionizada, filtrada, estéril. Se utilizaron aprox. 200 mL para la cámara de electroforesis o lo necesario para cubrir el gel.
- La electroforesis se dejó correr hasta que los fragmentos se visualizaban aproximadamente a 2/3 partes de la cámara.
- Se adicionó 1µL de Bromuro de Etidio por cada 10 mL de solución de agarosa para revelar los fragmentos obtenidos los cuales se observaron en el transiluminador de UV.

Tabla 8.6 Condiciones de la Electroforesis Sumergida

	ADN	Productos PCR	Productos de la digestión
Conc. Gel de Agarosa	1.5%	2%	2%
Condiciones	100 volts / 40 min.	100 volts / 30 min.	80 volts / 45 min.
Cantidad en los pozos	8 µL producto ADN 2 µL buffer de carga	4 µL producto de PCR 4 µL Agua 2 µL buffer de carga	10 µL producto 3 µL buffer de carga

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio influyeron algunos factores externos a la composición original de las muestras, como lo fue la toma de muestra, ya que se desconoce si se realizó de forma aleatoria con respecto a la pieza original, debido a que estos quesos se producen a granel (en piezas muy grandes). La representatividad de las muestras dependerá del corte que haya realizado el vendedor. Además, pudo haber influido en la microbiota de los quesos el trato durante la venta y el transporte de los mismos, porque es posible que se hayan incorporado otros microorganismos, si no se manejaron bajo las condiciones adecuadas; un ejemplo sería la inoculación de microorganismos por las manos del vendedor al manipularlo. Por otro lado, cabe mencionar que aunque durante la congelación se forma una red de todos los componentes que integran a los alimentos -la cual protege a los microorganismos de cambios bruscos-, probablemente algunos de los microorganismos más susceptibles a dichos cambios, pudieron haberse perdido, sobre todo por las oscilaciones de humedad y temperatura a las que fueron sometidos, previas a su estudio.

Durante el estudio se procuró cuidar las muestras al máximo para evitar una contaminación mientras se realizaba el mismo; se tomaron las medidas necesarias, tales como: manejo de muestras en área aséptica y con utensilios estériles.

Aunque no era el objetivo principal del estudio, se realizó el análisis fisicoquímico y el Análisis Químico Proximal para conocer el porcentaje de los componentes principales del alimento disponible para la microbiota, ya que desde la preparación del queso a la maduración y posiblemente hasta el almacenamiento del mismo, ocurren las reacciones que logran una transformación bioquímica del producto, debido a la actividad metabólica de los microorganismos presentes.

1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL

En todas las determinaciones se calculó la desviación estándar (D.E.) y porcentaje del coeficiente de variación (CV).

Tabla 9.1.1 Determinación de a_w

# Mtra.	Clave	Edo. de maduración:	a_w	a_w promedio	D.E. y % CV
1 _J	F	Oreado	0.939	0.938	0.0014
			0.937		0.15
2 _J	IO	Añejo	0.935	0.934	0.0014
			0.933		0.15
3 _M	TO	Añejo	0.910	0.908	0.0028
			0.906		0.31
4 _J	Q	Rendido	0.860	0.859	0.0021
			0.857		0.25
5 _M	P	Rendido	0.857	0.857	0.0000
			0.857		0
6 _M	TM	Rendido	0.855	0.854	0.0014
			0.853		0.17

En la Tabla 9.1.1 se muestran los valores de a_w obtenidos de las determinaciones, se observó que los quesos con menor tiempo de maduración “oreados y añejos” tienen un valor de a_w mayor (0.94 - 0.91), con respecto a los quesos con tiempo más prolongado de maduración “rendidos” (0.85 - 0.86).

Tabla 9.1.2 Determinación de pH y acidez (como Ácido Láctico)

# Mtra.	Clave	Edo. de maduración	pH	pH promedio	D.E. y % CV	%Acidez	%Acidez promedio	D.E. y % CV
1 _J	F	Oreado	6.04	6.11	0.081	0.516	0.544	0.024
			6.1		1.32	0.56		4.47
			6.2			0.556		
2 _J	IO	Añejo	6.45	6.45	0.006	0.36	0.367	0.012
			6.46		0.09	0.36		3.15
			6.45			0.38		
3 _M	TO	Añejo	6.16	6.15	0.010	0.358	0.344	0.013
			6.14		0.16	0.341		3.71
			6.15			0.333		
4 _J	Q	Rendido	5.31	5.32	0.021	1.509	1.498	0.023
			5.3		0.39	1.513		1.51
			5.34			1.472		
5 _M	P	Rendido	5.33	5.32	0.010	1.262	1.247	0.013
			5.32		0.19	1.243		1.05
			5.31			1.237		
6 _M	TM	Rendido	5.5	5.50	0.006	1.324	1.335	0.019
			5.51		0.10	1.324		1.43
			5.5			1.357		

En la Tabla 9.1.2 se observó que los quesos rendidos (mayor tiempo de maduración) tienen valores de % de Acidez mucho mayores (1.2- 1.5%), con respecto de los añejos y al oreado (0.3-0.5%); efecto relacionado con el pH, pues los quesos rendidos tienen un valor de pH menor (5.3-5.5), con respecto al oreado y añejos (6.1-6.4).

Se observó que los valores del Coeficiente de Variación (CV) para la determinación del % de Acidez de los quesos oreados y añejos son los valores más altos obtenidos en todas las determinaciones analíticas, sin embargo, se encuentran dentro de lo aceptable (<5% CV).

Tabla 9.1.3 Determinación del % de humedad por el método de Horno a vacío

# Mtra.	Clave	Edo. de maduración:	%Humedad	%Humedad promedio	D.E. y % CV	% Sólidos Totales
1 _J	F	Oreado	53.25	51.40	1.668	48.60
			50.94		3.25	
			50.01			
2 _J	IO	Añejo	44.38	43.95	0.719	56.05
			44.35		1.64	
			43.12			
3 _M	TO	Añejo	43.08	43.15	0.067	56.85
			43.17		0.15	
			43.21			
4 _J	Q	Rendido	32.53	32.49	0.064	67.51
			32.53		0.20	
			32.42			
5 _M	P	Rendido	31.69	31.72	0.035	68.28
			31.74		0.11	
			*34.25			
6 _M	TM	Rendido	30.97	30.60	0.455	69.40
			30.73		1.49	
			30.09			

*Nota: No se tomó en cuenta este valor puesto que la muestra se derramó dentro del desecador al momento de pesar, lo cual originó un valor erróneo.

En la Tabla 9.1.3 se observa que el contenido de humedad disminuye conforme transcurre la maduración de los quesos. Se obtuvieron para los quesos “oreado”, “añejos” y “rendidos” valores de 51%, 43-44% y 31-32% respectivamente. La determinación de sólidos totales se calculó por diferencia con respecto al % de Humedad, y este valor en concordancia aumenta, al incrementar el estado de maduración.

Tabla 9.1.4 Determinación de % de grasa por el método de Gerber para Quesos

# Mtra.	Clave	Edo. de maduración:	% Grasa	%Grasa BH promedio	D. E. y % CV	%Grasa BS promedio
1 _J	F	Oreado	21.5	22.00	0.500	45.27
			22.5		2.27	
			22			
2 _J	IO	Añejo	27.5	27.17	0.289	48.45
			27		1.06	
			27			
3 _M	TO	Añejo	27	27.33	0.289	47.93
			27.5		1.06	
			27.5			
4 _J	Q	Rendido	30	29.83	0.289	44.19
			29.5		0.97	
			30			
5 _M	P	Rendido	35	34.83	0.289	50.67
			35		0.83	
			34.5			
6 _M	TM	Rendido	35	34.33	0.577	49.71
			34		1.68	
			34			

En la Tabla 9.1.4 se observó que la cantidad de grasa aumenta a medida que incrementa el tiempo de maduración, debido a la disminución del contenido de humedad. Se obtuvieron para los quesos “oreado”, “añejos” y “rendidos” valores de 22%, 27% y 30-35% respectivamente.

Tabla 9.1.5 Determinación de proteína (Microkjeldahl)

# Mtra.	Clave	Edo. de maduración:	%Proteína	%Prot BH promedio	D. E. y %CV	%Prot BS Promedio
1 _J	F	Oreado	16.50	16.76	0.275	34.49
			16.74		1.64	
			17.05			
2 _J	IO	Añejo	19.92	19.69	0.217	35.15
			19.49		1.10	
			19.67			
3 _M	TO	Añejo	18.05	18.05	0.006	31.76
			18.06		0.03	
			18.05			
4 _J	Q	Rendido	25.54	25.63	0.192	37.96
			25.85		0.75	
			25.50			
5 _M	P	Rendido	23.74	23.68	0.137	34.68
			23.77		0.58	
			23.52			
6 _M	TM	Rendido	26.98	27.07	0.076	39.01
			27.10		0.28	
			27.12			

En la Tabla 9.1.5 se aprecia, que el contenido de proteína aumenta a medida que incrementa el tiempo de maduración, debido a la disminución de humedad presente. Se obtuvieron para los quesos “oreado”, “añejos” y “rendidos” valores de 17%, 18-20% y 24-27% respectivamente.

Tabla 9.1.6 Determinación de cenizas (Mufla a 550°C ±25°C durante 2 hrs.)

# Mtra.	Clave	Edo. de maduración:	%Cenizas	%Cenizas BS promedio	D. E. y % CV	%Cenizas BH Promedio
1 _J	F	Oreado	5.19	5.20	0.092	2.56
			5.37		1.76	
			5.25			
2 _J	IO	Añejo	5.18	5.12	0.052	2.87
			5.09		1.02	
			5.10			
3 _M	TO	Añejo	11.10	10.99	0.194	6.25
			11.11		1.77	
			10.77			
4 _J	Q	Rendido	8.02	8.06	0.052	5.44
			8.12		0.65	
			8.05			
5 _M	P	Rendido	9.93	9.96	0.065	6.80
			10.03		0.65	
			9.91			
6 _M	TM	Rendido	10.05	9.97	0.094	6.92
			9.87		0.94	
			9.98			

En la Tabla 9.1.6 destaca, que el contenido de cenizas es muy variable y que no hay un patrón con respecto al estado de maduración. Probablemente se deba a que cada productor adiciona la sal a su manera, es decir, no está estandarizada la cantidad a adicionar, y por lo mismo, se ve reflejado en la cantidad de cenizas.

La determinación de carbohidratos totales (CHO's), se calculó por diferencia con respecto a los demás componentes.

RESULTADOS ANALÍTICOS GLOBALES

Tabla 9.1.7 Determinaciones fisicoquímicas

# Mtra.	Clave	Edo. de maduración	a_w	pH ± D.E.	% Acidez ± D.E.
1 _J	F	Oreado	0.938	6.11 ± 0.081	0.544 ± 0.024
2 _J	IO	Añejo	0.934	6.45 ± 0.006	0.367 ± 0.012
3 _M	TO	Añejo	0.908	6.15 ± 0.010	0.344 ± 0.013
4 _J	Q	Rendido	0.859	5.32 ± 0.021	1.498 ± 0.023
5 _M	P	Rendido	0.857	5.32 ± 0.010	1.247 ± 0.013
6 _M	TM	Rendido	0.854	5.50 ± 0.006	1.335 ± 0.019

Tabla 9.1.8 Análisis Químico Proximal en Base Húmeda

# Mtra.	Clave	Edo. de maduración:	% Humedad	% Grasa	% Proteína	% Cenizas	% CHO's
1 _J	F	Oreado	51.40	22.00	16.76	2.56	7.28
2 _J	IO	Añejo	43.95	27.17	19.69	2.87	6.31
3 _M	TO	Añejo	43.15	27.33	18.05	6.25	5.30
4 _J	Q	Rendido	32.49	29.83	25.63	5.44	6.61
5 _M	P	Rendido	31.72	34.83	23.68	6.80	3.21
6 _M	TM	Rendido	30.60	34.33	27.07	6.92	0.91

Tabla 9.1.9 Análisis Químico Proximal en Base Seca

# Mtra.	Clave	Edo. de maduración:	% ST	% Grasa	% Proteína	% Cenizas	% CHO's
1 _J	F	Oreado	48.60	45.27	34.49	5.27	15.04
2 _J	IO	Añejo	56.05	48.45	35.15	5.12	11.28
3 _M	TO	Añejo	56.85	47.93	31.76	10.99	9.32
4 _J	Q	Rendido	67.51	44.19	37.96	8.06	9.79
5 _M	P	Rendido	68.28	50.67	34.68	9.96	4.69
6 _M	TM	Rendido	69.40	49.71	39.01	9.97	1.31

Tabla 9.1.10 Análisis fisicoquímico y Químico Proximal (BH)

# Mtra.	Edo. de maduración:	a_w	pH	% Acidez	% Humedad	% Grasa	% Proteína	% Cenizas	% CHO's
1J	Oreado	0.938	6.11	0.544	51.40	22.00	16.76	2.56	7.28
2J	Añejo	0.934	6.45	0.367	43.95	27.17	19.69	2.87	6.31
3M	Añejo	0.908	6.15	0.344	43.15	27.33	18.05	6.25	5.30
4J	Rendido	0.859	5.32	1.498	32.49	29.83	25.63	5.44	6.61
5M	Rendido	0.857	5.32	1.247	31.72	34.83	23.68	6.80	3.21
6M	Rendido	0.854	5.50	1.335	30.60	34.33	27.07	6.92	0.91

Tabla 9.1.11 Análisis fisicoquímico y Químico Proximal (BS)

# Mtra.	Edo. de maduración:	a_w	pH	% Acidez	% ST	% Grasa	% Proteína	% Cenizas	% CHO's
1J	Oreado	0.938	6.11	0.544	48.60	45.27	34.49	5.27	15.04
2J	Añejo	0.934	6.45	0.367	56.05	48.45	35.15	5.12	11.28
3M	Añejo	0.908	6.15	0.344	56.85	47.93	31.76	10.99	9.32
4J	Rendido	0.859	5.32	1.498	67.51	44.19	37.96	8.06	9.79
5M	Rendido	0.857	5.32	1.247	68.28	50.67	34.68	9.96	4.69
6M	Rendido	0.854	5.50	1.335	69.40	49.71	39.01	9.97	1.31

Los resultados obtenidos muestran que a medida que transcurre la maduración de los quesos Cotija, disminuye el contenido de humedad, a_w y pH; lo cual conlleva a un aumento del porcentaje de acidez, grasa y proteína

El contenido de humedad del queso, además de estar influenciado por el tiempo de maduración -el cual afecta de manera inversamente proporcional-, se ve influenciado por el proceso de elaboración, puesto que, durante algunas etapas como el cortado, desuerado y prensado, al no estar estandarizada la manera en que éstas se realizan, la cantidad de agua presente variará de acuerdo con cada productor; esto afectará en la conservación del producto, ya que un incremento en el contenido de humedad, aumentará la susceptibilidad del producto a contaminarse. En los resultados presentados, resalta que la actividad acuosa (a_w), varía de forma directamente proporcional con respecto a la humedad, puesto que en los quesos de mayor humedad, hay mayor a_w , y en los de menor, disminuye el valor de a_w . Tal fenómeno, ha sido confirmado en la literatura.

En las Tablas 9.1.10 y 9.1.11 se puede distinguir que con el transcurso de la maduración, el a_w (actividad acuosa o agua disponible), va disminuyendo como consecuencia de la evaporación del agua superficial del queso, debido a los diversos factores que influyen en el proceso de maduración; lo que a su vez, conlleva a elevar la concentración de sal y sólidos totales, los cuales también afectan al a_w del producto. A valores de a_w menores a 0.93, habrá una selección con respecto a la microbiota presente en el queso, puesto que mientras menor sea este valor, más se restringe el número de microorganismos capaces de crecer y reproducirse en dichas condiciones, por lo que en quesos con alto a_w , aumentará la posibilidad de presentar mayor cantidad de microorganismos, tal situación afectaría directamente la vida de anaquel del producto, y por ende, su calidad.

Los valores de a_w de los quesos Cotija Oreado, Añejo y Rendidos (que tienen ≤ 3 meses, 3-6 meses y ≥ 6 meses de maduración respectivamente) podrían equipararse con los de los quesos Mozzarella, Parmesano, Provolone y Cabrales, que son 0.94, 0.92, 0.91 y 0.90 respectivamente (Fox y col. 2000).

La cantidad de cenizas en los quesos está directamente relacionada con el contenido de sal (NaCl -cloruro de sodio-) presente, y esto a su vez interviene en el agua disponible (a_w) en los mismos. Existe una relación entre el contenido de cloruros y la cantidad de cenizas presentes en

el queso, ya que la sal mineral predominante en este tipo de quesos es el cloruro de sodio (NaCl), pues representa desde 50% hasta un 92% del total de minerales. Para quesos “Oreados” de la “Asociación Regional de Productores de Queso Cotija”, el contenido de sal (NaCl) se encuentra dentro de un intervalo de 4 - 7.4%, con diferencias estadísticamente significativas, puesto que al no estar estandarizada la cantidad de sal a añadir, cada productor adicionará la medida de sal que le parezca adecuada según su costumbre, experiencia, tradición y/o gusto. (Hernández Briones 2006).

Durante el transcurso de la maduración de los quesos, los ácidos orgánicos como el láctico, acético y propiónico generados por la actividad metabólica de los microorganismos presentes se van acumulando (sean éstos homo o heterofermentativos) y como consecuencia hay un aumento de acidez que conlleva a la disminución del pH, lo cual se observa en los resultados presentados en la Tabla 9.1.7.

Al observar los resultados del Análisis Químico Proximal, puede decirse que el orden general de mayor a menor porcentaje de los macro y micro componentes de los quesos es: grasa, proteína, cenizas y carbohidratos.

Los valores calculados de carbohidratos presentes en los queso Cotija, mostraron mayor variabilidad -porque son valores estimados-, ya que no se obtuvieron analíticamente, sino por diferencia. Hay una sobreestimación de éstos debido al método empleado para determinar el contenido de humedad, pues en el horno a vacío (12 hrs. a 70 °C y una presión de 12KPa) puede haber una sobreestimación dada por los compuestos volátiles presentes en el queso. Además, asumiendo que el resto de los componentes pertenecen a este macro-componente -puesto que son quesos elaborados artesanalmente-, se duda que contengan aditivos que pudieran formar parte de este porcentaje; los compuestos restantes, en tal caso, pudieran ser dextranas, polisacáridos o fibra, éstos no se determinaron.

Hernández Briones (2006), quien estableció la cantidad de carbohidratos solubles a quesos “Oreados” (≤ 3 meses de maduración) por el método de Fenol-sulfúrico, encontró valores en un rango de 0.08-0.15 % (base húmeda). En la literatura se reporta que la cantidad de carbohidratos

en quesos no debe ser mayor al 1%, pues la lactosa (carbohidrato principal de la leche), es eliminada durante el desuerado, y el remanente es transformado a ácido láctico -utilizado por las bacterias ácido lácticas y otros microorganismos capaces de metabolizar la lactosa presente en el queso-

La relación grasa-proteína en el queso estará dada por la misma presente en la leche y ésta se ve influenciada a su vez por la raza de la vaca. En el caso particular del queso Cotija, habrá una variación notable, pues se ha visto que los productores de la sierra de Jalmich, poseen diferentes tipos de ganado, por lo tanto, puede decirse que la relación grasa-proteína presentará una variación en el queso Cotija, en relación con el tipo de ganado que tenga cada productor.

Puesto que la composición básica del queso Cotija *Región de Origen* es la siguiente: Humedad máxima 36%, Grasa mínima 23%, Proteína mínima 25%; puede acentarse que, de acuerdo con el parámetro de humedad, sólo los quesos rendidos (con tiempo de maduración ≥ 6 meses) cumplen con la especificación; para el parámetro de grasa, los añejos y rendidos (3-6 meses y ≤ 3 meses de maduración respectivamente) también lo hacen, y de acuerdo al de proteína, sólo dos de los quesos rendidos lo logran. Esto se debe a que el tiempo de maduración de los quesos Cotija, repercute en las características fisicoquímicas de los mismos, puesto que en los quesos con poco tiempo de maduración, aún no se han llevado a cabo las reacciones químicas y enzimáticas por la microbiota -presente en el queso- que origina las características típicas de los quesos madurados.

De acuerdo a lo reportado por Fox y col. en el 2000 y los resultados obtenidos de las determinaciones realizadas, se elaboró la tabla 9.1.12, en ella se comparan el porcentaje de los sólidos totales, grasa, proteína, cenizas, cloruro de sodio y pH. Los quesos Cotija rendidos, son quesos con alto contenido graso y proteico, además tienen un bajo pH y elevado contenido de sal, características únicas, propias de ellos. Las particularidades del queso Cotija oreado (con menor tiempo de maduración), se encuentran cercanas a las del queso Feta, mientras que las de los Cotija rendidos (mayor tiempo de maduración), son cercanas a las del queso Parmesano, tal como lo mencionan los conocedores.

Tabla 9.1.12 Composición típica de algunos Quesos

Quesos	% ST	%Grasa	%Proteína	%Cenizas	%NaCl	pH
<i>Camembert</i>	47.5	23	18.5	3.8	2.5	6.9
<i>Feta</i>	47	26	16.7	-	3.0	4.5
<i>Cotija oreado (1J)</i>	48.6	22	17	2.6	4 - 7*	6.1
<i>Limburger</i>	55	28	22	4.8	2.0	6.8
<i>Cotija añejo (X de 2J y 3M)</i>	56.4	27	19	4.5	4 - 7*	6.3
<i>Muenster</i>	57	29	23	4.4	1.8	6.2
<i>Edam</i>	57	24	26.1	3.0	2.0	5.7
<i>Provolone</i>	57.5	27	25	4.0	3.0	5.4
<i>Azul</i>	58	29	21	6.0	4.5	6.5
<i>Gouda</i>	59	28.5	26	3.0	2.0	5.8
<i>Brick</i>	60	30	22	4.4	1.9	6.4
<i>Roquefort</i>	60	31	21.5	6.0	3.5	6.4
<i>Cheddar</i>	63	32	25	4.1	1.5	5.5
<i>Gruyere</i>	66.5	30	30	4.1	1.1	5.7
<i>Cotija rendido (X de 4J, 5M y 6M)</i>	68.4	33	25	6.4	4 - 7*	5.4
<i>Parmesano</i>	69	25	36	5.4	2.6	5.4
<i>Romano</i>	77	24	35	10.5	5.5	5.4

* Cantidad de sal de acuerdo a lo reportado en la literatura.

2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Cuantificación de los tres principales grupos de microorganismos indicadores: Mesófilos aerobios (MA), Coliformes Totales (CT), Hongos (H) y Levaduras (L).

Tabla 9.2.1 Cuantificación de los tres grupos de microorganismos indicadores

# Mtra.	Clave	Edo. de maduración:	a_w	% Acidez	MA (UFC/g)	CT (NMP/g)	L (UFC/g)
1 _J	F	Oreado	0.938	0.544	46×10^5	140	41×10^6
2 _J	IO	Añejo	0.934	0.367	58×10^6	4600	79×10^6
3 _M	TO	Añejo	0.908	0.344	34×10^5	4600	24×10^6
4 _J	Q	Rendido	0.859	1.498	43×10^4	4	47×10^4
5 _M	P	Rendido	0.857	1.247	30×10^2	< 3	200
6 _M	TM	Rendido	0.854	1.335	89×10^2	< 3	130

De acuerdo con lo observado en la Tabla 9.2.1, las cuentas de mesófilos aerobios en los quesos, varían de 10^6 a 10^2 en los quesos oreado, añejos a los rendidos. El valor para NMP de coliformes totales varió de 4600 en quesos añejos a un valor < 3 en los rendidos y contrario a lo esperado, en el queso oreado se encontró menor cantidad de coliformes totales que en los añejos, esto puede deberse a que cada productor elabora el queso bajo diversas prácticas higiénicas, y lo más seguro es que hayan sido mucho mejores para este caso. No se encontraron hongos en las muestras de queso Cotija estudiadas, por lo que sólo se muestran los resultados obtenidos de las cuentas de levaduras, éstas varían de 10^6 para los quesos de menor estado de maduración, a 10^2 para los de mayor.

Es importante mencionar que el tiempo de maduración en los quesos afecta de manera indirectamente proporcional, a la carga de microorganismos indicadores, pues en los quesos rendidos se encontró menor carga microbiana que en los añejos y el oreado.

A medida que transcurre el proceso de maduración en los quesos, la carga microbiana se ve afectada por los factores fisicoquímicos de los mismos, puesto que la actividad acuosa relacionada con la humedad y la cantidad de sal presente limitan el crecimiento microbiano, logrando así, sólo el crecimiento de aquellos microorganismos capaces de soportar las condiciones características del producto: baja humedad, poca agua disponible y elevada cantidad de sal.

Conforme ocurre la maduración, la cantidad de agua disponible en el queso para que sucedan las reacciones (a_w), va disminuyendo, y por consiguiente en el queso (en particular éste, el cual tiene un elevado contenido de sal) ocasiona que se vayan concentrando los demás componentes, y más aún la cantidad de sal, limitando así el crecimiento microbiano al darse las condiciones en las que sólo aquellos microorganismos halotolerantes, podrán sobrevivir en el medio. En quesos que han sido madurados por períodos largos, hay una disminución de la carga microbiana porque al incrementarse el contenido de sal presente, aumenta la presión osmótica de la fase acuosa del mismo, tal efecto causa la muerte de los microorganismos o disminución de su crecimiento a razón de la deshidratación celular.

En la Tabla 9.2.1, también puede apreciarse que la acidez es un parámetro que se relaciona directamente con el tiempo de maduración y la carga microbiana, pues a medida que ésta transcurre, aumenta el contenido de ácido láctico presente en el queso, debido principalmente a la actividad metabólica de las bacterias acidolácticas presentes, quienes al utilizar la lactosa producen diversos compuestos ácidos.

Dentro del rango de a_w de los quesos Cotija estudiados (0.85-0.94) podrían crecer las bacterias patógenas citadas en la Tabla 9.2.2 (Fox y col. 2000), por lo que es de suma importancia el control de las buenas prácticas higiénicas durante la fabricación del queso Cotija, ya que como no hay un tratamiento térmico que pudiera eliminarlas, podrían crecer y causar diversos problemas de salud.

Tabla 9.2.2 Actividad acuosa (a_w) mínima para el crecimiento de algunas bacterias

a_w mínimo	Patógeno
0.940	<i>Clostridium botulinum</i> A y B, <i>Salmonella</i> spp.
0.936	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
0.935	<i>Escherichia coli</i>
0.930	<i>Bacillus cereus</i>
0.920	<i>Listeria monocytogenes</i>
0.910	<i>Staphylococcus aureus</i> (anaeróbico)
0.860	<i>Staphylococcus aureus</i> (aeróbico)

La Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Quesos frescos, madurados y procesados, establece las siguientes especificaciones microbiológicas:

Tabla 9.2.3 Especificaciones Microbiológicas de la NOM-121-SSA1-1994

Microorganismos límite máximo	Quesos frescos	Quesos madurados	Quesos procesados
Coliformes fecales (NMP/g)	100	50	---
Hongos y levaduras (UFC/g)	500	500+	100+
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	1000	100	<100
<i>Salmonella</i> en 25 g	ausente	ausente	ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g	negativo	negativo	negativo

En esta norma se clasifica al queso Cotija como madurado y prensado de pasta dura. Siguiendo con las especificaciones de esta norma sólo los quesos rendidos cumplen con las especificaciones para Coniformes, y sólo dos de los tres cumplen para hongos y levaduras. Sin embargo, cabe señalar que esta norma se aplica a los quesos elaborados con la cuajada de leche estandarizada y

pasteurizada, y con tratamientos térmicos durante el proceso de elaboración; los quesos en estudio son hechos a base de leche NO pasteurizada y sin ningún tratamiento térmico durante el proceso.

En la Norma Mexicana NMX- F- 092-1970, calidad para quesos procesados, se entiende como queso procesado, aquél que ha derivado de leche previamente pasteurizada, para él, se establecen las siguientes especificaciones microbiológicas:

Tabla 9.2.4 Especificaciones Microbiológicas de la NMX- F- 092-1970

Microorganismos	Límite máximo
Número total de bacterias cuenta estándar en Gelosa-Triptosa-Agar	<100 000 UFC/g
Hongos y levaduras en APD	40 UFC/g

De acuerdo con esta norma, sólo se cumpliría la especificación de la cantidad de mesófilos aerobios, para los quesos rendidos y para la especificación de cantidad de hongos y levaduras; lo anterior no se cumpliría, en ninguna de las seis muestras estudiadas. Cabe mencionar, que los quesos estudiados se elaboraron a partir de leche NO pasteurizada, por lo tanto, la norma no aplicaría específicamente.

De lo anteriormente discutido puede asegurarse, que será necesaria la elaboración de una norma que establezca los parámetros tanto fisicoquímicos, como microbiológicos para quesos elaborados artesanalmente y sobretodo los no elaborados a partir de leche pasteurizada.

3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROTEOLÍTICOS

Las colonias de los microorganismos proteolíticos se diferenciaron de las no proteolíticas, gracias a la formación de un halo translúcido alrededor de ellas, debido a la proteólisis ocurrida en el medio sólido por aquellos microorganismos capaces de degradar las proteínas (caseínas) presentes en el mismo. El medio utilizado para el aislamiento, cuantificación y purificación de los microorganismos proteolíticos, fue el Agar Calcio Caseinato, modificado para el estudio con 0.5% de leche descremada en polvo; Incubación por 48-72 hrs a 37°C.

Sólo se realizó el aislamiento y cuantificación de microorganismos proteolíticos a partir de los quesos que mostraron buena calidad microbiológica (NMP < 4), es decir de los quesos “Rendidos” (de mayor tiempo de maduración).

Observaciones de las cajas con colonias proteolíticas aisladas a partir de las muestras de queso Cotija

En las cajas de menor dilución se observaron incontables colonias pequeñas color crema-blanco, en la caja se presentan algunas zonas de halo, pero no se pueden distinguir las colonias que dieron origen a ellas.

Hubo cajas en las que se formaba un halo alrededor de un conjunto de colonias, otras en las que se observó la formación de un precipitado blanco alrededor del halo de proteólisis y también alrededor de colonias sin halo de proteólisis. Se observaron cajas, principalmente a bajas diluciones, en las que toda la base del agar se encontraba cubierta por precipitado color blanco generado por las colonias presentes.

Las colonias proteolíticas que se aislaron mejor, es decir, las separadas de las colonias que no presentaban tal actividad enzimática, y con mayor actividad proteolítica, se observaron en las cajas de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Hasta este momento del proyecto, se supuso que la mayoría de estas colonias aisladas podrían ser bacterias, puesto que se observó en las cuentas

generales, que éstas predominaban sobre las levaduras, suposición comprobada al momento de observación al microscopio.

Descripción de algunas colonias proteolíticas aisladas, incubación 72 hrs a 37°C:

- Colonias blanquecinas de tamaño aprox. 2 mm diam., con halo de aprox. 7mm de radio.
- Colonia color crema, no circular, con borde irregular, y halo de aprox. 7 mm radio.
- Colonia color blanco, aprox. 1mm diam. y halo aprox. 7 mm de radio.
- Colonia circular, color crema, plana, diam aprox. 8 mm, halo aprox.6mm de radio.
- Colonia circular, color crema, borde irregular, diam. 9 mm, halo aprox. 7 mm radio.
- Colonia circular, color amarillo, cremosa, cóncava, diam aprox. 2 mm, halo aprox. 2mm de radio.
- Colonia circular, color blanco, plana, cremosa, diam aprox. 7mm, halo aprox. 8 mm radio.
- Colonias circulares puntiformes color crema-amarillento, diam aprox. 3 mm, halo aprox. 1mm radio.

Tabla 9.3.1 Resultados globales de la cuantificación de microorganismos proteolíticos

# Mtra.	Clave	# colonias aisladas	# colonias seleccionadas
4j	Q	25	5
5M	P	41	5
6M	TM	24	6

Se lograron aislar un total de 90 colonias proteolíticas a partir de las tres muestras de queso Cotija Rendidos (≥ 6 meses de maduración). De dichas colonias, se seleccionaron 16 (Tabla 9.3.1), aquéllas cuya morfología colonial las mostraba “diferentes”; éstas después de ser purificadas mostraron la mayor actividad proteolítica con respecto al total de colonias aisladas (Figura 9.3.1), actividad evidenciada en el agar calcio caseinato con 0.5% leche descremada en polvo.

Figura 9.3.1 Imágenes de las colonias proteolíticas aisladas de quesos rendidos

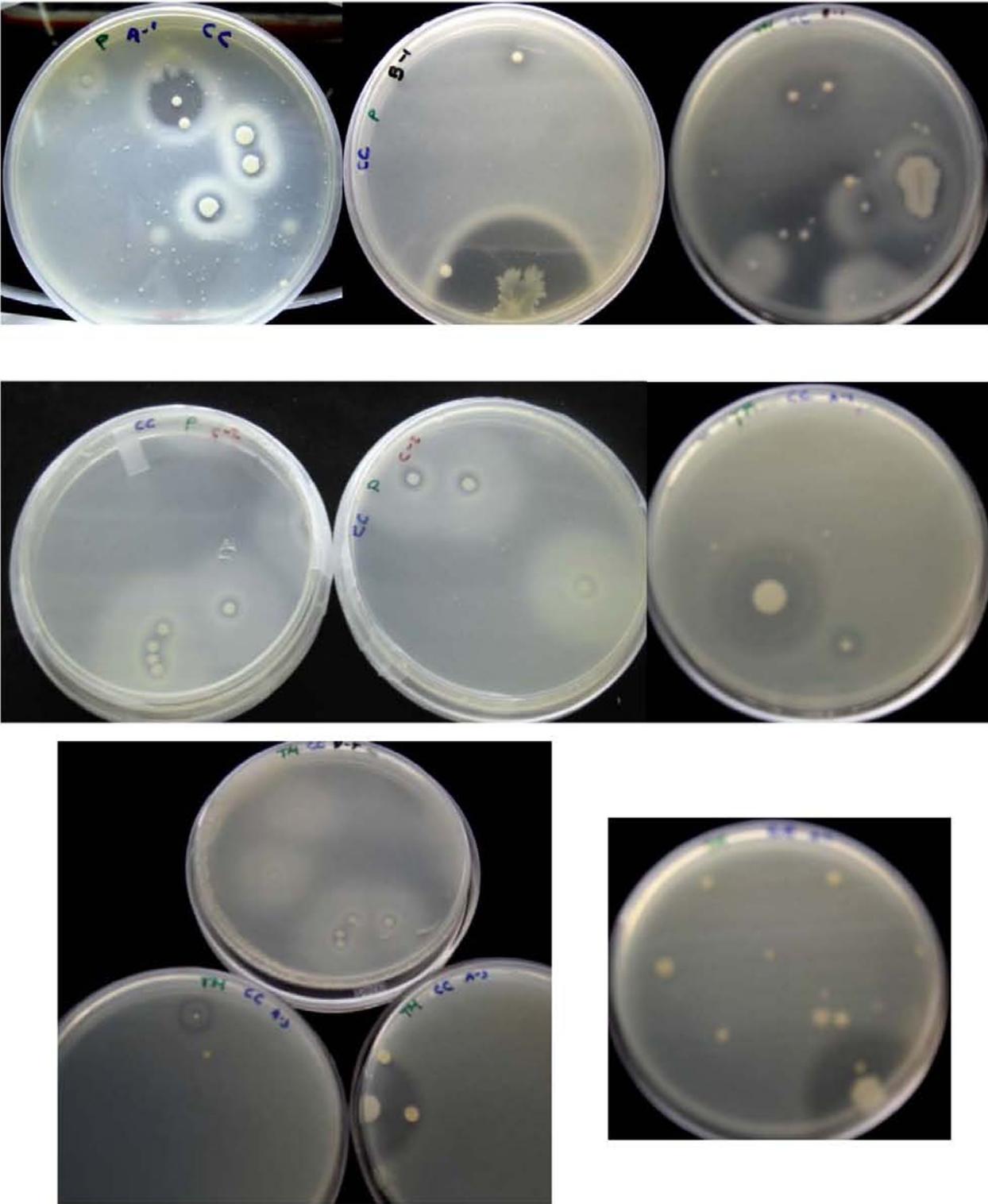


Tabla 9.3.2 Características de las colonias proteolíticas aisladas y purificadas a partir de los quesos Cotija Rendidos

<i>Mtra.</i>	<i>Clave Col</i>	<i>Dil/ Caja</i>	<i>Tamaño colonia diam/r Halo</i> <i>4 dias a 30°C</i>	<i>Morfología colonial forma, textura y color</i>	<i>Morfología/ Gram/ catalasa</i>
4_J Q	Q1	A ⁻² / ₁	11.3mm/1.4cm	Irregular, plana, crema	Bacilo corto + / +
	Q2	A ⁻² / ₁	6mm/1.2cm	Circular, cremosa, blanca	Coco + / +
	Q3	A ⁻³ / ₁	10mm/1.1cm	Circular, cremosa, blanca	Coco + / +
	Q4	B ⁻³ / ₃	20.5mm/2.3cm	Irregular, cremosa, crema	diplococo + / +
	Q25	B ⁻³ / ₂	5mm/8mm	Circular, cremosa, amarilla	Bacilo corto + / +
5_M P	P6	B ⁻¹ / ₃	11mm/5cm	Circular, xc cremosa, crema	Bacilo corto + / +
	P24	A ⁻² / ₁	5mm/Indef.	Ondulada-extendida, cremosa	Coco cadena + / -
	P18	A ⁻¹ / ₂	1.5mm/1mm	Puntiforme, cremosa, blanca	Coco + / -
	P22	A ⁻¹ / ₂	1.5mm/1mm	Puntiforme, cremosa, blanca	Coco + / -
	P25	A ⁻¹ / ₁	1.5mm/1mm	Puntiforme, cremosa, blanca	Coco + / -
6_M TM	T10	A ⁻² / ₂	9mm/2.5cm	Circular, cremosa, crema	Bacilo largo cad. + / +
	T11	A ⁻² / ₁	9mm/2cm	Circular, cremosa, crema	Bacilo largo cad. + / +
	T18	A ⁻³ / ₂	7mm/2.5cm	Circular, cremosa, crema	Bacilo largo cad. + / +
	T6	B ⁻¹ / ₁	1.5mm/1.5mm	Irregular, plana, translúcida	bacilo corto + / +
	T7	B ⁻¹ / ₁	2mm/2mm	Puntiforme, cremosa, blanca	Coco + / -
	T21	B ⁻⁵ / ₁	1.5mm/1mm	Puntiforme, cremosa, blanca	Coco + / -

En la Tabla 9.3.2 se aprecia la variedad en cuanto a morfología colonial (Figuras 9.3.2 y 9.3.3) y microscópica de las bacterias aisladas, seleccionadas y purificadas. La prueba de catalasa se realizó para tener una idea de cuáles de éstas pudieran ser bacterias acidolácticas (BAL), pues debido a la naturaleza de la muestra es de suponerse que se encontrarían presentes. De las 16 colonias seleccionadas, 6 de éstas podrían ser BAL (bacterias ácido lácticas) por ser Gram positivo y catalasa negativo.

Figura 9.3.2 Imágenes de las colonias proteolíticas purificadas de las Muestras 4 y 5

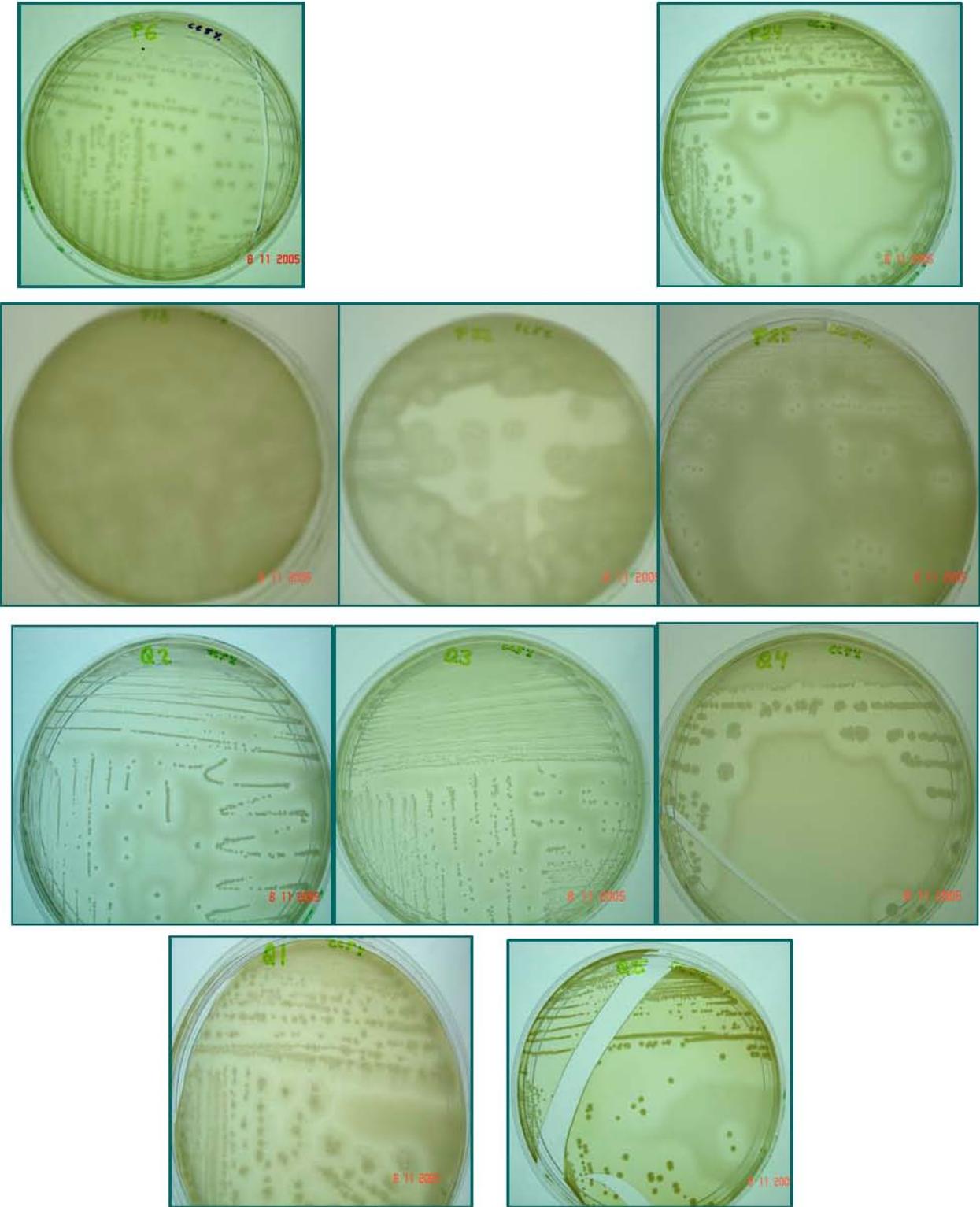
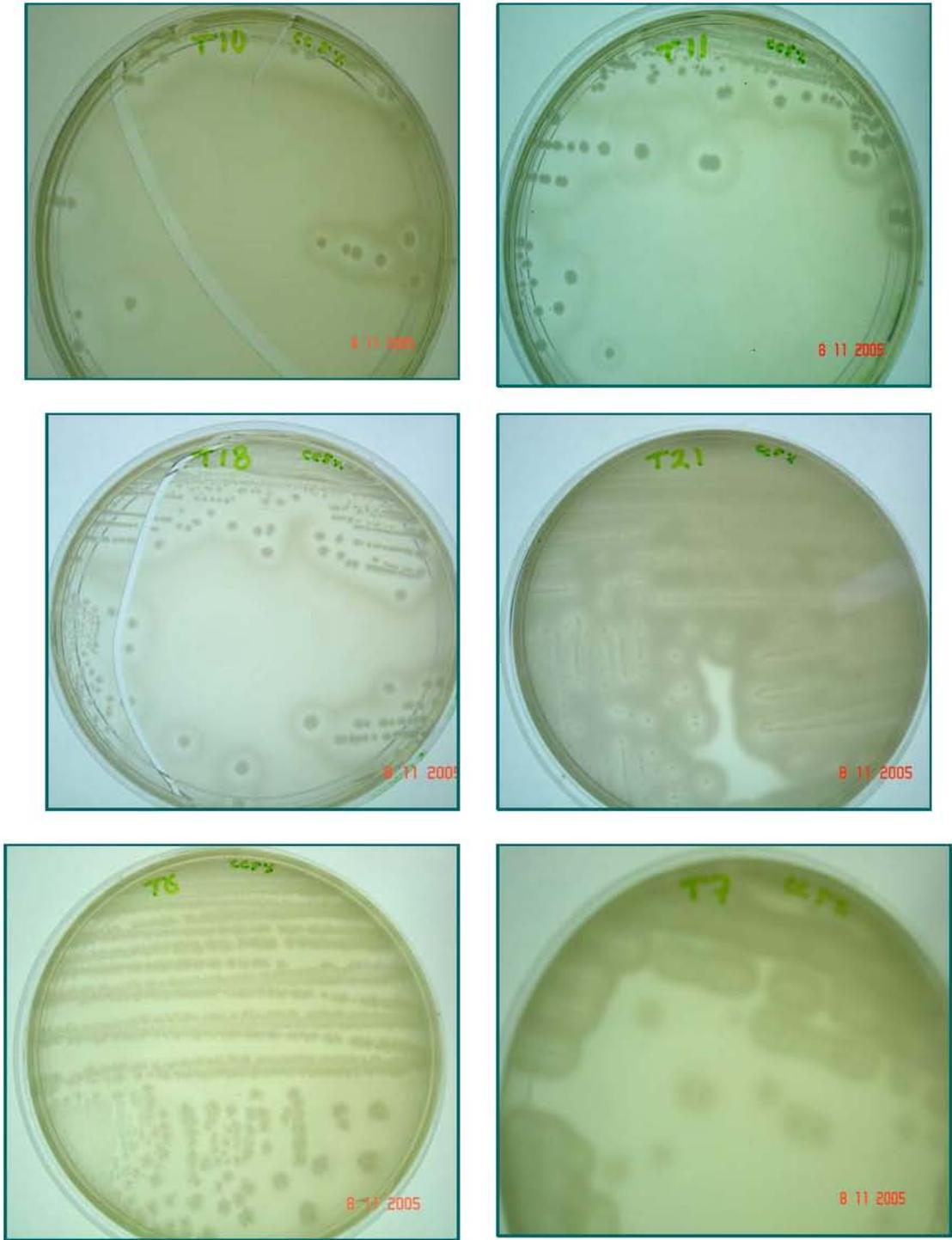


Figura 9.3.3 Imágenes de las colonias proteolíticas purificadas de la Muestra 6

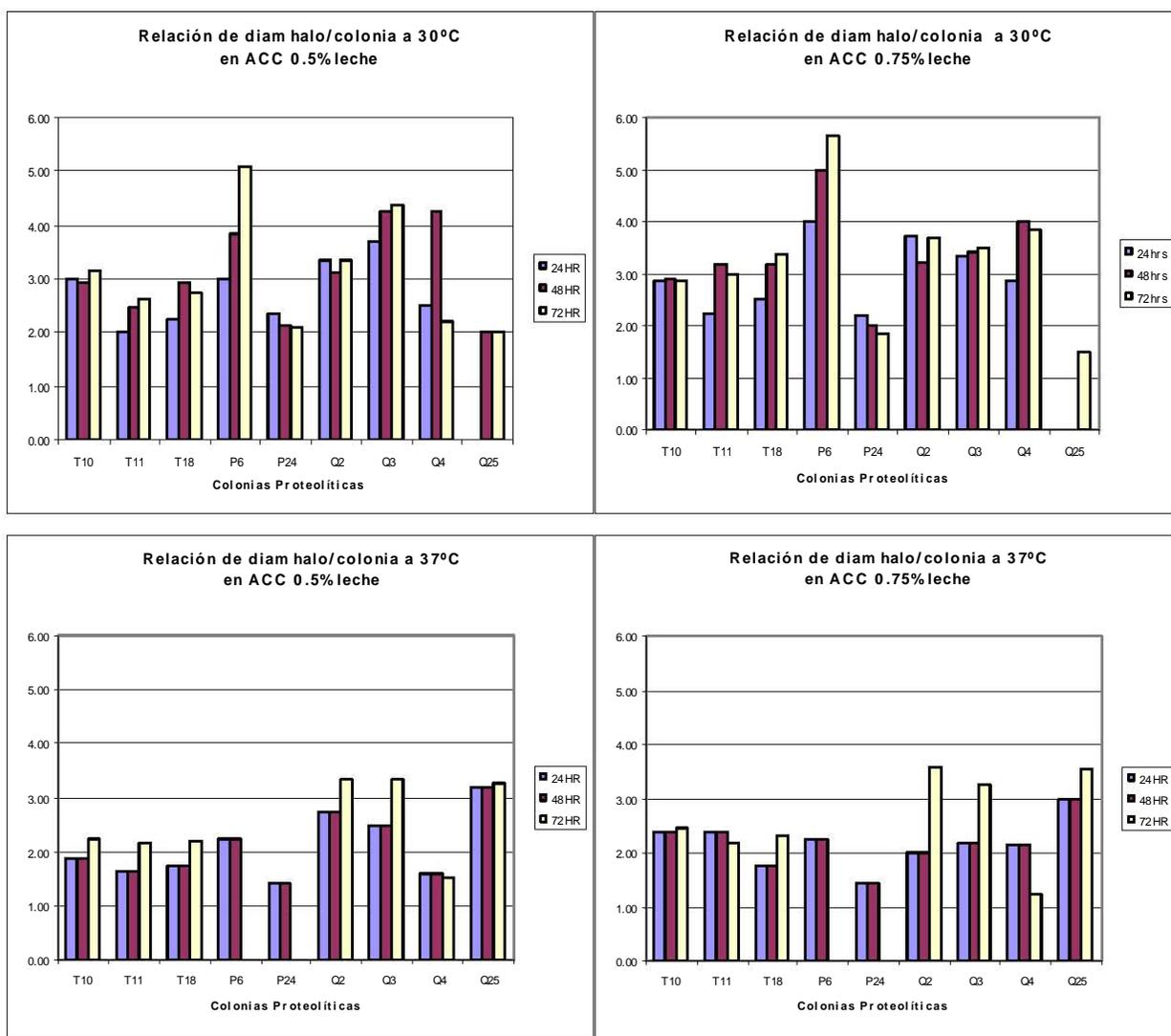


4. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN AGAR-CALCIO CASEINATO

Tabla 9.4.1 Relación de diámetro del halo y colonia ($\varnothing halo/\varnothing col$) a las diferentes condiciones de incubación

COL	% leche	30 °C			37 °C		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
T10	0.5	3.00	2.91	3.14	1.87	1.87	2.23
	0.75	2.86	2.91	2.88	2.40	2.40	2.45
T11	0.5	2.00	2.46	2.63	1.63	1.63	2.15
	0.75	2.25	3.17	3.00	2.40	2.40	2.17
T18	0.5	2.22	2.92	2.75	1.73	1.73	2.21
	0.75	2.50	3.17	3.38	1.75	1.75	2.33
P6	0.5	3.00	3.83	5.08	2.22	2.22	—
	0.75	4.00	5.00	5.67	2.25	2.25	—
P24	0.5	2.36	2.13	2.08	1.42	1.42	—
	0.75	2.20	2.00	1.85	1.45	1.45	—
Q2	0.5	3.33	3.11	3.33	2.75	2.75	3.33
	0.75	3.71	3.20	3.69	2.00	2.00	3.57
Q3	0.5	3.67	4.25	4.36	2.50	2.50	3.33
	0.75	3.33	3.40	3.50	2.17	2.17	3.25
Q4	0.5	2.50	4.25	2.20	1.60	1.60	1.54
	0.75	2.86	4.00	3.83	2.14	2.14	1.24
Q25	0.5	—	2.00	2.00	3.20	3.20	3.27
	0.75	—	—	1.50	3.00	3.00	3.56

Nota: las mediciones de las bacterias P6 y P24 no se realizaron a las 72 hrs. debido a que a las 48 hrs. ya había mucho desarrollo bacteriano en la caja petri y si se continuaba la incubación, podían unirse las colonias y no se sabría la delimitación de las mismas; la medición de la relación de la colonia Q25 en la incubación a 30°C a las 24 y 48 hrs. no se reporta porque no se observó un halo definido. No se realizaron las mediciones de las colonias Q1, P18, P22, P25, T6, T7 y T21, porque no se observó un halo bien definido a estos tiempos de incubación.



Gráfica 9.4.1 Gráficos de barras de la Relación \varnothing halo/ \varnothing col a las diferentes condiciones de incubación

En las gráficas se observa el comportamiento de la actividad proteolítica (en agar calcio caseinato) de las colonias seleccionadas, comparadas entre las mismas mediante la relación de diámetro del halo/colonia, la cual nos da una idea de su actividad a diferentes temperaturas y concentración de sustrato.

En general, se observan valores mayores en la incubación a 30° C comparados con los de la incubación a 37°C, con excepción de la colonia Q25, ya que ésta mostró mayor actividad a 37° C (Gráfica 9.4.1 y Figuras 9.4.1 y 9.4.2); lo anterior se explica debido a que es una temperatura más cercana a la cual los microorganismos están habituados, pues durante la maduración del queso se encuentran a temperaturas entre 25-35° C.

Tabla 9.4.2 Condiciones a las que se observó la mayor actividad proteolítica

<i>Colonia</i>	<i>Temperatura / % leche en ACC</i>
T10	30 ° C / 0.5%
T11	30 ° C / 0.75%
T18	30 ° C / 0.75%
P6	30 ° C / 0.75%
P24	30 ° C / 0.5%
Q2	30 ° C / 0.75%
Q3	30 ° C / 0.5%
Q4	30 ° C / 0.5%
Q25	37 ° C / 0.75%

El comportamiento respecto al tiempo y concentración de leche varió indistintamente, las colonias que mostraron mejor actividad a **30° C/ 0.5%leche**, fueron T10, P24, Q3 y Q4; a **30° C/0.75% leche**, las colonias T11, T18, P6 y Q2; y a **37° C/0.75% leche** la colonia Q25 (Gráfica 9.4.1). La máxima actividad observada fue la de la colonia P6 en incubación a 30°C en ACC con 0.75% leche (Figuras 9.4.1).

Los valores de las mediciones para obtener la relación de diámetro del halo y colonia se pueden observar en el ANEXO 4.

Las colonias mostradas en la Tabla 9.4.2 se seleccionaron para ser identificadas por métodos moleculares debido a que mostraron la mayor actividad proteolítica.

Figura 9.4.1 Imágenes de la Comparación de la Actividad Proteolítica

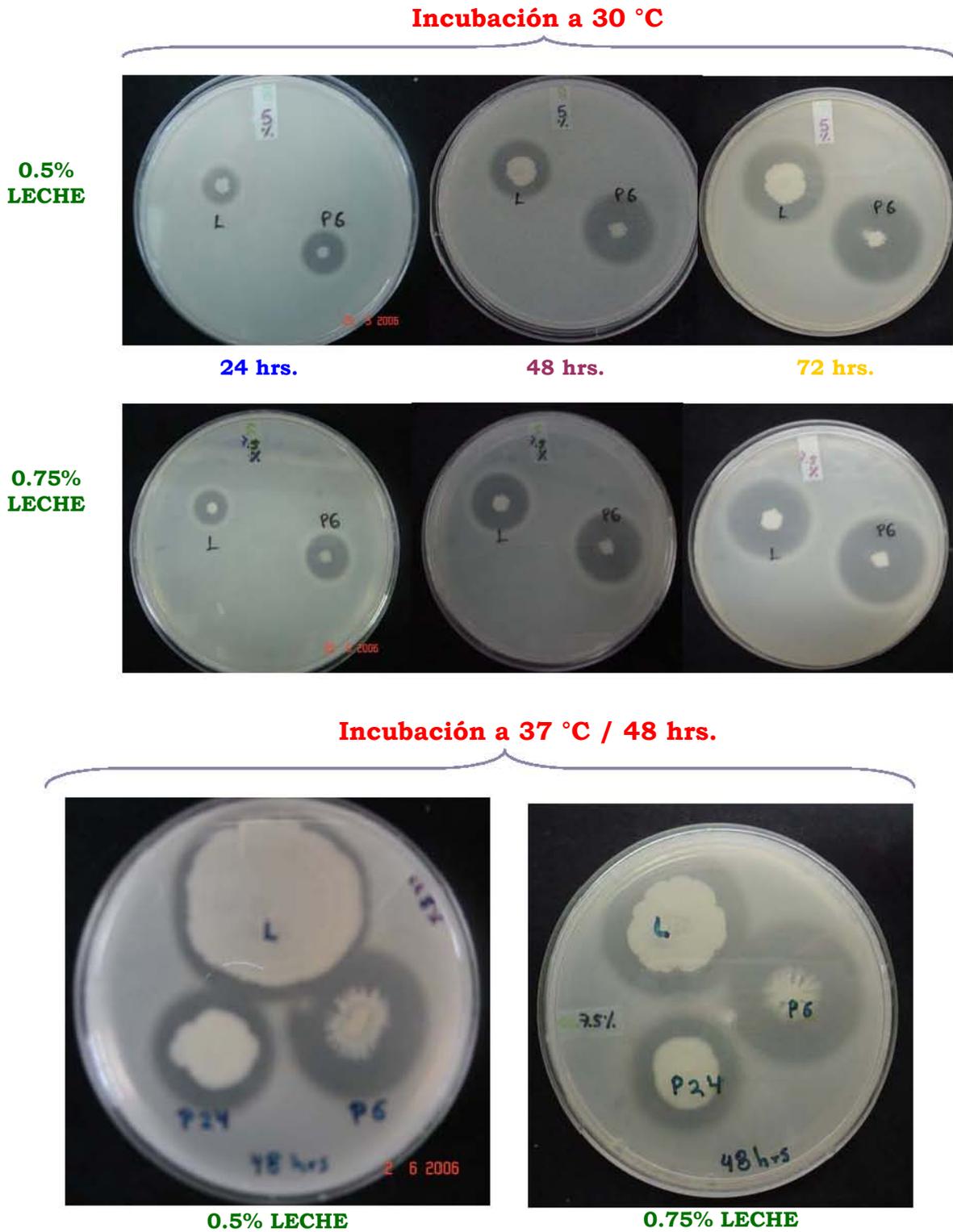


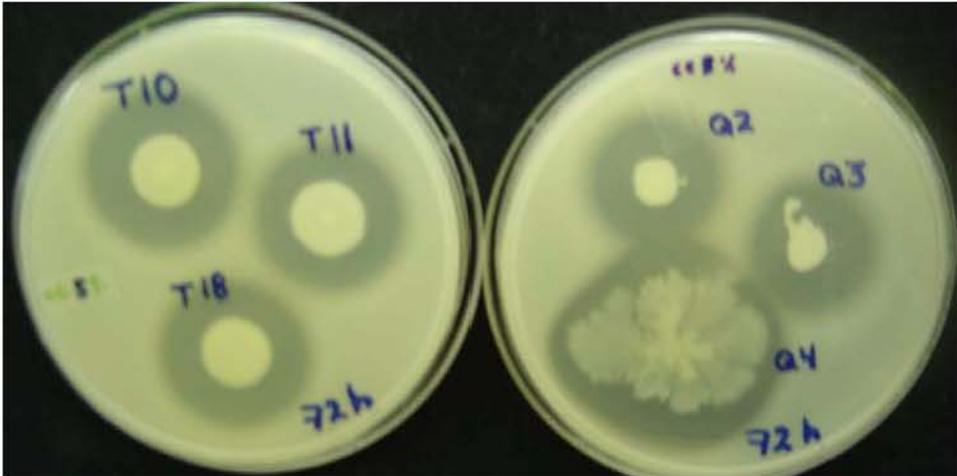
Figura 9.4.2 Imágenes de la Comparación de la Actividad Proteolítica

AGAR CALCIO CASEINATO CON LECHE AL 0.5%

Incubación a 30 °C / 72 hrs.



Incubación a 37 °C / 72 hrs.



5. IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS SELECCIONADAS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

Se extrajo ADN de las colonias aisladas seleccionadas con solución Fenol:Cloroformo:Isoamílico 25:24:1, se verificó su pureza antes de realizar la PCR midiendo la absorbancia y observando el barrido espectral de 200 a 300 nm, antes de amplificar la región V3 del ARNr 16s. Por ARDRA, prueba de la catalasa y observación morfocolonial y microscópica se seleccionaron a las bacterias “diferentes”, cuyos amplicones se secuenciaron (previamente purificados) y compararon con la base de datos BLAST.

EXTRACCIÓN DE ADN

En los geles de la Figura 9.5.1 se distinguen los productos de la extracción de ADN de alto Peso Molecular de las colonias proteolíticas purificadas. En los pozos de carga se observa, en algunos casos, la presencia de proteínas. Las bandas de mayor intensidad son las de ADN cromosomal, de las cuales su intensidad será proporcional a la concentración de ADN obtenido; las bandas que se muestran anchas y con “dedos hacia arriba” son porque el ADN se encuentra muy concentrado.

En la Figura 9.5.1, también se observan bandas inferiores -por debajo de la banda de ADN- que muestran residuos de ARN, y el barrido inferior también, junto con péptidos pequeños; probablemente porque no fue muy eficaz el tratamiento con la RNAsa. En otros geles -no mostrados- se observaron plásmidos entre las bandas que muestran el ADN y el ARN, además se observan algunos plásmidos de alto peso molecular por encima de la banda de ADN.

En el gel A (Figura 9.5.1), se aprecian las preparaciones de ADN de las colonias Gram + y catalasa, las cuales crecieron en caldo APT: T7, T21, P18, P22, P24 Y P25, de éstas se destaca la P24 por mostrar mayor actividad proteolítica con respecto a las otras. En los geles B y C (Figura 9.5.1) se observa el ADN de las colonias catalasa +, crecidas en caldo nutritivo, en estos geles se destacan los productos de las colonias con mayor actividad proteolítica que mostraron una

calidad aceptable, es decir aquellos en los que la cantidad de proteína fue despreciable y donde la integridad del ADN fue la adecuada.

En varias ocasiones se tuvo que realizar un triplicado de la extracción pues los productos no mostraban una banda intensa y presentaban un barrido muy largo hacia abajo como es el caso de las colonias T10 y T11 en el gel B, para estas colonias también se observó que no cumplían con la relación $A_{260}/A_{280} \text{ nm} > 1.8$, posiblemente porque el ADN se encontraba degradado. En los casos en los que se mostraba la banda de ADN demasiado intensa, gruesa y con algo de barrido, como el caso de las colonias P6, Q2 y Q3 del gel B, se realizó una tercera y cuarta extracción -según lo necesario para eliminar mayor cantidad de proteínas- como fue el caso del gel C, en él se muestran los productos nuevamente extraídos.

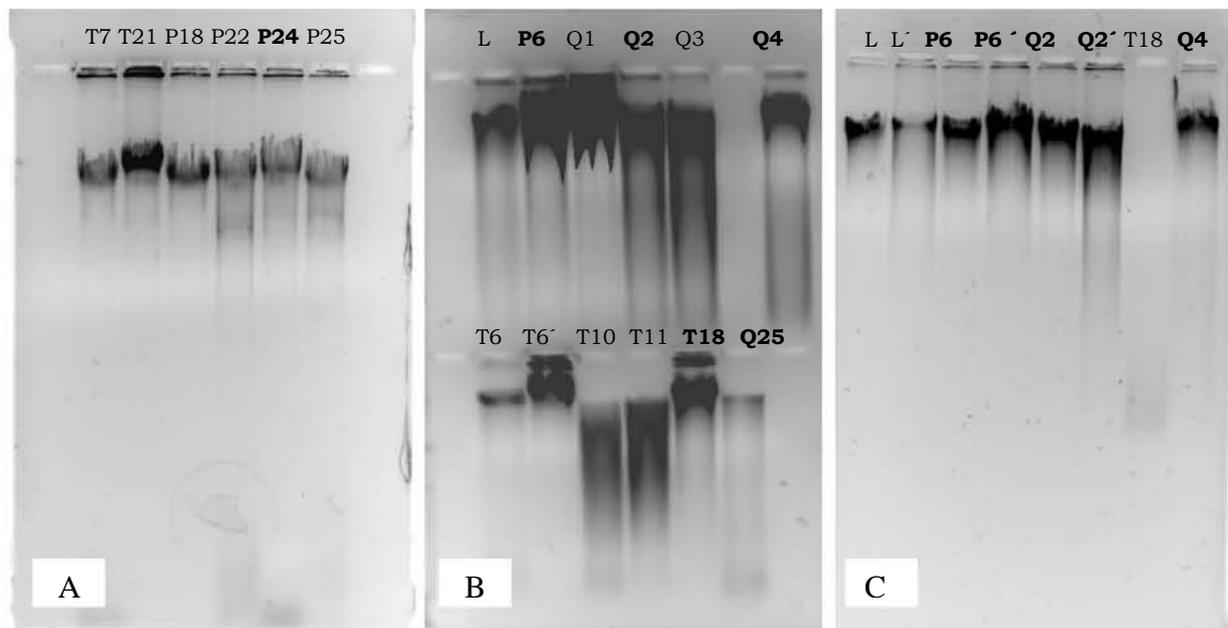


Figura 9.5.1 Geles de agarosa al 1.5% con algunos de los productos de las extracciones de ADN

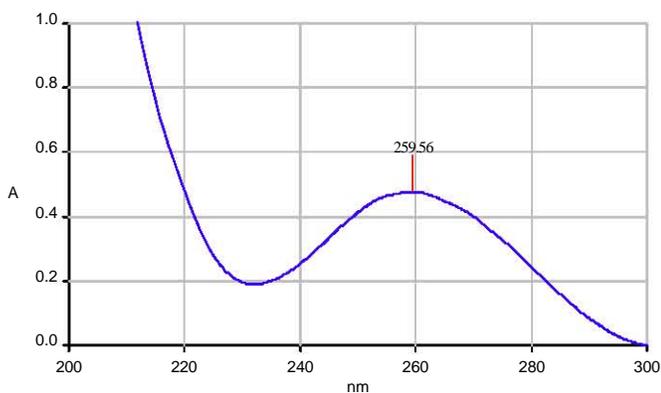
CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Los resultados de las mediciones de absorbancias a 260 y 280 nm se muestran en la Tabla 9.5.1, así como su relación para verificar su pureza, sólo se incluyen los resultados que fueron aceptables, es decir, aquéllos en donde la relación A_{260}/A_{280} fue >1.8 . La calidad del ADN extraído fue muy buena, pues en la mayoría de los productos se obtuvo una relación $A_{260}/A_{280} >1.9$.

En todos los casos se obtuvo la cantidad necesaria para la reacción de PCR, con excepción de las muestras Q4,¹ y T7,² en ellas se obtuvieron valores de 25 y 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (o $\text{ng}/\mu\text{l}$) respectivamente, cantidad insuficiente para la amplificación.

En el Gráfico 9.5.1 se muestran dos ejemplos de los barridos espectrales que presentaron los productos de ADN extraídos, el pico máximo a 260 nm, es característico del ADN puro.

Colonia: P6'
 Dilución: 15/100
 $A_{260}/A_{280} = 1.94$
 Máx 259.56



Colonia: Q2'
 Dilución: 15/100
 $A_{260}/A_{280} = 1.91$
 Max 258.50

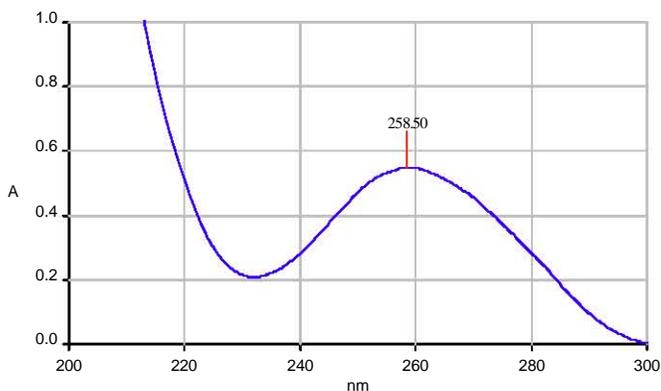


Gráfico 9.5.1 Barridos del espectro de 200 a 300 nm de los productos de ADN extraídos y observados en el gel C de agarosa al 1.5% de la Figura 9.5.1

Tabla 9.5.1 Mediciones de absorbancias a 260 y 280 nm, y su relación para calcular la concentración del ADN y comprobar su pureza

Muestra	Dilución	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/A280}	µgADN/mL
Q1, ¹	1 : 100	0.308	0.141	2.190	1540.5
Q1, ²	1 : 100	0.360	0.199	1.809	1799.0
Q2, ¹	10 : 105	0.547	0.286	1.912	287.3
Q2, ²	10 : 105	0.692	0.362	1.914	363.3
Q3, ¹	6 : 65	0.615	0.284	2.166	333.3
Q3, ²	6 : 65	0.370	0.191	1.933	200.3
Q3, ³	6 : 65	0.424	0.199	2.125	229.5
Q4, ¹	32 : 95	0.168	0.080	2.083	24.9
Q4, ²	7 : 70	0.372	0.186	1.998	186.0
Q4, ³	10 : 73	0.599	0.302	1.983	218.8
Q25, ¹	1 : 100	0.345	0.180	1.915	1725.0
Q25, ²	11 : 70	0.391	0.180	2.175	124.5
P6, ¹	10 : 105	0.244	0.119	2.050	128.0
P6, ²	10 : 105	0.474	0.244	1.941	248.7
P18	1 : 100	0.669	0.323	2.073	3344.5
P22	1 : 100	0.652	0.322	2.027	3260.0
P24, ¹	1 : 100	0.762	0.370	2.063	3810.5
P24, ²	5 : 69	0.385	0.198	1.950	265.7
P25	1 : 100	0.631	0.309	2.044	3153.0
T6, ¹	1 : 100	0.394	0.203	1.942	1968.5
T6, ²	1 : 100	0.186	0.100	1.859	927.5
T7, ¹	1 : 100	0.657	0.325	2.020	3286.5
T7, ²	22 : 85	0.154	0.062	2.492	29.8
T10, ¹	1 : 100	0.268	0.138	1.941	1338.5
T10, ²	4 : 67	0.595	0.279	2.132	498.1
T11, ¹	1 : 100	0.542	0.281	1.933	2710.5
T11, ²	2 : 65	0.519	0.279	1.862	843.4
T18, ¹	1 : 100	0.148	0.082	1.811	738.0
T18, ²	6 : 69	0.430	0.219	1.964	247.0
T21	1 : 100	0.748	0.370	2.020	3739.5

En este momento se decidió proseguir el trabajo experimental con las colonias que presentaron la mayor actividad proteolítica: Q2, Q3, Q4, Q25, P6, P24, T10, T11 y T18. Cabe mencionar que las bacterias seleccionadas son Gram y catalasa positivo, con excepción de la colonia P24 que es Gram positivo y catalasa negativo (probable Bacteria Ácido Láctica).

REACCIÓN DE PCR

En el ANEXO 5 se muestra la tabla con los cálculos realizados para obtener 50 µl de extracto de ADN a una concentración de 10ngADN/µL (10 µgADN/mL) para realizar la reacción de PCR. En el caso de las muestras cuya concentración era más elevada, se realizó una dilución 1:10 para poder tomar una alícuota más apropiada.

A continuación, en la Figura 9.5.2, se presenta uno de los geles con productos de PCR de las bacterias proteolíticas. De acuerdo al marcador de Peso Molecular de 50 pares de bases (pb), se concluye que los productos de amplificación de la reacción de PCR, son de aproximadamente 200pb.

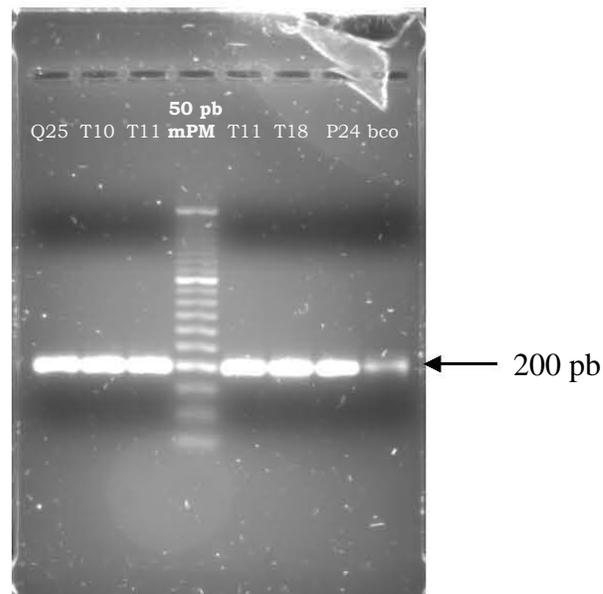


Figura 9.5.2 Gel de agarosa al 2% que muestra los amplicones de la reacción de PCR

En cuanto se obtuvieron los amplicones, se procedió a realizar el análisis de la digestión de éstos, con enzimas de restricción, con el fin de obtener diferentes patrones de bandeo según los fragmentos producidos para cada microorganismo que fuese diferente.

DIGESTIÓN DEL PRODUCTO DE PCR CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Tabla 9.5.2 Resultados del análisis de restricción

<i>Enzima</i>	<i>Sitio de corte</i>	<i>Colonia que produjo fragmento</i>	<i>Tamaño de los fragmentos generados (pb)</i>
HinfI	G ↓ ANTC	---	---
BglII	GCCNNNN ↓ NGGC	---	---
SmaI	CCC ↓ GGG	---	---
PstI	CTGCA ↓ G	Q4	90 y 200
BsuRI	GG ↓ CC	Q4	140 y 200
MboI	↓ GATC	Q2, Q3, T18	85 y 115
		P6, P24,	90 y 110
		Q25	175 y 200

Donde N = G, A, T o C.

En la Tabla 9.5.2, se muestran los resultados generales, de los cuales se puede decir que las enzimas HindI, BglII y SmaI, no cortaron los amplicones de ninguna de las bacterias; las enzimas PstI y BsuRI cortaron el amplicon de la colonia Q4 (diplococo Gram +, catalasa +) produciendo fragmentos de alrededor de los 90 y 140 pb respectivamente para cada enzima a parte del fragmento de 200 pb que se observa sin el tratamiento -en ambos casos-, posiblemente porque la digestión fue sólo parcial.

Para la última enzima probada (MbOI) se produjeron : dos fragmentos de aprox. 85 y 115 pb del ADN de las colonias Q2 y Q3 (cocos Gram +, catalasa +); dos fragmentos de aprox. 85 y 115 pb del ADN de la colonia T18 (bacilo largo en cadena Gram +, catalasa +); dos fragmentos de aprox. 90 y 110 pb del ADN de las colonias P6 (bacilo corto Gram +, catalasa +) y P24 (coco en cadena Gram +, catalasa-); y dos fragmentos de aprox. 175 y 200 pb del ADN de la colonia Q25 (bacilo corto Gram +, catalasa +), lo que indica una digestión parcial. El ADN de las colonias T10 y T11 no fue cortado con ninguna de las enzimas probadas.

El ARDRA permitió diferenciar las colonias T10 y T11 de la T18 que hasta este momento habían mostrado las mismas características, ya que la colonia T18, a diferencia de las otras (T10 y T11), sí produjo fragmentos con la digestión de enzimas de restricción. Las colonias Q2 y Q3 que también habían mostrado las mismas características, no se pudieron diferenciar por medio de la digestión, pues presentaron el mismo patrón de bandeo, por tal motivo se intuye que se trata del mismo microorganismo.

En la Figura 9.5.3 se muestran algunos de los geles con los fragmentos del análisis de restricción, aquellos en los que sí se observó un patrón de bandeo diferente.

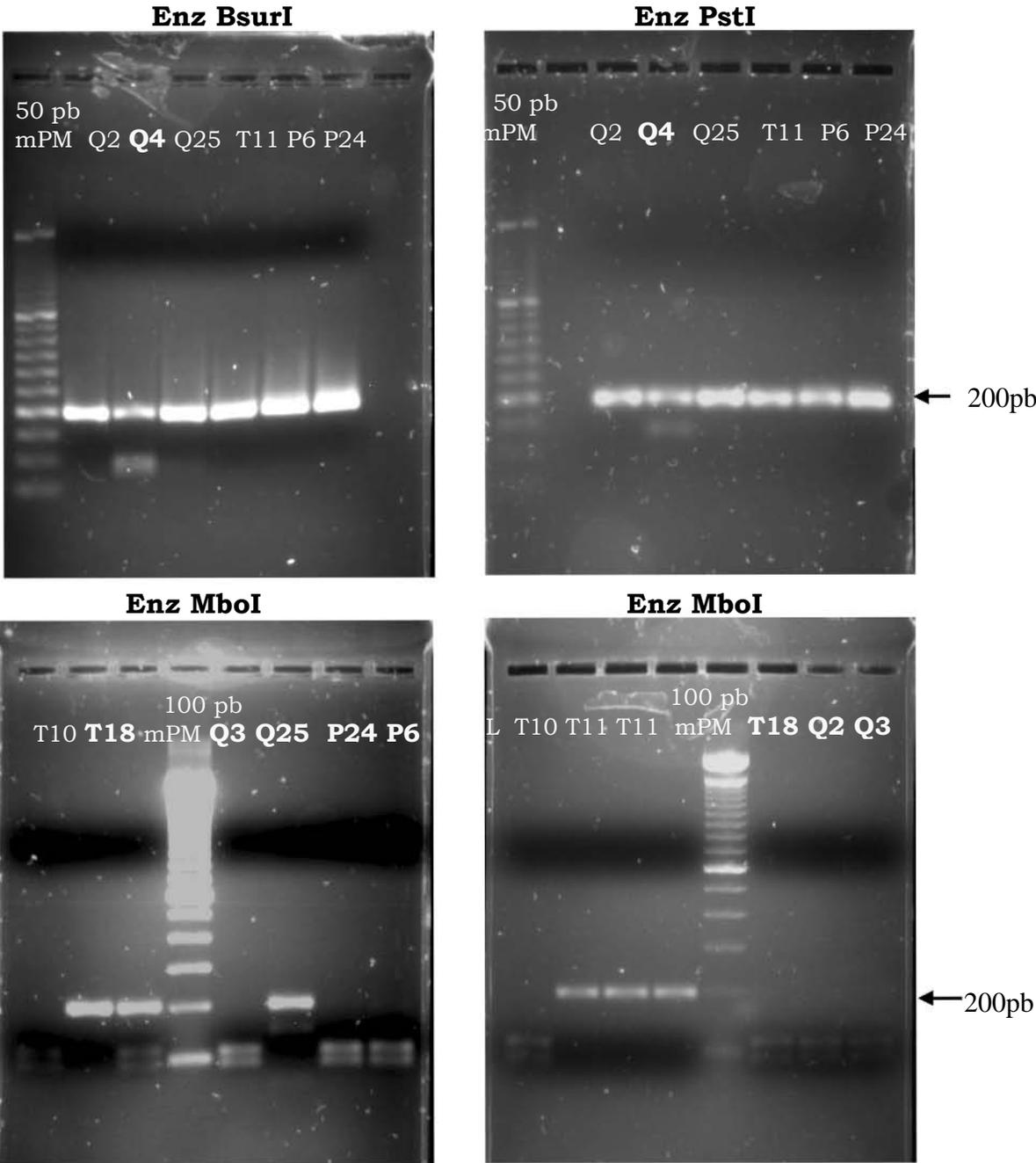


Figura 9.5.3 Geles de agarosa al 2% con los fragmentos de la digestión con enzimas de restricción

Finalmente se compararon los resultados de las características morfológicas y microscópicas, Gram, prueba de catalasa y resultados del ARDR, para seleccionar aquellas bacterias “diferentes” cuyos amplicones purificados se mandaron a secuenciar para conocer su identidad al compararlos con la base de datos (BLAST).

Tabla 9.5.3 Características usadas como criterio de selección para secuenciación

<i>Clave</i> <i>Col</i>	<i>Morfología colonial</i> <i>forma, textura y color</i>	<i>Morfología</i> <i>Gram/ catalasa</i>	<i>Enzima con</i> <i>que cortó</i>	<i>Tamaño del</i> <i>Fragmento (pb)</i>
Q2	Circular, cremosa, blanca	Coco + / +	MboI	85 y 115
Q3	Circular, cremosa, blanca	Coco + / +	MboI	85 y 115
Q4	Irregular, cremosa, crema	diplococo + / +	PstI	90 y 200
			BsuRI	140 y 200
Q25	Circular, cremosa, amarilla	Bacilo corto + / +	MboI	175 y 200
P6	Circular, cremosa, crema	Bacilo corto + / +	MboI	90 y 110
P24	Irregular-extendida, cremosa	Coco cadena + / -	MboI	90 y 110
T10	Circular, cremosa, crema	Bacilo largo cad. + / +	---	---
T11	Circular, cremosa, crema	Bacilo largo cad. + / +	---	---
T18	Circular, cremosa, crema	Bacilo largo cad. + / +	MboI	85 y 115

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 9.5.3, se puede suponer que las bacterias Q2 y Q3, podrían ser del mismo microorganismo, ya que muestran características morfológicas y microscópicas iguales: colonias circulares, cremosas y blancas, cocos Gram +, catalasa + y produjeron los mismos fragmentos con la enzima de restricción MboI; al igual que las bacterias T10 y T11, que poseen las mismas características: colonias circulares, cremosas, color crema, bacilos largos en cadena Gram +, catalasa +, y cuyos amplicones no cortaron con ninguna de las enzimas de restricción probadas. Las otras cinco bacterias (Q4, Q25, P6, P24 y

T18) poseen características que difieren entre sí y se asumió que fuese debido a que son diferentes microorganismos.

Comparando los resultados del cuadro de las características de las bacterias seleccionadas se decidió purificar los productos de PCR de las colonias Q2, Q4, Q25, P6, P24, T10 y T18, para mandar a secuenciar.

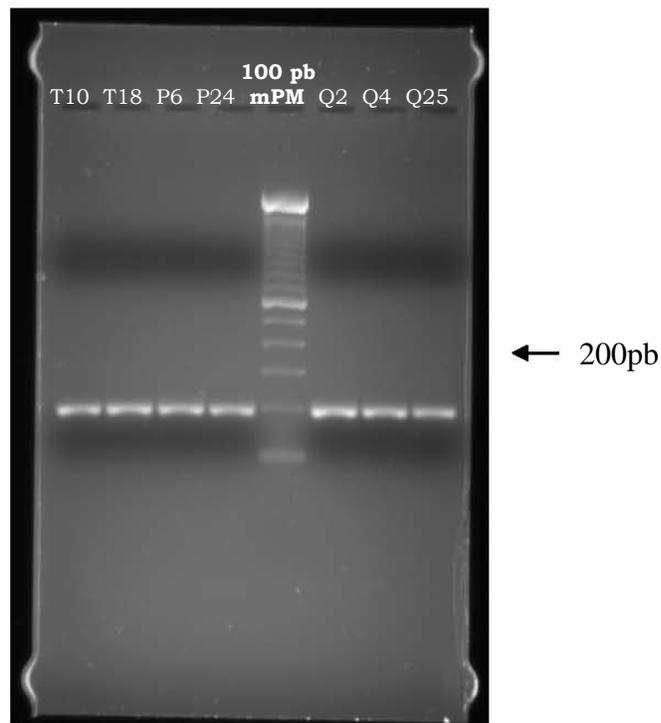


Figura 9.5.4 Gel de agarosa al 2% que muestra los amplicones purificados

SECUENCIACIÓN DEL ADN

La secuenciación se realizó en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se utilizó el primer 338f para las secuencias obtenidas de la región 16s ADNr. A continuación se muestran las bases nucleotídicas obtenidas para cada colonia (Tabla 9.5.4). Las secuencias de nucleótidos obtenidas por Applied Biosystems están incluidas en el ANEXO 6.

Tabla 9.5.4 Secuencias obtenidas para las colonias proteolíticas seleccionadas

Col	Secuencia
Q2	CTAGGATCTTCCGCATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA GTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAA TTTGTTAGTAACTGAACAAGTCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
Q4	TAGGATCTTTCCGCATCGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTG AGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAA ATTTGTTAGTAACTGAACAAGTCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC GGCTAACTACGTGCCAGCTGCCGCGGTAATA
Q25	CCTAGGATCTTCCGCATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG AGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAA GTATGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
P6	TAGGATCTTCCGCATGGACGAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT GATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTA CCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
P24	TAGGATCTTCCGCATGGACGAAAGTCTGACCGATCCAACGCCGCGTGA GTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAG GACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCAC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
T10	CTAGGATCTTCCGCATGGACGAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAG TGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT ACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
T18	CTAGGATCTTCCGCATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA GTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG TACCGTTTGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA

Las secuencias se compararon con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante el BLAST para nucleótidos. Para completar la información se buscó en la literatura acerca de los microorganismos identificados. A continuación se resumen los resultados encontrados para cada bacteria identificada, los valores de expectativa (E) fueron bajos y los porcentajes de identidad mayores al 97%.

BACTERIAS PROTEOLÍTICAS IDENTIFICADAS

Tabla 9.5.5 Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia Q2

Descripción	Valor E	Ident. max
<i>Staphylococcus sciuri</i> cepa BSD 14	6e-82	99%
<i>Staphylococcus</i> sp. HPC954	6e-82	99%
<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i> cepa GTC 844	6e-82	99%
<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i> cepa GTC 1227	6e-82	99%
<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> cepa DSM 20345T	6e-82	99%
<i>Staphylococcus xylosus</i>	6e-82	99%
Clona bacteriana del rumen no cultivable BRC47	6e-82	99%
Bacteria no cultivable OC92-1	2e-81	99%
<i>Staphylococcus lentus</i> cepa CICCHLJ Q29	3e-80	98%
<i>Staphylococcus fleurettii</i> cepa GTC 1999	3e-80	98%
Bacteria del suelo LB-P1-47	3e-80	98%
Clona bacteriana no cultivable aab28h08	3e-80	98%

La colonia Q2 se identificó con un 99% de identidad como cepa del género *Staphylococcus*, los resultados demuestran que podría ser la especie *S. sciuri*, probablemente alguna de las subespecies *sciuri*, *rodentium* o *carnaticus*, aunque también podría ser *Staphylococcus xylosus*. Al mismo porcentaje de identidad se identifica como clona bacteriana del rumen y en otro caso como bacteria no cultivable. Con un menor porcentaje de identificación (98%), la colonia podría ser *S. lentus* o *S. fleurettii*; y en otros casos se ha identificado como bacteria del suelo.

Tabla 9.5.6 Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia Q4

Descripción	Valor E	Ident. max
<i>Staphylococcus sciuri</i> cepa BSD	2e-77	97%
<i>Staphylococcus</i> sp. HPC954	2e-77	97%
Clona bacteriana del rumen no cultivable BRC47	2e-77	97%
<i>Staphylococcus sciuri</i> aislado H93	2e-77	97%
<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i> cepa GTC 844	2e-77	97%
<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> , cepa DSM 20345T	2e-77	97%
<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i> cepa GTC 1227	2e-77	97%
Gen de <i>S. sciuri</i>	2e-77	97%
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2e-77	97%
<i>Staphylococcus fleurettii</i> cepa GTC 1999	7e-76	97%
<i>Staphylococcus lentus</i> cepa CICCHLJ Q29	7e-76	97%
Bacteria del suelo LB-P1-47	7e-76	97%
Clona de bacteria no cultivable aab28h08	7e-76	97%

La colonia Q4 al igual que la colonia Q2, se identificó como cepa del género *Staphylococcus*, sólo que con un porcentaje de identidad menor (97%), los resultados nos dicen que podría ser la especie *S. sciuri*, subespecies *sciuri*, *rodentium* o *carnaticus*, aunque también podría ser *Staphylococcus xylosus*, *S. lentus* o *S. fleurettii*; al mismo porcentaje de identidad se identifica como clona bacteriana del rumen y en otro caso como bacteria no cultivable y bacteria no cultivable del suelo.

Taxonomía (NCBI): Reino Bacteria; Categoría Firmicutes; Clase Bacilli; Orden Bacillales; Familia Staphylococcaceae; Género *Staphylococcus*

Los estafilococos son células esféricas, gram positivas, cuyo diámetro varía de 0.5 a 1.5 µm; en frotis teñidos aparecen en grupos irregulares en forma de racimos. Crecen mejor en condiciones aerobias, pero son anaerobios facultativos; la temperatura de crecimiento es de 30° a 37° C; no son móviles y no forman esporas.

Las especies *Staphylococcus capitis*, *S.warneri*, *S: cohnii*, *S. xylosus* y *S. sciuri* se encuentran como comensales en el hombre, pero rara vez son causa de una enfermedad. El resto de las especies sólo se encuentra en animales. En medios de agar el crecimiento es abundante; las colonias son desde translúcidas a opacas, con algunas variaciones en el perfil y en el margen de la colonia; estas variaciones son útiles para la diferenciación. Algunos estafilococos producen pigmentos carotenoides, formando colonias de color amarillo-dorado, amarillo-limón o cremoso. (Euzéby 2004)

Los estafilococos son relativamente más resistentes al calor y a ciertos desinfectantes que las formas vegetativas de la mayoría de las bacterias patógenas, a diferencia de muchas bacterias crecen a 45°C. La resistencia a la desecación también es notable, pueden permanecer infecciosos en el medio ambiente durante largos períodos. La mayoría de las cepas crecen en presencia de un 10 % de cloruro de sodio (NaCl), algunas crecen incluso en una concentración del 15 %. Esto tiene importancia en la observación de alimentos con sal, porque los estafilococos pueden crecer y formar enterotoxinas en alimentos que contienen cantidades de sal que en otras circunstancias serían suficientes para actuar como conservante. Frecuentemente la tolerancia a la sal proporciona la base para utilizar medios selectivos. Una característica común en todas las bacterias gram positivas, es que éstas también son sensibles a la acción bacteriostática de los colorantes trifenil-metano y son susceptibles a los antibióticos eficaces contra bacterias gram positivas, incluyendo la penicilina y muchos de los antibióticos del amplio espectro. Sin embargo, son propensas a desarrollar cierta resistencia microbiana a las drogas. ¹

Staphylococcus sciuri tiene tres subespecies:

- *Staphylococcus sciuri* subsp. *carnaticus*
- *Staphylococcus sciuri* subsp. *rodentium*
- *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri*

El análisis de las secuencias de ADRr 16S de cepas indica que *S. sciuri* está filogenéticamente cerca de *S. lentus*, *S. pulvereri* y de *S. vitulinus* (Figura 9.5.5). Estas especies constituyen el grupo llamado “*S. sciuri*”. *S. sciuri* es oxidasa positiva al igual que *S. lentus*, *S. fleurettii* y *S. vitulinus*.

¹ Información disponible en línea: <http://html.rincondelvago.com/bacteria-staphilococcus-aureus.html>

Las subespecies de *S. sciuri* presentan frecuentemente dos características fenotípicas particulares: la producción de una “stafilolisina” y la resistencia a la meticilina. Se han aislado de la piel humana, animales domésticos (perros y gatos) y otros animales como borregos, cerdos, cabras, caballos, ardillas, primates, roedores, marsupiales, mamíferos marinos y pájaros: (Euzéby 2004)

- Cepas de *S. sciuri* subsp. *sciuri* se han aislado del medio exterior, de diversas especies animales y ocasionalmente del hombre y del mono.
- Cepas de *S. sciuri* subsp. *carnaticus* se han aislado principalmente de bovinos y sus derivados (carne y leche).
- Cepas de *S. sciuri* subsp. *rodentium* son aisladas principalmente de roedores.

Las cepas de *S. fleurettii* presentan las siguientes características: cocos Gram positivos de 0.8 a 1.4 μm de diam., son inmóviles, no esporuladas; se presentan de forma aislada, agrupadas en pares, en cadenas cortas o como montones irregulares, son aero-anaerobias, catalasa positivo, resistentes a la bacitracina, novobiocina y a la lisozima, son capaces de crecer en 10% NaCl, son coagulasa negativa, no presentan nucleasa termoestable, son nitrato reductoras, oxidasa positiva y acidifican en aerobiosis a partir de D-fructosa, maltosa, manosa y sacarosa; dan pruebas negativas a ureasa, fosfatasa alcalina, producción de acetoína, arginina dehidrolasa (ADH), ornitina descarboxiasa (ODC), β -glucuronidasa y β -galactosidasa. Se han aislado de leche y quesos de cabra. (Euzéby 2004)

Vornozy aisló una cepa de *S. feurettii* de quesos franceses elaborados a partir de leche de cabra, en su estudio fue capaz de diferenciar *S. fleurettii* de otros estafilococos resistentes a novobiocina como *S. sciuri*, *S. lentus* y *S. vitulinus* mediante pruebas bioquímicas y moleculares como hibridación DNA-DNA y ribotipificación. (Vornozy 2000)

De acuerdo con lo reportado en la literatura, *Staphylococcus sciuri* es un patógeno oportunista de importancia clínica controversial, ya que se han publicado artículos en los que se discute la posible producción de factores de virulencia por dicho microorganismo. Estudios han mostrado su alta capacidad para producir biopelículas, hemolisinas, y alta actividad proteolítica y de DNasa (Srdjan 2001). Aunque las cepas *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. lentus*, y *S. sciuri* no se encuentran frecuentemente en humanos (Ieven M. y col. 1995).

Se han aislado del rumen *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri*, *Staphylococcus sciuri* subsp. *lentus*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus xylosus* de los Estafilococos coagulasa-negativo resistentes a novomicina (CNS) (Laukova 1994). En tanto *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus aureus* son algunas de las bacterias con resistencia a vancomicina que se han aislado de salchichas italianas fermentadas. (Gardini 2003). También se ha reportado la presencia de *S. sciuri* resistente a meticilina y susceptible a neomicina de vacas con mastitis (Guerin-Faubleee 2003). *Staphylococcus xylosus*, *Staph. saprophyticus*, *Staph. simulans*, *Staph. sciuri* y *Micrococcus luteus* fueron las principales especies aisladas de un producto cárnico madurado tradicional de origen español. (Vilar 2000)

En un estudio de bacterias aisladas del queso Tilsit se encontró que cepas de *Staphylococcus*, que mostraron un rápido crecimiento a pH ≤ 5.5 , son importantes para el crecimiento del cultivo iniciador y que promueven el crecimiento de la cepa amarilla *Arthrobacter*. Se encontró que la combinación de las cepas: *B. linens* proteolítica no pigmentada, *Arthrobacter* (amarilla), bacteria corineforme color crema y *Staphylococcus sciuri* proteolítico, son usados para la maduración del queso. (Bockelmann y col. 2006). R O Halloran en 1998 purificó una proteinasa extracelular de *S. sciuri* encontrada en la superficie del queso Tilsit. (R O'Halloran y col. 1998).

Las cepas de *Staphylococcus sp.* coagulasa negativa que pueden estar presentes en la leche de cabra, así como en los quesos de cabra elaborados a partir de leche cruda son: *Staphylococcus arlettae*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *schleiferi*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*, y *Staphylococcus xylosus*. Algunas de estas cepas producen enterotoxinas (*Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus*), lo cual puede presentar un riesgo al consumidor. (Euzéby 2004).

<i>Staphylococcus</i> (De Palaeos)	
<==Staphylococcus	
i. s.: <i>S. condimentii</i>	
<i>S. fleurettii</i>	
<i>S. lugdunensis</i>	
<i>S. nepalensis</i> Spergser, Wieser et al. 2003	
----- <i>S. sciuri</i>	
`----- <i>S. lentus</i>	
`----- <i>S. pulvereri</i>	
`-- <i>S. vitulinus</i>	

Figura 9.5.5 Árbol Filogenético de *Staphylococcus*

Tabla 9.5.7 Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia P24

Descripción	Valor E	Ident. max
<i>Enterococcus</i> sp. 'Enterococ. M1'	3e-79	98%
<i>Enterococcus faecalis</i> cepa ABPL 007	3e-79	98%
Clona bacteriana no cultivable de los Firmicutes M0027_118	3e-79	98%
Clona <i>Enterococcus</i> sp. no cultivable BR16BA03	3e-79	98%
Gen de <i>Enterococcus faecalis</i> cepa SLE1	3e-79	98%
<i>Enterococcus faecalis</i> aislado U3	3e-79	98%
<i>Enterococcus faecalis</i> cepa II/1	3e-79	98%
<i>Enterococcus</i> sp. 3A	3e-79	98%
<i>Enterococcus faecalis</i> cepa ATCC 19433	3e-79	98%
Clona bacteriana no cultivable baja en G+C Gram+ WS07B2_H11	3e-79	98%

La colonia P24 se identificó como bacteria del género *Enterococcus* sp., en algunos casos como *Enterococcus faecalis* con un porcentaje de identidad del 98%.

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) se consideran organismos GRAS (“Generally recognise as safe”) en la producción realimentos. Sin embargo, en los últimos años se ha cuestionado el estatus GRAS de uno de los géneros de BAL: los enterococos. Los enterococos son microorganismos ubicuos que habitan el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Con frecuencia se encuentran en productos cárnicos fermentados, pudiendo alcanzar recuentos de hasta 10^5 UFC/g debido a su tolerancia al cloruro de sodio (NaCl) y al nitrito, que le permite sobrevivir e incluso multiplicarse durante la fermentación. Los enterococos se han utilizado desde hace años en la producción de alimentos por su importante contribución al desarrollo de aroma en quesos, como prebióticos en alimentación humana y animal y como cultivos bioprotectores productores de bacteriocinas en productos lácteos y cárnicos. (Martín J. B. 2005)

Sin embargo, su presencia en los alimentos es motivo de controversia, ya que algunos autores los consideran microorganismos indeseables, indicadores de contaminación fecal y responsables del deterioro de productos cárnicos (Bell et al 1984, Franz et al 1999). Esta controversia se ha visto además acentuada por la desafortunada relevancia clínica que en las últimas décadas han adquirido los enterococos. Éstos se han convertido en la tercera causa de enfermedades nosocomiales causando infecciones del tracto urinario, bacteremia y endocarditis (CDC NNIS System 1998). La mayor parte de las infecciones nosocomiales por enterococos son causadas por *Enterococcus faecalis*, responsable del 80% de los casos, seguido por *E. faecium* que se asocia en un 15-20% de las infecciones restantes. (Morrison y col 1997)

E. faecalis puede causar endocarditis, infecciones de vejiga, próstata, epidídimo; las infecciones de sistema nervioso son menos comunes. *E. faecalis* puede causar infecciones comprometidas en humanos, especialmente en ambiente de hospital. Ha tenido la habilidad de adquirir resistencia a casi todos los antibióticos en uso: aminoglicósidos, aztreonam, cefalosporina, clindamicina, las penicilinas semisintéticas, nafcilina y oxacilina y trimetoprim-sulfametoxazol. La exposición a las cefalosporinas es un riesgo particularmente importante en la colonización e infección con enterococos. Son muy resistentes a condiciones adversas (congelación, desecación, tratamiento térmico, etc.) por lo que son buenos indicadores para valorar las condiciones higiénicas y de conservación de los alimentos congelados y desecados. ²

² Información disponible en línea: http://es.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_faecalis

Tabla 9.5.8 Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia P6

Descripción	Valor E	Ident. max
<i>Bacillus subtilis</i> cepa XJRML-1	7e-81	98%
<i>Bacillus</i> sp. CICCHLJ Q35	7e-81	98%
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>natto</i> cepa MBS04-6	7e-81	98%
Bacteria marina SIMO-4450	7e-81	98%
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> cepa LGV	7e-81	98%
<i>Bacillus mojavenensis</i> cepa BCRC 17124	7e-81	98%
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> cepa BCRC 10447	7e-81	98%

Tabla 9.5.9 Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia T18

Descripción	Valor E	Ident. max
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580, genoma completo	2e-82	99%
<i>Bacillus</i> sp. HPC1411	2e-82	99%
<i>Bacillus licheniformis</i> cepa YP1A	2e-82	99%
Clona no cultivable de <i>Bacillus</i> sp. BR15BF08	2e-82	99%
<i>Bacillus licheniformis</i> aislado AU522B2	2e-82	99%
Gen de <i>Bacillus pumilus</i> , cepa An 105 (= KMM 3883)	2e-82	99%
<i>Bacillus licheniformis</i> cepa 2TgB	2e-82	99%

Los resultados del BALST para las colonias **P6, T18, T10 y Q25** indican que son cepas del género *Bacillus* sp.

P6 se identificó como *B. subtilis* con un 98% de identidad; T18 como *B. licheniformis* o *B. pumilus* con un 99%; T10 como *B. megaterium* o *B. flexus* con un 98% y finalmente Q25 también se identificó como *B. megaterium* con un 99%.

Tabla 9.5.10 Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia T10

Description	Valor E	Ident. max
<i>Bacillus flexus</i> cepa LF-3	3e-80	98%
<i>Bacillus megaterium</i>	3e-80	98%
<i>Bacillus</i> sp. 095802	3e-80	98%
<i>Bacillus megaterium</i> cepa HDYM-24	3e-80	98%
Clona no cultivable de <i>Bacillus</i> sp. GASP-WA2W1_	3e-80	98%
Clona bacteriana Marina SIMO-1596	3e-80	98%
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	3e-80	98%
Bacteria del hielo glacial G500K-18	3e-80	98%
Clona bacteriana marina no cultivable OMU-3455	3e-80	98%
Bacteria de sedimento Marino ISA-3244-b	3e-80	98%

Tabla 9.5.11 Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia Q25

Descripción	Valor E	Ident. max
<i>Bacillus megaterium</i> CECRIbio 04	6e-82	99%
Clona bacteriana del suelo no cultivable 38-1	6e-82	99%
<i>Bacillus megaterium</i> cepa SAFN-017	6e-82	99%
Clona bacteriana no cultivable AKIW936	6e-82	99%
Clona de la familia Bacillaceae no cultivable PH-B53N	6e-82	99%
<i>Bacillus megaterium</i> cepa KSC_SF2j	2e-81	98%
Clona del categoría Firmicutes Amb	3e-80	98%
<i>Bacillus</i> sp. CCBAU 10722	3e-80	98%
Clona de <i>Bacillus</i> sp. No cultivable GASP-WA2W1_D10	3e-80	98%
Clona bacteriana marina no cultivable T-3822	3e-80	98%

Taxonomía: Reino Bacteria, Categoría Firmicutes, Clase Bacilli, Orden Bacillales, Familia Bacillaceae, Género Bacillus

Los bacilos en general están clasificados dentro de los microorganismos aeróbicos o facultativos productores de catalasa. Pueden ser Gram positivos o Gram variables, en general producen endosporas o sea esporas que se forman dentro de la célula, las que son termorresistentes y también resisten a agentes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos. Muchos bacilos producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones; también producen antibióticos y son ejemplos de éstos la bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina. En general, los bacilos crecen bien en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc. como las únicas fuentes de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno; viven dentro de los límites de temperatura de 55 a 70°C, el límite inferior de pH para *Bacillus* es de 2 a 3.³

Las características principales de *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus licheniformis* son:

- bacilos grampositivas, mesófilas,
- producen esporas ovales o cilíndricas,
- son fermentativas, usualmente hidrolizan caseína y almidón,
- la pared de la espora es delgada

El grupo filogenético de *B. subtilis* comprende las siguientes especies: *B. atrophaeus*, *B. amyloquefaciens*, *B. mojavensis*, *B. subtilis* subsp *subtilis*, *B. subtilis* subsp *spizizenii* y *B. vallismortis*; *B. flexus* y *B. megaterium*, también son dos especies cuyas secuencias genéticas 16S ARNr son muy similares. Por lo que es de entenderse que en algunas de las colonias secuenciadas se hayan obtenido resultados que las identifican como dos o más de las especies relacionadas. (Scheldeman y col. 2005)

³ Información disponible en línea: <http://www.bioland.cl/mo-biobac.htm>

B. subtilis realiza una fermentación 2,3 butanodiol, cuyos productos principales son butanodiol, etanol, CO₂, y H₂O. También produce glicerol como un producto de la fermentación. No es potencialmente patógeno, no produce endotoxinas y secreta proteínas hacia el medio. *Bacillus subtilis* es inofensivo para los animales convencionales. (<http://www.bioland.cl/mo-biobac.htm>)

B. megaterium es una eubacteria encontrada en suelo. Es muy importante en la industria biotecnológica debido a su tamaño y sus habilidades enzimáticas ya que sus enzimas ayudan a producir penicilina de origen sintético y por su utilidad en clonación debido a su buena estabilidad de plásmidos recombinantes.⁴

Entre las cepas de *Bacillus* sp., las proteasas alcalinas más importantes son las del tipo serina, dentro de las que se encuentran las llamadas subtilisinas, siendo las producidas por *B. subtilis* y *B. amyloquefaciens* las más estudiadas en el área industrial. (Giraldo y col. 2003)

Las Bacterias ácido lácticas poseen un sistema proteolítico ineficiente, es por eso que los cultivos se enriquecen con enzimas proteolíticas o microorganismos proteolíticos. En un estudio se comprobó que adicionando *B. megaterium* a un suero de queso que contenía *Lactobacillus salivarius* spp. *salicinius* (BAL que puede crecer a concentraciones altas de sal) se podía obtener una conversión eficiente de lactosa a ácido láctico. (Vasala 2005). Asimismo, se comprobó que hay una mayor producción de proteasas de *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas fluorescens* en productos elaborados a base de leche. (Ali 1998)

⁴ Información disponible en línea: http://web.umn.edu/~microbio/BIO221_2000/Bacillus_megaterium.html

Los mesófilos aerobios esporulados predominantes en la leche cruda de búfalo son: *Bacillus subtilis* (42.5%) y *Bacillus megaterium* (34.8%), seguidos por *Bacillus circulans* (4.9%), *Bacillus cereus* (4.6%), *Bacillus pumilus* (2.9%), *Bacillus polymyxa* (2.8%), *Bacillus licheniformis* (1.9%), *Bacillus badius* (1.5%), *Bacillus brevis* (1.3%), *Bacillus pulvifaciens* (1.2%), *Bacillus coagulans* (1.1%), y *Bacillus firmus* (.5%) (Shehata 1983), por lo que es comprensible la identificación de los microorganismos presentes en las muestras de queso Cotija.

La suciedad de las ubres y tetas está considerada como uno de los factores más importantes en la contaminación de la leche cruda por bacterias esporuladas. Cuando los animales consumen los piensos contaminados por bacterias esporuladas, altos números de esporas pueden estar presentes en sus heces y por lo tanto contaminar las ubres y tetas. Otras fuentes importantes de contaminación de la leche cruda por esporulados son el ensilado (forrajes fermentados en silos), equipo sanitizado inadecuadamente, ductos y grandes tanques. A pesar de las diferencias estacionales, regionales y metodológicas, hay tendencias generales en cuanto a la composición de la microbiota del género *Bacillus* sp. presente en la leche. *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. subtilis* generalmente constituyen las especies mesofílicas esporuladas predominantes. *B. cereus* presente como especie psicrótrofa, mientras que *Geobacillus stearothermophilus* y *B. licheniformis* y *B. flexus* son las especies termófilas y termodúricas (respectivamente). (Scheldeman y col. 2005).

Tabla 9.5.12 Identificación y características de las bacterias proteolíticas aisladas de quesos Cotija

Clave Col	Microorganismo	Morfología colonial forma, textura y color	Morfología observada Gram/ Prueba catalasa	Muestra
Q2	<i>Staphylococcus sciuri</i> ^a	Circular, cremosa, blanca	Coco +/+	4J
Q4	<i>Staphylococcus sciuri</i> ^a	Irregular, cremosa, crema	diplococo +/+	
Q25	<i>Bacillus megaterium</i>	Circular, cremosa, amarilla	Bacilo corto +/+	
P6	<i>Bacillus subtilis</i> ^b	Circular, cremosa, crema	Bacilo corto +/+	5M
P24	<i>Enterococcus faecalis</i>	Irregular-extendida, cremosa	Coco cadena +/-	
T10	<i>Bacillus flexus</i> ^c	Circular, cremosa, crema	Bacilo largo cad. +/+	6M
T18	<i>Bacillus licheniformis</i> ^d	Circular, cremosa, crema	Bacilo largo cad. +/+	

Nota: Pudiendo ser también alguna cepa de:

- a) *S. sciuri* subsp. *sciuri*, *carnaticus* o *rodentium*, *S. fleurettii*, *S. lentus* o *S. xylosus*.
- b) *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *spizizenii* o *natto*, o *B. mojavensis*.
- c) *B. megaterium* o *Geobacillus stearothermophilus*.
- d) *B. pumilus*.

De las 7 colonias que se identificaron, la mayoría son cepas del género *Bacillus* sp. lo cual coincide con la información bibliográfica, pues son microorganismos productores de proteasas ubicuos del medio de las granjas donde se producen derivados lácteos. Siguiéndole especies del género *Staphylococcus*, pudiendo ser alguna cepa del grupo *S. sciuri*. Y la última colonia proteolítica identificada fue *Enterococcus faecalis*, pese a que se ha reportado baja actividad proteolítica de las bacterias ácido lácticas, ésta cepa sí la presentó tal como lo menciona Pouch Downes.

La cepa aislada de *B. subtilis* fue la que mostró mayor actividad proteolítica a 30°C (en el medio Agar Calcio-Caseinato adicionado con 5g/L de leche), siguiéndole las cepas de *S. sciuri*, *B. flexus*, *B. licheniformis*, *E. faecalis* y por ultimo *B. megaterium*; aunque esta última presentó la mayor actividad a 37°C (mismo medio pero adicionado con 7.5g/L de leche).

Estas bacterias se encontraban presentes en las muestras de queso Cotija en órdenes de 10^2 , 10^3 y 10^4 dependiendo de la caja de donde se aislaron.

Cabe mencionar que estas cepas fueron capaces de crecer en un medio cuyo a_w se encontró alrededor de 0.85, lo cual indica que hay muy poca agua disponible para las reacciones en los quesos estudiados. Dado que estos microorganismos fueron capaces de sobrevivir en un medio con bajo a_w , queda demostrado que son resistentes a condiciones acuosas variables; también, se ha corroborado que estas cepas son ácidotolerantes debido a que el pH del alimento se encontró entre 5.5 y 5.3, y un % de acidez de 1.2-1.5.

No se podría decir que las bacterias proteolíticas previamente citadas, son los únicos microorganismos proteolíticos presentes en el queso Cotija, puesto que éste, representa un medio muy complejo en el que se dan diversa interacciones entre los microorganismos presentes en él. Pudieran ocurrir simbiosis o incluso inhibiciones e interacciones que favorecieran el crecimiento de unos y desfavorecieran el de otros, y es posible que no se hayan podido cultivar a muchos más, también presentes.

X. CONCLUSIONES

- ✓ Se encontró variabilidad en la composición del queso Cotija con respecto al productor, sobretodo en cuanto al estado de maduración, lo que indica una gran variabilidad de la materia prima y del proceso.
- ✓ Puesto que la composición básica del queso Cotija *Región de Origen* es la siguiente: Humedad máxima 36%, Grasa mínima 23%, Proteína mínima 25%; puede señalarse que de acuerdo con el parámetro de humedad, sólo los quesos rendidos (con tiempo de maduración ≥ 6 meses) cumplen con la especificación; para el parámetro de grasa, los añejos y rendidos (3-6 meses y ≤ 3 meses de maduración respectivamente) también lo hacen; y de acuerdo al de proteína, sólo dos de los quesos rendidos cumplen.
- ✓ Para controlar la calidad del queso Cotija y aumentar su competitividad a nivel internacional, será necesario que se establezcan especificaciones tanto fisicoquímicas, como microbiológicas para dicho producto.
- ✓ A medida que transcurre la maduración de los quesos Cotija, disminuye el contenido de humedad, a_w y pH; y por el contrario aumenta el contenido de acidez, grasa y proteína, pues se van concentrando los sólidos totales.
- ✓ Durante el transcurso de la maduración de los quesos, los compuestos ácidos generados por la actividad metabólica de los microorganismos presentes se van acumulando y como consecuencia hay un aumento de acidez que conlleva a la disminución del pH, lo cual se observó en los resultados obtenidos.

- ✓ El tiempo de maduración es indirectamente proporcional a la carga de microorganismos indicadores. Conforme ocurre la maduración en los quesos, la carga microbiana se ve afectada por los factores fisicoquímicos de los mismos, puesto que la actividad acuosa relacionada con la humedad y la cantidad de sal presente, limitan el crecimiento microbiano, logrando así, sólo el crecimiento de aquellos microorganismos capaces de soportar las condiciones características del producto: baja humedad, poca agua disponible y elevada cantidad de sal.

- ✓ Se aislaron las siguientes bacterias proteolíticas, las cuales provienen de quesos Cotija auténticos con un tiempo de maduración mayor a los 6 meses:
Bacillus megaterium, *Bacillus flexus*, *Bacillus licheniformis* o *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus mojavensis*, *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri*, *rodentium* o *carnaticus* y *Enterococcus faecalis*.

- ✓ Los microorganismos proteolíticos aislados de las muestras de queso Cotija se han reportado presentes en productos alimenticios de fermentación natural como cárnicos y lácteos principalmente; así como también hay indicio de su capacidad para degradar proteínas, por lo que su presencia en las muestras de queso Cotija estudiadas no es de extrañarse.

- ✓ Los microorganismos proteolíticos presentes en el queso Cotija aportarán en cierta medida características sensoriales al producto, ya que en el proceso proteolítico, las caseínas dan lugar a compuestos (ácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos, aromáticos y azufrados) que contribuyen directamente en el sabor y aroma del queso.

ANEXO 1

SELECCIÓN DEL MEDIO PROTEOLÍTICO

Se probaron los siguientes medios (con microorganismos conocidos por poseer dicha actividad) para poder seleccionar el más adecuado, con el propósito de realizar el aislamiento e identificación de los microorganismos proteolíticos:

- Agar leche descremada
- Agar Calcio-Caseinato (-base- y adicionado con leche descremada en polvo a diferentes concentraciones)

En el Agar Leche descremada, las colonias de bacterias proteolíticas se encuentran rodeadas de una zona clara como resultado de la conversión de la caseína en compuestos nitrogenados solubles; sin embargo, zonas claras en el Agar Leche llegan a formarse por bacterias que producen ácidos a partir de carbohidratos fermentables en el medio. La zona clara en el Agar Leche refleja solamente el desdoblamiento completo de la caseína, mientras que las etapas tempranas de proteólisis, no pueden ser detectadas por la opacidad del medio (Pouch Downes 2001). Aunque en este medio, sí se observó la actividad proteolítica producida por los microorganismos al formarse halos de aclaramiento en el medio turbio, éste no se seleccionó pese a la rapidez y facilidad de elaboración, pues para el caso de algunos microorganismos probados, los halos se observaron claramente definidos hasta después de los 3 días de incubación.

El Agar Calcio-Caseinato se seleccionó pues está reportado como medio selectivo para la demostración y el recuento de microorganismos degradadores de proteínas en alimentos, ya que este medio contiene caseínas que pueden ser desdobladas por dichos microorganismos; como consecuencia, se producen halos de aclaramiento alrededor de las colonias en el medio de cultivo, que en caso contrario tendría aspecto turbio. (Manual de Medios de Cultivo - Merck).

Este medio mejorado del Agar leche descremada (por contener caseinato, citrato y cloruro de calcio) aumenta la sensibilidad de detección al poderse observar las etapas tempranas del

desdoblamiento de la caseína, dada por la formación de una zona de precipitado (paracaseínas insolubles) en un medio transparente. Este medio contiene un buffer que reduce la formación de zonas falso-positivas causadas por la producción de acidez. (Pouch Downes 2001)

Se probó el medio -base- Agar Calcio Caseinato sin leche, y adicionado con leche descremada en polvo estéril (5, 7.5 y 10 g/L):

Debido a que en el medio adicionado con 5g/L de leche se observó mejor el halo translúcido alrededor de la colonia, se decidió utilizarlo para el aislamiento de cepas proteolíticas a partir de las muestras de queso Cotija.

En el medio sin leche sólo se observó el crecimiento microbiano (no se observaron zonas claras) puesto que el medio (traslucido) no permitió observar zonas de aclaramiento. En los medios adicionados con 7.5 g/L y en particular en el de 10 g/L de leche se observó demasiado opaco el medio y aunque sí se percibió el halo alrededor de las colonias, la diferencia entre la zona “clara” y el medio no fue tan marcada como en el medio adicionado con 5g/L de leche, además el crecimiento de las colonias durante el transcurso de la incubación en el medio con 10g/L de leche se vio disminuido comparado con el crecimiento observado en el medio con 5g/L.

PREPARACIÓN DEL MEDIO AGAR CALCIO CASEINATO CON LECHE DESCREMADA EN POLVO (ACC)

Para preparar 500 mL de medio

- 1.- Preparar solución de leche descremada en polvo y esterilizar en autoclave (121 ° C /5 min.)
- 2.- Preparar el medio -base- sin sales y esterilizar en autoclave (121 ° C /15 min.)
- 2.- Preparar solución de sales 100X y esterilizar en autoclave (121 ° C /15 min.)
- 4.- Colocar el matraz con 445 mL del medio base fundido en parrilla de agitación
- 5.- Adicionar con punta estéril 5 mL de solución de sales [100X] y agitar
- 6.- Adicionar 50 mL de solución de leche descremada en polvo y agitar
- 7.- Después de mezclado el medio verter en cajas petri estériles

Composición del medio -base- Agar Calcio-Caseinato

Componente	g/L	g/445mL
Peptona de carne	4.0	2.0
Extracto de carne	2.0	1.0
Peptona de caseína	2.0	1.0
Caseinato de calcio	3.5	1.75
NaCl	5.0	2.5
Agar	13.0	6.5

Solución de sales 100X

Componente	g/L	g/L [100X]	g/100mL [100X]
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.2	20	2
Citrato de K ₃ • H ₂ O	0.35	35	3.5
Na ₂ HPO ₄	0.105	10.5	1.05
KH ₂ PO ₄	0.035	3.5	0.35

ANEXO 2

REACTIVOS Y MEDIOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

- Caldo Nutritivo

<i>Componente</i>	<i>g/L</i>
Peptona	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Fosfato dipotásico	2
Tween 80	1
Citrato diamónico	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	1
Sulfato de manganeso	0.05

- Caldo APT

<i>Componente</i>	<i>g/L</i>
Peptona de caseína	12.5
Extracto de levadura	7.5
Glucosa	10
Cloruro de sodio	5
Citrato de sodio	5
Fosfato dipotásico	5
Tween 80	0.2
Sulfato de magnesio	0.8
Sulfato de manganeso	0.14
Sulfato ferroso	0.04
Tiamina	0.001
agar	13.5

El caldo APT es un medio no selectivo de amplio espectro con Tween usado para la determinación del número de microorganismos y el cultivo de bacterias acidolácticas heterofermentativas en alimentos, inclusive lactobacilos, especies de *Leuconostoc* y *Estreptococos* acidolácticos, así como otros microorganismos exigentes de una concentración elevada de Tiamina, según Evans y Niven (1951).

- Buffer PBS

<i>Componente</i>	<i>g/L</i>	<i>g/ 50 mL</i>
Cloruro de sodio	8	0.4
Cloruro de potasio	0.2	0.01
Fosfato dibásico de sodio	1.44	0.072
Fosfato monobásico de potasio	0.24	0.012

Buffer para resuspender la células y lavarlas, sobretodo cuando están en medio de cultivo líquido. Los reactivos se disuelven en 40 mL y se ajusta el pH a 7.4 (con HCl o NaOH), después se agrega lo restante de agua para completar 50 mL verificando que se disuelvan bien todas las sales. Se esteriliza en autoclave (15 min/121°C).

- Liozima (Lisozyme, Egge white. Research Organics Inc.)
- RNasa [10 µg/mL]

Ribouclease A de actividad 90 U/mg. Para prepararla libre de DNAsa:

Disolver RNasa a una concentración de 1mg/ml en agua destilada filtrada estéril, hervir de 10 a 30 min. o 15 min. a 90°C en termomix, dejar enfriar a temperatura ambiente y alicuotar. Almacenar a -20°C.

- Proteinasa K (Boehringer Mannheim, 14.4 mg/mL)
- SDS al 10%
- NaCl 6M
- Solución Fenol-Cloroformo-Isoamílico (25:24:1), marca Sigma Aldrich.
- Etanol al 100%
- Etanol al 75%
- Buffer TE

10 mM Tris-Cl, pH 8;

1mM EDTA, pH8

ANEXO 3

PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Se utilizó el Kit de purificación: High pure PCR Product Purification Kit, de Roche.

Para 100 μ L de reacción:

1. Transferir el producto de PCR a un tubo estéril de 1.5 mL
2. Adicionar 500 μ L del buffer de unión. Mezclar perfectamente
3. Transferir al tubo de filtrado de alta pureza
4. Centrifugar a una velocidad máxima de 13000xg / 30-60 seg. a temperatura ambiente y desechar el eluido
5. Adicionar 500 μ L del buffer de lavado
6. Centrifugar nuevamente a una velocidad máxima de 13000xg / 30-60 seg. a temperatura ambiente y desechar el eluido.
7. Adicionar 200 μ L del buffer de lavado
8. Centrifugar nuevamente a una velocidad máxima de 13000xg / 30-60 seg. a temperatura ambiente y desechar el eluido.
9. Colocar en tubo receptor estéril de 1.5 mL
10. Adicionar 50-100 μ L del buffer de elusión o en mezcla buffer de elusión-agua destilada estéril 1:1 (si se va a secuenciar)
11. Mezclar y Centrifugar a 13000xg / 60 seg. a temperatura ambiente

ANEXO 4

VALORES DE LAS MEDICIONES REALIZADAS PARA LA COMPARACIÓN DE LA
ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

A LAS 24 HRS DE INCUBACIÓN

COL	% Leche	T incubación 30°C			T incubación 37°C		
		tamaño diam (mm)		<u>Øhalo</u> Øcol	tamaño diam (mm)		<u>Øhalo</u> Øcol
		col	halo		col	halo	
T10	0.5	3	9	3.00	7.5	14	1.87
	0.75	3.5	10	2.86	5	12	2.40
T11	0.5	4	8	2.00	8	13	1.63
	0.75	4	9	2.25	5	12	2.40
T18	0.5	4.5	10	2.22	7.5	13	1.73
	0.75	4	10	2.50	8	14	1.75
P6	0.5	4	12	3.00	9	20	2.22
	0.75	3.5	14	4.00	8	18	2.25
P24	0.5	5.5	13	2.36	12	17	1.42
	0.75	5	11	2.20	11	16	1.45
Q2	0.5	3	10	3.33	4	11	2.75
	0.75	3.5	13	3.71	5.5	11	2.00
Q3	0.5	3	11	3.67	4	10	2.50
	0.75	3	10	3.33	6	13	2.17
Q4	0.5	4	10	2.50	15	24	1.60
	0.75	3.5	10	2.86	7	15	2.14
Q25	0.5	3	x	x	2.5	8	3.20
	0.75	2.5	x	x	2	6	3.00

A LAS 48 HRS DE INCUBACIÓN

COL	% leche	T incubación 30°C			T incubación 37°C		
		tamaño diam (mm)		<u>Øhalo</u> Øcol	tamaño diam (mm)		<u>Øhalo</u> Øcol
		col	halo		col	halo	
T10	0.5	5.5	16	2.91	10.5	22	2.10
	0.75	5.5	16	2.91	7.5	21	2.80
T11	0.5	6.5	16	2.46	11.5	20	1.74
	0.75	6	19	3.17	9.5	20	2.11
T18	0.5	6.5	19	2.92	10.5	21	2.00
	0.75	6	19	3.17	9	21	2.33
P6	0.5	6	23	3.83	14	30	2.14
	0.75	5	25	5.00	15	30	2.00
P24	0.5	8	17	2.13	17.5	25	1.43
	0.75	9	18	2.00	15	24	1.60
Q2	0.5	4.5	14	3.11	6	17	2.83
	0.75	5	16	3.20	6	18	3.00
Q3	0.5	4	17	4.25	6	19	3.17
	0.75	5	17	3.40	6	19	3.17
Q4	0.5	4	17	4.25	23	30	1.30
	0.75	4	16	4.00	15	24	1.60
Q25	0.5	3	6	2.00	3.5	13	3.71
	0.75	3.5	x	x	3.5	13	3.71

A LAS 72 HRS DE INCUBACIÓN

COL	% leche	T incubación 30°C			T incubación 37°C		
		tamaño diam (mm)		$\overline{\text{Ø}}_{\text{halo}}$ $\overline{\text{Ø}}_{\text{col}}$	tamaño diam (mm)		$\overline{\text{Ø}}_{\text{halo}}$ $\overline{\text{Ø}}_{\text{col}}$
		col	halo		col	halo	
T10	0.5	7	22	3.14	13	29	2.23
	0.75	8	23	2.88	11	27	2.45
T11	0.5	8	21	2.63	13.5	29	2.15
	0.75	8	24	3.00	12	26	2.17
T18	0.5	8	22	2.75	14	31	2.21
	0.75	8	27	3.38	12	28	2.33
P6	0.5	6.5	33	5.08	x	x	x
	0.75	6	34	5.67	x	x	x
P24	0.5	12	25	2.08	x	x	x
	0.75	13	24	1.85	x	x	x
Q2	0.5	6	20	3.33	7.5	25	3.33
	0.75	6.5	24	3.69	7	25	3.57
Q3	0.5	5.5	24	4.36	7.5	25	3.33
	0.75	6	21	3.50	8	26	3.25
Q4	0.5	10	22	2.20	26	40	1.54
	0.75	6	23	3.83	29	36	1.24
Q25	0.5	4	8	2.00	5.5	18	3.27
	0.75	4	6	1.50	4.5	16	3.56

ANEXO 5

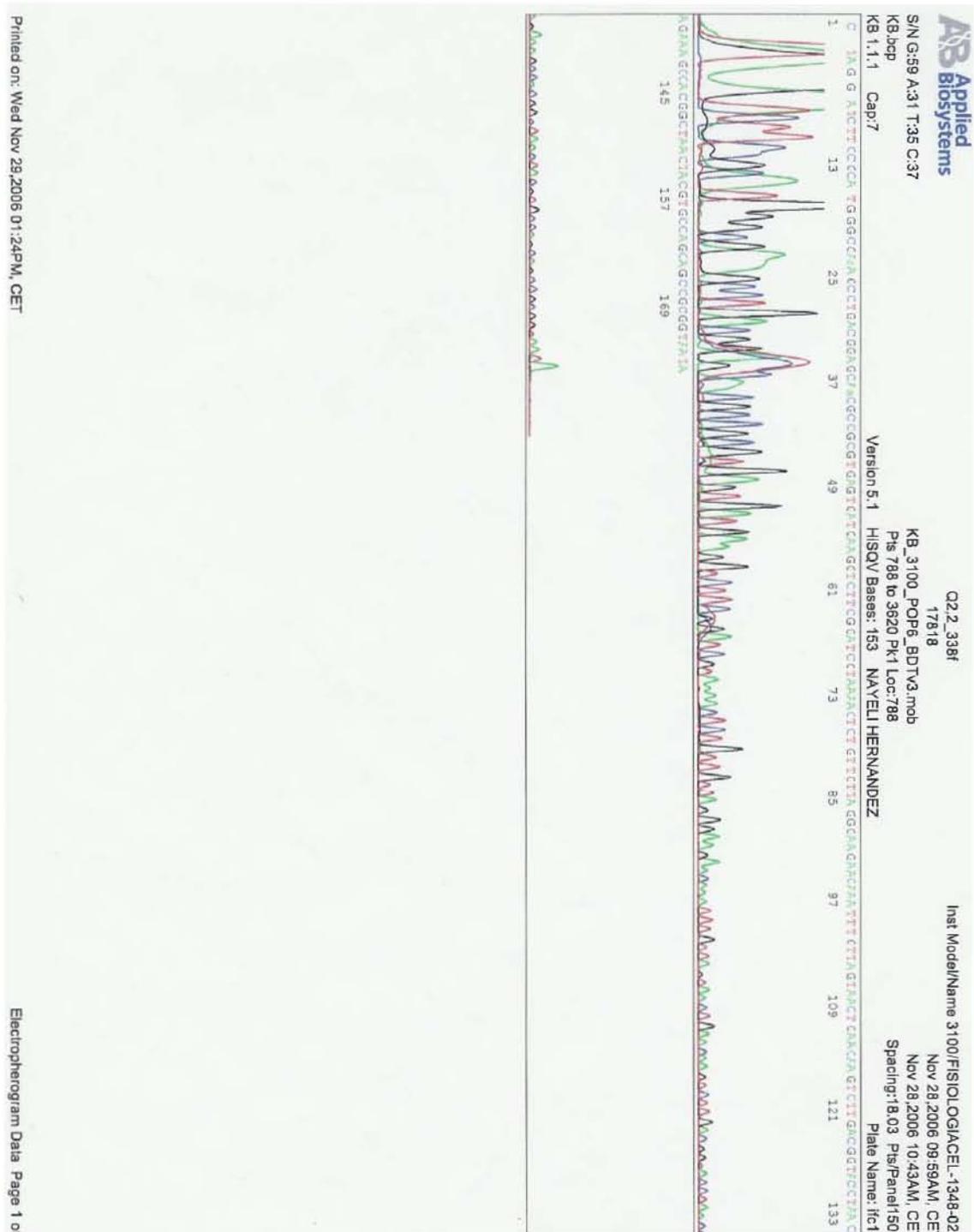
CÁLCULOS DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN PARA LA REACCIÓN DE PCR

colonia	conc ADN (ngADN/ μ L)	conc ADN dilución 1:10	V ₁ (μ l) para 10ngADN/ μ L	V H ₂ O (cbp 50 μ L)
Q2, ¹	287.3		1.74	48.26
Q2, ²	363.3		1.38	48.62
Q3, ¹	333.3		1.50	48.50
Q3, ²	200.3		2.50	47.50
Q3, ³	229.5		2.18	47.82
Q4, ¹	24.9		20.11	29.89
Q4, ²	186.0		2.69	47.31
Q4, ³	218.8		2.29	47.71
Q25, ¹	1725.0	172.50	2.90	47.10
Q25, ²	124.5		4.02	45.98
P6, ¹	128.0		3.91	46.09
P6, ²	248.7		2.01	47.99
P24, ¹	3810.5	381.05	1.88	48.12
P24, ²	265.7		1.88	48.12
T10, ¹	1338.5	133.85	3.74	46.26
T10, ²	498.1		1.00	49.00
T11, ¹	2710.5	271.05	1.84	48.16
T11, ²	843.4	84.34	5.93	44.07
T18, ¹	738.0	73.80	6.78	43.22
T18, ²	247.0		2.02	47.98

ANEXO 6

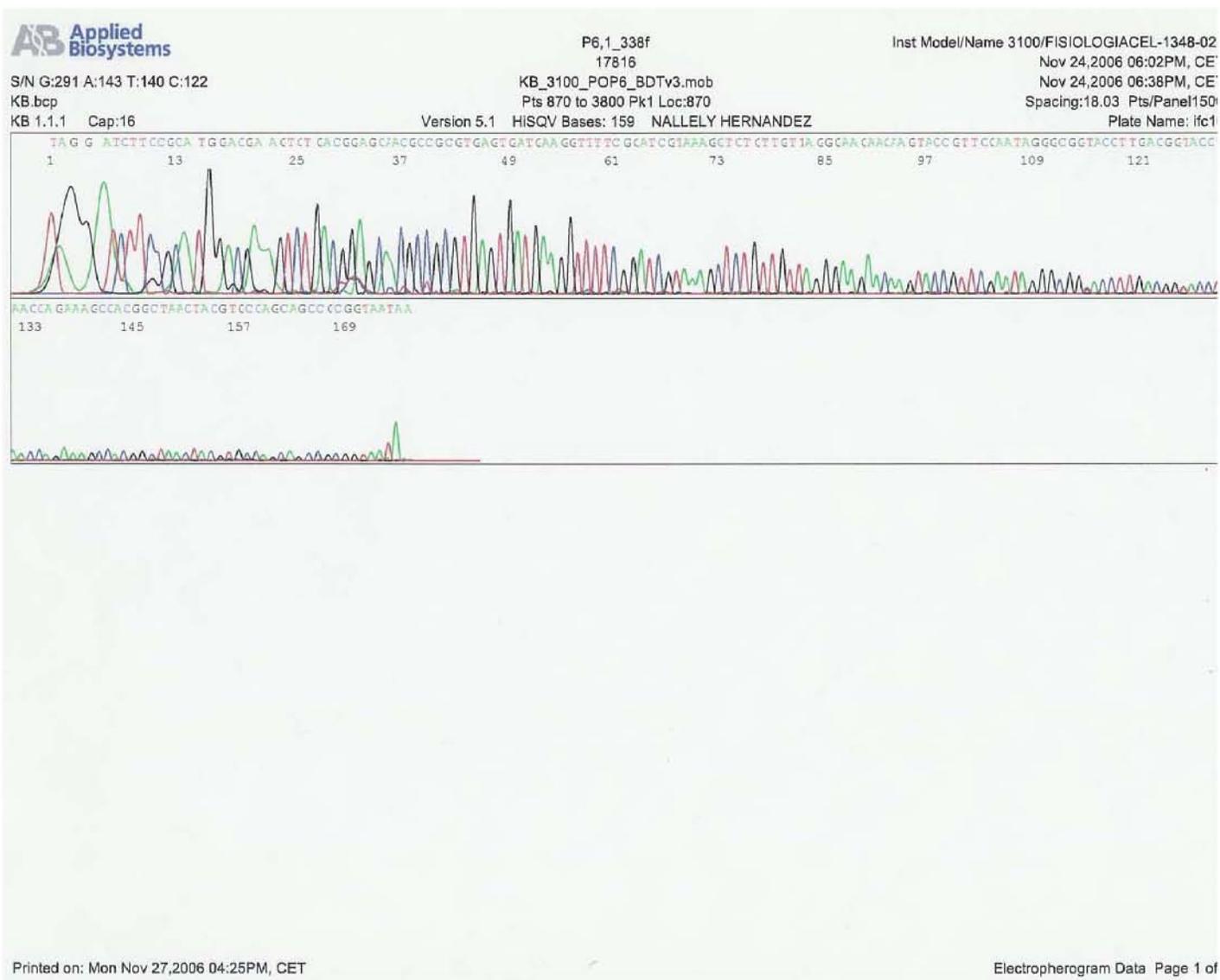
SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS

Q2

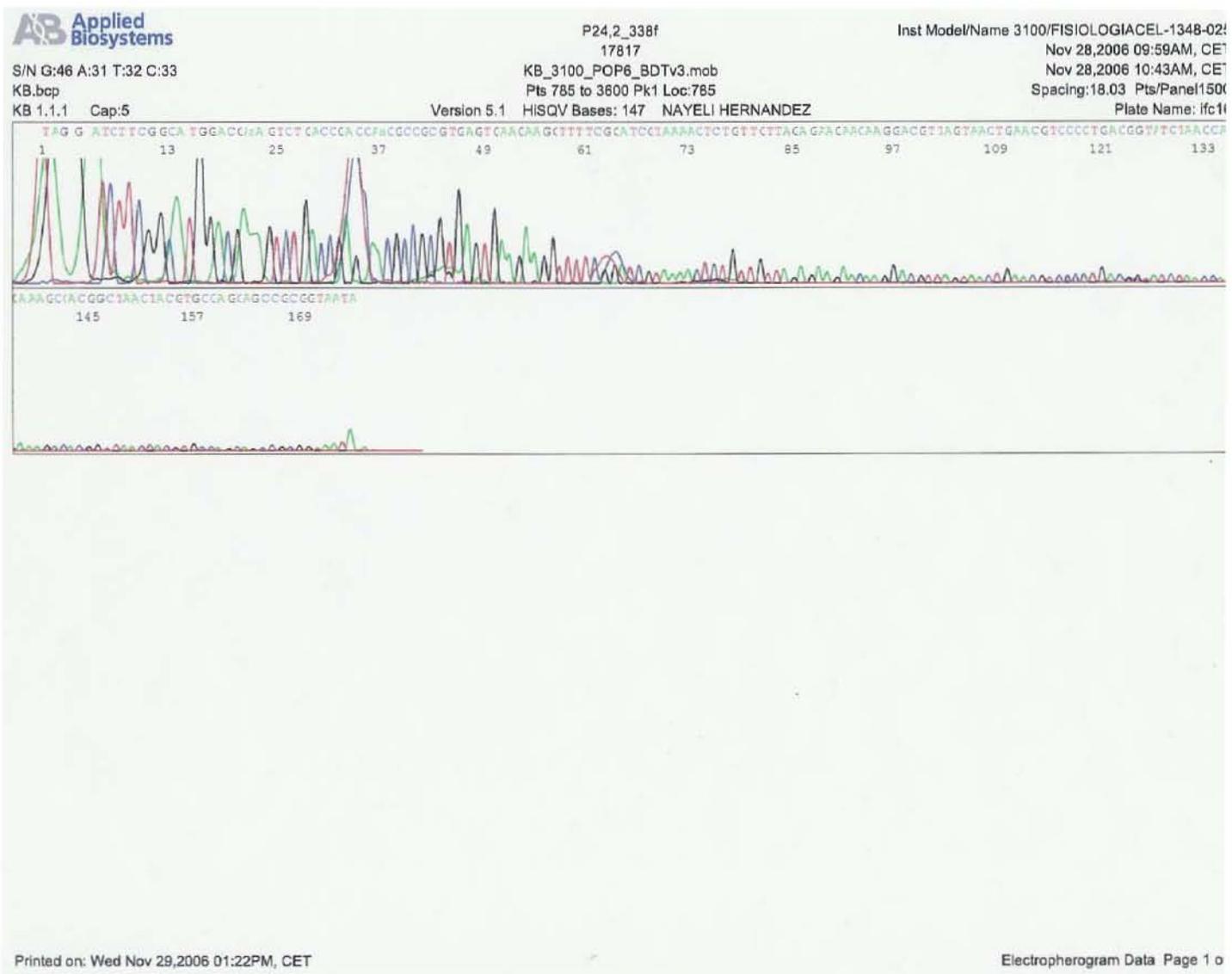


Q25



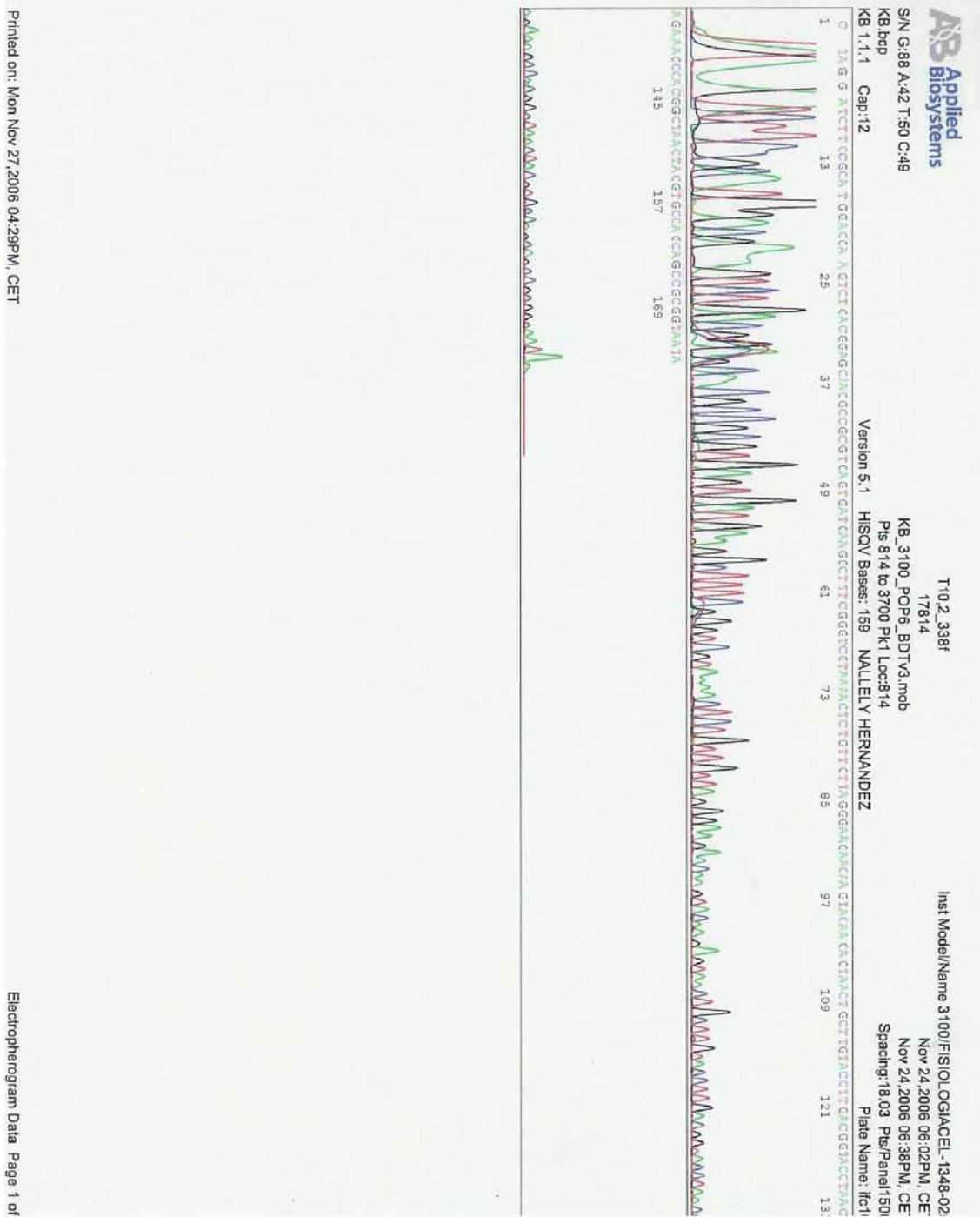


P6

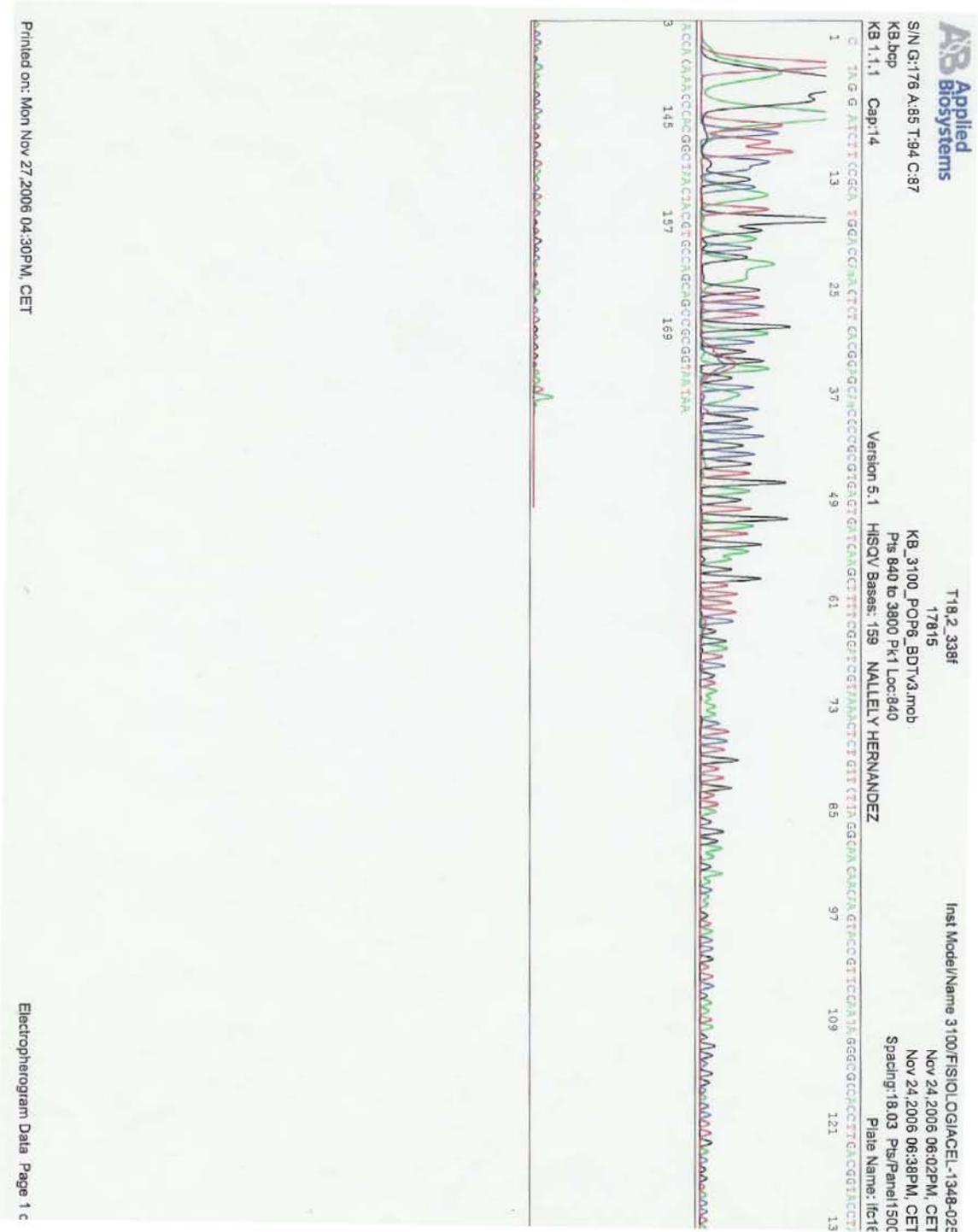


P24

T10



T18



ANEXO 7

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICOS

Figura 1	Propuesta de una clasificación de los Quesos Mexicanos Genuinos obtenidos por cuajado enzimático
Cuadro 1	Algunas características básicas de los quesos genuinos mexicanos
Figura 2.1	Queso Cotija
Figura 2.2	Localización de las comunidades productoras
Figura 3.1	Proceso general de elaboración del Queso Cotija
Tabla 3.1	Composición básica del Queso Cotija Región de Origen
Figura 3.2	Proceso proteolítico que se lleva a cabo durante la maduración del queso
Figura 7.1	Diagrama general de la metodología
Tabla 7.1	Muestras de Queso Cotija provenientes de Tocumbo, Michoacán (M) y Quitupan, Jalisco(J)
Tabla 8.1	Composición del Agar Calcio-Caseinato
Figura 8.1	Diagrama para el análisis microbiológico y el aislamiento de los microorganismos proteolíticos (para cada una de las muestras)
Figura 8.2	Medición del diámetro del halo y la colonia
Tabla 8.2	Secuencias de los cebadores empleados (Ampe et al., 1999)
Tabla 8.3	Protocolo empleado en la PCR (Ampe et al., 1999)
Tabla 8.4	Condiciones de la reacción de PCR para amplificar la región V3 del gen ARNr 16S. (Muyzer et al., 1999)
Tabla 8.5	Enzimas de restricción
Tabla 8.6	Condiciones de la Electroforesis Sumergida
Tabla 9.1.1	Determinación de a_w
Tabla 9.1.2	Determinación de pH y acidez (como Ácido Láctico)
Tabla 9.1.3	Determinación del % de humedad por el método de Horno a vacío
Tabla 9.1.4	Determinación de % de grasa por el método de Gerber para Quesos
Tabla 9.1.5	Determinación de proteína (Microkjeldahl)
Tabla 9.1.6	Determinación de cenizas (Mufla a 550°C ±25°C durante 2 hrs.)
Tabla 9.1.7	Determinaciones fisicoquímicas
Tabla 9.1.8	Análisis Químico Proximal en Base Húmeda
Tabla 9.1.9	Análisis Químico Proximal en Base Seca
Tabla 9.1.10	Análisis fisicoquímico y Químico Proximal (BH)
Tabla 9.1.11	Análisis fisicoquímico y Químico Proximal (BS)
Tabla 9.1.12	Composición típica de algunos Quesos
Tabla 9.2.1	Cuantificación de los tres grupos de microorganismos indicadores
Tabla 9.2.2	Actividad acuosa (a_w) mínima para el crecimiento de algunas bacterias
Tabla 9.2.3	Especificaciones Microbiológicas de la NOM-121-SSA1-1994
Tabla 9.2.4	Especificaciones Microbiológicas de la NMX- F- 092-1970
Tabla 9.3.1	Resultados globales de la cuantificación de microorganismos proteolíticos
Figura 9.3.1	Imágenes de las colonias proteolíticas aisladas de los quesos rendidos

Tabla 9.3.2	Características de las colonias proteolíticas aisladas y purificadas a partir de los quesos Cotija Rendidos
Figura 9.3.2	Imágenes de las colonias proteolíticas purificadas de las Muestras 4 y 5
Figura 9.3.3	Imágenes de las colonias proteolíticas purificadas de la Muestra 6
Tabla 9.4.1	Relación de diámetro del halo y colonia ($\varnothing_{halo}/\varnothing_{col}$) a las diferentes condiciones de incubación
Gráfica 9.4.1	Gráficos de barras de la Relación $\varnothing_{halo}/\varnothing_{col}$ a las diferentes condiciones de incubación
Tabla 9.4.2	Condiciones a las que se observó la mayor actividad proteolítica
Figura 9.4.1	Imágenes de la Comparación de la Actividad Proteolítica
Figura 9.4.2	Imágenes de la Comparación de la Actividad Proteolítica
Figura 9.5.1	Geles de agarosa al 1.5% con algunos de los productos de las extracciones de ADN
Gráfico 9.5.1	Barridos del espectro de 200 a 300 nm de los productos de ADN extraídos y observados en el gel C de agarosa al 1.5% de la Figura 9.5.1
Tabla 9.5.1	Mediciones de absorbancias a 260 y 280 nm, y su relación para calcular la concentración del ADN y comprobar su pureza
Figura 9.5.2	Gel de agarosa al 2% que muestra los amplicones de la reacción
Tabla 9.5.2	Resultados del análisis de restricción
Figura 9.5.3	Geles de agarosa al 2% con los fragmentos de la digestión con enzimas de restricción
Tabla 9.5.3	Características usadas como criterio de selección para secuenciación
Figura 9.5.4	Gel de agarosa al 2% que muestra los amplicones purificados
Tabla 9.5.4	Secuencias obtenidas para las colonias proteolíticas seleccionadas
Tabla 9.5.5	Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia Q2
Tabla 9.5.6	Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia Q4
Figura 9.5.5	Árbol Filogenético de <i>Staphylococcus</i>
Tabla 9.5.7	Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia P24
Tabla 9.5.8	Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia P6
Tabla 9.5.9	Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia T18
Tabla 9.5.10	Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia T10
Tabla 9.5.11	Resultados de la secuencia en el NCBI para la colonia Q25
Tabla 9.5.12	Identificación y características de las bacterias proteolíticas aisladas de quesos Cotija

BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Alais Ch. (1976). La Ciencia de la Leche. Ed. CECSA. México.
- ◆ Ali A., Roushdy I.M. "Fermentation of milk permeate by proteolytic bacteria for protease production". Appl Biochem Biotechnol. 1998 Aug; 74(2): 85-93
- ◆ Álvarez Barajas R., Barragán López E., Chombo Morales P., "Reglas de uso, Marca colectiva, Queso Cotija Región de Origen". México, 2005.
- ◆ Bell R. G., y DeLacey K.M. (1984). "Heat injury and recovery of *Streptococcus faecium* associated with the souring of chub-packed luncheon meat". J. Appl. Bacteriol. 57, 229-236.
- ◆ Beresford T. P., Fitzsimons N. A., Brennan N. L. and Cogan T. M., "Recent advances in cheese microbiology", International Dairy Journal, 11 (2001) 259-274.
- ◆ Bockelmann y col. "The microflora of Tilsit cheese. Part 2. Development of a surface smear starter culture" Food / Nahrung Kiel, Germany. Volume 41, Issue 4 , Pages 213 - 218. Published Online: 19 Oct 2006. Disponible en línea: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/113411604/ABSTRACT?CRETRY=1&SRETRY=0>
- ◆ Cervantes Escoto, Fernando; Villegas de Gante, Abraham; Cesín Vargas, Alfredo; Espinoza Ortega, Angélica. "Los quesos mexicanos genuinos: un saber hacer que se debe rescatar y preservar". Universidad Autónoma Chapingo; Campus Puebla; Universidad Autónoma del Estado de México. Comunicación aceptada por el Comité Científico del III Congreso Internacional de la Red SIAL "Alimentación y Territorios", celebrado del 18 al 21 de octubre del 2006, sede Universidad Internacional de Andalucía. Baeza, Jaen. España. Copyright © 2006 de los autores.
- ◆ CDC NNIS System (1998) National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) report, data summary from October 1986-April 1998, issued June 1998. Am. J. Infect. Control 26, 522-533. 13
- ◆ Díaz Ruíz, Gloria y Wachter Rodarte Carmen. "Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados". Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 45, No 1-2. 2003. pp. 30 - 40.
- ◆ El sol de Morelia Mayo 2007, "Se abre el mercado extranjero del queso Cotija; firma convenio gobierno estatal con comercio Justo". Martha Alicia Ochoa Barajas.
- ◆ Euzéby J.P., Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. Última actualización 03 diciembre 2004. Disponible en línea: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/fleurettii.html>

- ◆ Fox Patrick F., Guinee Timothy P., Cogan Timothy M and McSweeney Paul L. H., *Fundamentals of Cheese Science*, (USA An Aspen Publication 2000), 225-226.
- ◆ Fox. P.F., Guinee P.T. (1987). *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol 2. Elsevier Applied Science. Great Britain.
- ◆ Franz C.M., Holzapfel W., and Stiles M.E. (1999). "Enterococci at the crossroads of food safety?". *Int. J. Food Microbiol.* 47, 1-24.
- ◆ Gardini Fausto; Rosanna Tofalo ; Giovanna Suzzi. "A survey of antibiotic resistance in micrococcaceae isolated from italian dry fermented sausages". *Journal of Food Protection* Volume: 66 Number: 6 Page: 937 - 945. 2003. Disponible en línea: http://archives.foodsafety.ksu.edu/fsnet/2003/6-2003/fsnet_june_3-2.htm
- ◆ Gerhard A. Wolf, Stephan J. Wirth, "Soluble, dye-labelled substrates for a micro-plate assay of proteinase activity", *Journal of Microbiological Methods*, 25 (1996) 337-342.
- ◆ Giraldo Estrada C., Sáez Vega A.A., Montoya Campusano O.I., "Aplicación de la metodología ZERI en la producción de proteasas alcalinas de *Bacillus* sp" *Revista Universidad EAFIT, Medellín Colombia*. 2003. 39, 132, pp 57-64.
- ◆ Guerin-Fauble V y col . "In vitro activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis" *Vet Rec.* 2003 Apr 12;152(15):466-71.
- ◆ Hernández Briones, Veronica. "Queso Cotija: Estudio del Análisis Fisicoquímico, Proximal y Actividad antioxidante" Tesis de Licenciatura. Facultad de química, UNAM. 2007
- ◆ Ieven M y col. "Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci". *J Clin Microbiol.* 1995 May; 33(5): 1060-3. Disponible en línea http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=7615705&query_hl=2&itool=pubmed_docsum
- ◆ Jason A. Caplan and W. Fahey, "Plate -clearing technique to screen mixed microbial populations for protein degraders", *Soil Biol. Biochem.* Vol.14 (1982) 373-375.
- ◆ Jay James M., "Modern Food Microbiology". 6th ed. KA/PP (Kluwer Academic/Plenum Publishers) USA 2000. Aspen Food Science Text Series. pp 113-130.
- ◆ Kwok, A. Y. C., & A. W. Chow. 2003. "Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 87-92.
- ◆ La Jornada 2006, "Eligen al Queso de Cotija, Michoacán, como el mejor del mundo este año".

- ◆ Laukova A. "Antimicrobial susceptibility of ruminal coagulase-negative staphylococci". Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Kosice. New Microbiol. 1994 Apr;17(2):123-32. Disponible en línea: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=8065269&query_hl=2&itool=pubmed_docsum
- ◆ Marilley L., Casey M. G., "Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains", International Journal of Food Microbiology, (2003)
- ◆ Martín Juárez, Belén. Tesis Doctoral. "Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados, mediante técnicas moleculares, estandarización, seguridad y mejora tecnológica". Universitat de Girona. Doctorado en ciencias, Enero 2005.
- ◆ Morrison D., Woodford N. y Cookson B. (1997). "Enterococci as emerging pathogens of humans". J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement 83, 89S-99S.
- ◆ Muyzer et al. "DGGE/TGGE" a method for identifying genes from natural ecosystems" Current Opinion in Microbiology. 1999. Vol. 2. pp 317-322.
- ◆ NCBI. National Center for Biotechnology Information. (nucleotide-nucleotide BLAST). U.S. National Library of Medicine. Base de datos disponible en línea: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi
- ◆ Pouch Downes Frances. "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods". 4th edition. American Public Health Association. 2001; p. 183.
- ◆ Randazzo C.L., Torriani S., Akkermans D.L., De Vos W.M. and Vaughan E.E. "Diversity, Dynamics, and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Sicilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis", Appl. Environ. Microbiol, 2002 Vol.68, No. 4, 1882-1892.
- ◆ Robinson R.K., "Dairy Microbiology" Vol.2, The Microbiology of Milk Products. 2nd Ed. Elsevier Applied Science. USA. 1990.
- ◆ R O'Halloran y col. "Purification of an extracellular proteinase from Staphylococcus sciuri found on the surface of Tilsit cheese". Biochem Soc Trans. 1998 Feb;26 (1):S29 10909787. Disponible en línea: <http://waisser.lib.bioinfo.pl/auth:Bockelmann,W>.
- ◆ Santos Moreno, Armando y Villegas de Gante, Abraham. "El Queso Cotija, Propuesta para su Fabricación a Partir de Leche Pasteurizada", Lácteos y Cárnicos Mexicanos Vol.12 No. 3. Junio/Julio 1997
- ◆ Saurel, R. "Modelling of French Emmental cheese water activity during salting and ripening periods". Journal of Food Engineering. 2004. 63: 163-170.

- ◆ Scheldemann P., Pil A., Herman L., De Vos P., Heyndrickx M., “Incidence and Diversity of Potentially Highly Heat-Resistant Spores Isolated at Dairy Farms” *Applied and Environmental Microbiology*, Mar 2005, p. 1480-1494.
- ◆ Shehata AE, Magdoub MN, Sultan NE, El-Samragy YA. “Aerobic mesophilic and psychrotrophic sporeforming bacteria in buffalo milk”. *J Dairy Sci.* 1983 Jun; 66(6): 1228-31.
- ◆ Spergser, J., M. Wieser, M. Täubel, R. A. Rosselló-Mora, R. Rosengarten & H.-J. Busse. 2003. “*Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 2007-2011.
- ◆ Stepanovic S y col. “Possible virulence factors of *Staphylococcus sciuri*”. *FEMS Microbiology*. 199 (1), 47-53, 2001. Disponible en línea: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10649.x>
- ◆ Vasala A., Panula J., Neubauer P. “Efficient lactic acid production from high salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* ssp. *salicinius* with pre-treatment by proteolytic microorganisms”. *J Biotechnol.* 2005 Jun 29; 117(4): 421-31.
- ◆ Vernozy-Rozand et al. “*Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat’s milk cheeses”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2000), 50, 1521-1527 Printed in Great Britain
- ◆ Vilar y col. “A survey on the microbiological changes during the manufacture of dry-cured lacon, a Spanish traditional meat product”. *J Appl Microbiol.* 2000 Dec;89(6):1018-26
- ◆ Villegas de Gante Abraham. “Los Quesos Mexicanos De Pasta Texturizada (Un enfoque sobre el Queso Tipo Manchego Mexicano)”. 2004
- ◆ Wachter, M. C. (1996) *Manual de técnicas de laboratorio de Microbiología de Alimentos.* Facultad de Química, UNAM. Cd. de México.
- ◆ Medios de cultivo. <http://www.britanialab.com/español/español.html>
- ◆ Manual de medios de cultivo Merck.
- ◆ **Normas Oficiales Mexicanas.**
<http://ssa.pue.gob.mx/egfomento/infoactividades/normas.htm>
 - Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico:

	NOM-110-SSA1-1994
--	-------------------
 - Bacterias Aerobias en placa: NOM-092-SSA1-1994
 - Mohos y Levaduras en alimentos: NOM-111-SSA1-1994
 - Bacterias Coliformes (NMP): NOM-112-SSA1-1994

Otras Normas:

Norma Mexicana NMX-F-206-1986 alimentos - lácteos - determinación de acidez expresada como ácido láctico en leche en polvo.

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

Norma Oficial Mexicana NOM-F-100-1984 Alimentos - lácteos - determinación de grasa butírica en quesos por el método de Gerber-Van Gulik.

Proyecto de Norma PROY-NMX-F-710-COFOCALEC-2004. Sistema Producto de leche - Alimento - Alimentos lácteos - Determinación de grasa en Quesos. Método de prueba.

Norma Mexicana NMX-F-098-1976. Determinación de proteínas en quesos.

Norma Mexicana NMX-F-701-COFOCALEC-2004. Sistema Producto Leche- Alimentos - Lácteos. Determinación de Cenizas en quesos. Método de Prueba.

Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 Bienes y servicios. Quesos frescos, madurados y procesados.

Norma Mexicana NMX- F- 092-1970. Calidad para quesos procesados

Sitios de internet:

- ◆ <http://www.palaeos.org/Staphylococcus>
- ◆ <http://html.rincondelvago.com/bacteria-staphilococcus-aureus.html>
- ◆ http://es.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_faecalis
- ◆ <http://www.bioland.cl/mo-biobac.htm>
- ◆ http://web.umn.edu/~microbio/BIO221_2000/Bacillus_megaterium.html
- ◆ <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/reportajes/quesos/quesos.htm>. Reportaje de Juárez Ma. Teresa “Quesos Mexicanos toda una tradición”